



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

06-129575

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: PROCEDIMIENTOS PARA PREDECIR LA RESPUESTA
TERAPEUTICA FRENTE A AGENTES QUE FUNCIONAN SOBRE EL
RECEPTOR DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO

SOLICITANTE: PHARMACIA & UPJOHN COMPANY LLC

DIRECCIÓN: 7000 Portage Road, kalamazoo, Michigan 49001, E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 27 de diciembre de 2006

P2006/000270

**PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: PHARMACIA & UPJOHN COMPANY LLC ✓

Dirección: 7000 Portage Road, Kalamazoo,
Michigan 49001, Estados Unidos

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE

Lugar de Constitución: Delaware, Estados
Unidos de América.

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número 79782747 Bta
TP 74:295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: LUIS A. PARODI

Dirección: 301 Henrietta Street, Kalamazoo, Michigan 49001, Estados
Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2005/002086 ✓

Fecha Junio 27, 2005 ✓

Publicación Internacional No. WO 2006/006072 ✓

Fecha Enero 19, 2006 ✓

6

Título (54) PROCEDIMIENTOS PARA PREDECIR LA RESPUESTA TERAPEUTICA FRENTE A
AGENTES QUE FUNCIONAN SOBRE EL RECEPTOR DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO

Clasificación Internacional (51) C12Q 1/68, G01N 33/74

Prioridad

SI

☒

N

☐

(33) País de Origen.

US

(32) Fecha

Julio 8, 2004 ✓

(31) Número de Solicitud

60/586.380 ✓

9

Comprobante de pago No. 06 - 97.319

Fecha Diciembre 19, 2006

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Ver expediente No.

Adjunto copia simple

☒

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☒

Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-128575-00000-0000
Fec: 2006-12-27 16:53:27 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tm. 11 PATENTERIA
No: 579 FASENACIONALES
Atr 411 PRESENTACION Folio: 235

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 97,319
FECHA : DICIEMBRE 19 DE 2006

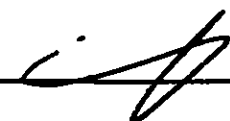
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBERG	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	950-00110-6	41778697	18/12/2006	4,286,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRANSITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	463,000.00

SUN: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

9

TRADUCCION OFICIAL No. 04-383

Efectuada el día 24 de noviembre de 2004, de un documento escrito en Inglés, al cual para su identificación se le estampa el sello de Sergio Andrés Rueda Iglesias, Traductor e Intérprete Oficial por Resolución No. 0138 del 11 de febrero de 2002 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia.

Traducción Oficial de las autenticaciones notariales y subsiguientes correspondientes a un Poder otorgado por **Pharmacia & Upjohn Company LLC** a **Carlos R. Olarte**, y/o **J. Ian Raisbeck** y/o **Ana María Frieri**, documento este que viene en español y se explica por sí solo.

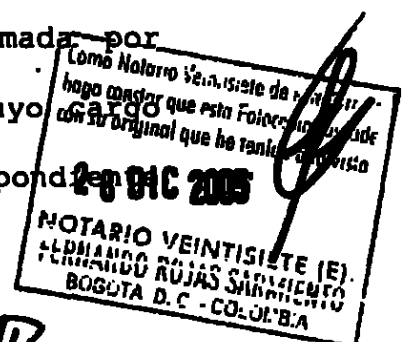
(Fdo.) **Grover F. Fuller Jr**, Secretario Asistente, 8 de noviembre de 2004.

En inglés y en español viene certificación notarial del 8 de noviembre de 2004 mediante el cual se confirma el nombre y cargo de **Grover F. Fuller Jr**, así como la existencia legal de la compañía. Dicha certificación notarial fue firmada por **Jane E. Callahan**, Notario Público de Nueva York, cuyo cargo expira el 12/11/2005, según consta en su correspondiente sello notarial.

Estado de Nueva York - Condado de Nueva York

JR

SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. C. J. N. 773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCION No. 0138 DE FEBRERO 11, 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL D.E.C.H.



5

Suscrito y jurado ante mí a los 8 días del mes de noviembre de 2004.

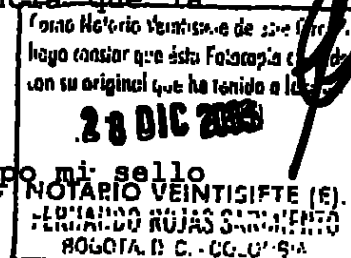
(Fdo.) Jane E. Callahan

No. 405290

ESTADO DE NUEVA YORK - CONDADO DE NUEVA YORK

El suscrito, Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York, tribunal éste provisto de sello por ley, por medio de este documento certifico conforme a la ley ejecutiva del Estado de Nueva York que Jane E. Callahan, cuyo nombre aparece suscrito en la declaración jurada o certificado de reconocimiento anexo, desempeñaba en el momento de tomar el mismo, las funciones de Notario Público, en y para el Estado de Nueva York, estando debidamente comisionado bajo juramento y habilitado como tal; que conforme a la ley en mi despacho obra un certificado de su nombramiento con su firma autógrafa; que conozco bien la letra manuscrita de dicho Notario Público o he comparado la firma que aparece en el instrumento anexo con la que reposa en los archivos de mi oficina, y creo en conciencia que la misma es auténtica.

EN FE DE LO CUAL, firmo de mi puño y letra y estampo mi sello oficial, el día 15 de noviembre de 2004.



SERGIO ANDRÉS RIVERA IGLESIAS
C. C. 1773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCIÓN No 0123 FEBRERO 11, 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

(Fdo.) Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal
Supremo del Estado de Nueva York.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

El presente documento público

2. Fue firmado por Norman Goodman

3. Que actuó en su calidad de Escribano del Condado

4. Lleva el sello del Condado de Nueva York

Se certificó:

5. En Nueva York, Nueva York

6. El 15 de noviembre de 2004

7. Por parte del Secretario Encargado del Estado de Nueva
York

8. Bajo el Número NYC-10317312A

9. Aparece Sello del Distrito de Columbia

10. Firmado por James Bizarri, Secretario de Estado Encargado

Es traducción fiel y completa efectuada por:


Sergio Andrés Rueda Iglesias
C.C.80.424.773 de Bogotá

SERGIO A. RUEDA IGLESIAS
C.C. 80.424.773
TRADUCCION FIEL
ESPAÑOL - INGLÉS
RESOLUCION No 0330 de 1997
MINISTERIO DE JUSTICIA

Curro Notario veintiseis de esta ciudad
hago constar que esta Fotocopia es fiel
con su original que he tenido a la vista.
SERGIO A. RUEDA IGLESIAS
28 DIC 2005
NOTARIO VEINTISIETE (E)
TERMINO NOTARIAL SAN JUAN
DEL BOGOTÁ C - C.U.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

7

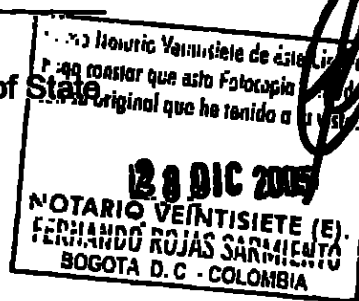
1. Country: **United States of America**
This public document
2. has been signed by **Norman Goodman**
3. acting in the capacity of **County Clerk**
4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

5. At New York, New York
6. the 15th day of November 2004
7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
8. No. NYC-10317312A
9. Seal/Stamp
10. Signature

James Bizzarri

James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State



OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER — TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTÁ, COLOMBIA
TELEPHONE +57-1 638-6200
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

Pharmacia & Upjohn Company LLC

301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 U.S.A.

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte, J. Ian Ralsbeck and Ana María Frieri full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Poder

El suscrito,

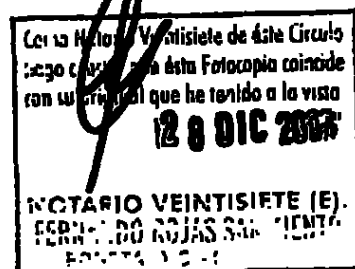
domiciliado en

por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte, J. Ian Ralsbeck y Ana María Frieri poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma: Grover F. Fuller Jr., Assistant Secretary

Date/Fecha: November 8, 2004

City/Country/Ciudad, País: New York, NY U.S.A.



State of New York
County of New York, } ss.:

No 405290 Form 1

9

I, NORMAN GOODMAN, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal,
DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

Jane E. Callahan

whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office; and I believe that such signature is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereto set my hand affixed my official seal this

NOV 13 2004

FEE PAID \$3.00

Norman Goodman
County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County

NOTARIO VEINTISIETE (E).
FERNANDO RUIZ SANTIAGO
BOGOTA, D. C. COLOMBIA

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 Piso 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

9
10

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date, **Nov. 8, 2004**

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

1. That

1. Que

Grover F. Fuller Jr., Assistant Secretary
of legal age and domiciled in
150 East 42nd Street, New York, NY 10017 U.S.A.
signed the foregoing document.

mayor de edad y domiciliado
suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as Assistant Secretary
of Pharmacia & Upjohn Company LLC

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de
de

3. That Pharmacia & Upjohn Company LLC,
having its principal place of business located in
301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001
is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the Power of Attorney is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. Que
con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. That the grantor has the authority to execute the
Power of Attorney and that his/her representation is
legal.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscibir el poder, y que ésta es legítima.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

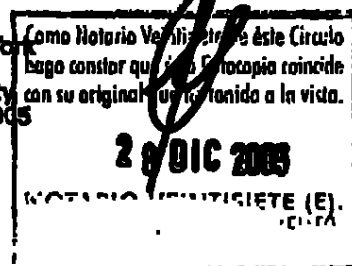
5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):

*State of New York
County of New York*

*Seen to before me
this 8th day of Nov. 2004*

Jane E. Callahan
JANE E. CALLAHAN
Notary Public, State Of New York
No. 01CA4859877
Qualified In New York County
Commission Expires 12/11/2005



10
u

Sébase que Yo, STEPHEN DAVID FINN, de 31 Amersham Hill Drive Hight Wycombe Buckinghamshire Reino Unido un Notario Público debidamente autorizado.

**CERTIFICO UNICAMENTE QUE EL DOCUMENTO ANEXADO AL PRESENTE
LLAMADO:**

CESION, firmada por LUIS A. PARODI

Ha sido presentado ante mi por los Servicios Consulares de Blair en nombre de Pfizer con base en un documento original con firmas debidamente autenticas.

Firmado y sellado en 31 Amersham Hill Drive según lo dicho anteriormente, el día de hoy 20 de noviembre de 2006.

[Firmado y sellado]

STEPHEN FINN
Notario Público

H
12

Apostilla

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
2. Este documento público ha sido firmado por: Stephen David Finn
3. obrando en su condición de Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

Certificado

5. en Londres
6. el 22 de noviembre de 2006
7. por: Secretario Principal de Estado de su Majestad para Asuntos Extranjeros
8. No. H207445
9. Sello / Estampilla
[Sellado]
10. Firma: Jack Milligan
[Firmado]

12
13

PC32455A

CO-1

CESIÓN

A cambio de una contraprestación de valor, la cual me (nos) pagó PHARMACIA & UPJOHN COMPANY LLC, una sociedad de responsabilidad limitada constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos, con dirección de correos en el # 301 de Henrietta Street, Kalamazoo, Michigan 49001, Estados Unidos, por el presente le vendo y le cedo (le vendemos y le cedemos) a la citada PHARMACIA & UPJOHN COMPANY LLC la totalidad de mis (nuestros) derechos, el título y el interés que tengo (tenemos) en mi (nuestro) invento de una cierta mejora, nueva y útil, del PROCEDIMIENTOS PARA PREDECIR LA RESPUESTA TERAPEUTICA FRENTE A AGENTES QUE FUNCIONAN SOBRE EL RECEPTOR DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO en la medida en que esta cesión concierna a la República de Colombia, tal y como se describe plenamente el mismo en las especificaciones, y yo (nosotros) autorizo (autorizamos) y le solicito (solicitamos) por el presente a la Oficina de Patentes de Colombia que le expida dicha patente a la citada PHARMACIA & UPJOHN COMPANY LLC de conformidad con la presente cesión.

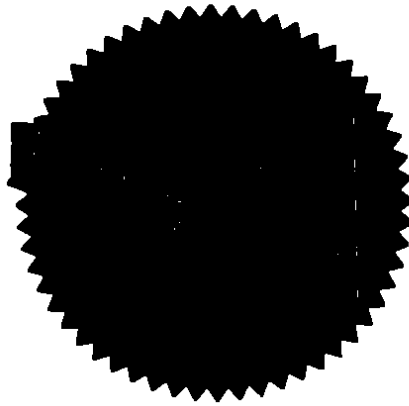
En fe de lo cual firmamos el presente el día de hoy.

New York, USA, 09 noviembre de 2006 (Fdo) Luis A. PARODI
Lugar, fecha y firma – Luis A. PARODI

06/270

13

14



**BE IT KNOWN that I, STEPHEN DAVID FINN of 31 Amersham Hill Drive
High Wycombe Buckinghamshire United Kingdom a duly authorised Notary
Public**

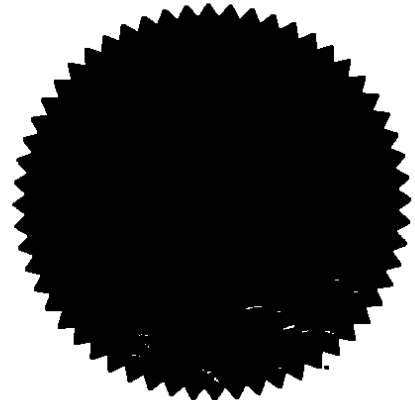
CERTIFY only that the document annexed hereto, namely:

ASSIGNMENT, signed by Luis A. Parodi

**has been presented before me by Blair Consular Services on behalf of Pfizer
on the basis that it is an authentic duly signed original document**

**SIGNED and sealed at 31 Amersham Hill Drive aforesaid on 20th November
2006**

**Stephen Finn
Notary Public**



5874

15

APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **Stephen David Flinn**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

5. at London/à Londres

6. the/le **22 November 2006**

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **H207445**

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: **Jack Milligan**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by PHARMACIA & UPJOHN COMPANY LLC a limited liability company organized and existing under the laws of the State of Delaware, United States of America whose full post office address is 7000 Portage Road, Kalamazoo, Michigan 49001-0199, United States of America, I (we) do hereby sell and assign to the said PHARMACIA & UPJOHN COMPANY LLC, all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in **METHODS FOR PREDICTING THERAPEUTIC RESPONSE TO AGENTS ACTING ON THE GROWTH HORMONE RECEPTOR** so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said PHARMACIA & UPJOHN COMPANY LLC in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this

New York, November 9, 2006 by Luis A. Parodi.
Place, date and signature - Luis A. PARODI

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 January 2006 (19.01.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/006072 A1

(51) International Patent Classification⁷: C12Q 1/68,
G01N 33/74

(21) International Application Number:
PCT/IB2005/002086

(22) International Filing Date: 27 June 2005 (27.06.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/586,380 8 July 2004 (08.07.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PHAR-
MACIA & UPJOHN COMPANY LLC [US/US]; 301
Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): PARODI, Luis, A.
[US/US]; 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001
(US).

(74) Agents: FULLER, Grover, F., Jr. et al.; Pfizer Inc., P.O.
Box 1027, St. Louis, MO 63006 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS FOR PREDICTING THERAPEUTIC RESPONSE TO AGENTS ACTING ON THE GROWTH HOR-
MONE RECEPTOR

(57) Abstract: This invention relates to methods for predicting the magnitude of a subject's therapeutic response to agents that act
on the growth hormone receptor. Preferred aspects include methods for increasing the height of human subjects having short stature,
and for treating obesity and acromegaly.

WO 2006/006072 A1

METHODS FOR PREDICTING THERAPEUTIC RESPONSE TO AGENTS ACTING ON THE GROWTH HORMONE RECEPTOR

FIELD OF THE INVENTION

[001] This invention relates to methods for predicting the magnitude of a subject's therapeutic response to agents that act on the growth hormone receptor. Preferred aspects include methods for increasing the height of human subjects having short stature, and for treating obesity and acromegaly.

BACKGROUND

[002] Most children with significant short stature do not have growth hormone deficiency (GHD) as classically defined by the GH response to provocative stimuli. Once known causes of short stature have been excluded, these subjects are classified with various terms, including familial short stature, constitutional delay of growth, 'very low birth weight' (VLBW), "idiopathic" short stature (ISS). The case of children born short to parents of normal size are called 'intra uterine growth retardation' (IUGR). Children born short for their term are called 'small for gestational age' (SGA). Some, and presumably a large number of, of these children may not reach their genetic potential for height, although results from large-scale longitudinal studies have not been reported. Since there are so many factors that contribute to normal growth and development, it is likely that subjects with ISS, IUGR, SGA as defined, are heterogeneous with regard to their etiology of short stature. Despite not being classically GH deficient, most children with ISS respond to treatment with GH, although not all equally well.

[003] Many investigators have searched for disturbances in spontaneous GH secretion in this set of subjects. One hypothesis suggests that some of these subjects have inadequate secretion of endogenous GH under physiologic conditions, but are able to demonstrate a rise in GH in response to pharmacologic stimuli, as in traditional GH stimulation tests. This disorder has been termed "GH neurosecretory dysfunction," and the diagnosis rests on the demonstration of an abnormal circulating GH pattern on prolonged serum sampling. Numerous investigators have reported results of such studies, and have found this abnormality to be only occasionally present. Other investigators have postulated that these subjects have "bioinactive GH;" however, this has not yet been demonstrated conclusively.

[004] When the GH receptor (GHR) was cloned, it was shown that the major GH binding activity in blood was due to a protein which derives from the same gene as the GHR and corresponds to the extracellular domain of the full-length GHR. Almost all subjects with growth hormone insensitivity (or Laron) syndrome (GHIS) lack growth hormone receptor binding activity and have absent or very low GH-binding protein (GHBP) activity in blood. Such subjects have a mean height standard deviation score (SDS) of about -5 to -8, are resistant to GH treatment, and have increased serum concentrations

17
19

of GH and low serum concentrations of insulin-like growth factor (IGF-I). They respond to treatment with IGF-I. In subjects with defects in the extracellular domain of the GHR, the lack of functional GHBP in the circulation can serve as a marker for the GH insensitivity.

[005] Subjects with ISS who are treated with exogenous GH have shown differing rates of response to treatment. In particular, many children respond somewhat, but not completely, to GH treatment. These subjects have an increase of their growth rates that is only about half that of children that respond fully. The childrens' total height gain following the course of treatment is therefore reduced versus that of children that respond fully, depending on treatment duration. One way of improving the treatment of subjects that do not respond fully has been to increase the GH dosage, which has resulted in somewhat improved growth rates and total height gain. However, increased GH dosage is not desirable for all subjects due to potential side effects. Increased GH dosage also entails increased cost. Unfortunately there is at present no method to identify subjects likely to be less responsive prior to a lengthy treatment and observation period.

[006] There is therefore a need in the art for methods that can be used to identify a subset of subjects who exhibit diminished response rates to treatment with GH. There is also a need for methods that allow the development of improved medicaments for the treatment of subjects who have diminished response to exogenous GH. There is also a need in the art for methods that can be used to identify a subset of subjects who exhibit increased response rates to GH and a need for methods that allow the development of improved medicaments for the treatment of subjects who have increased response to GH.

SUMMARY OF THE INVENTION

[007] The present invention relates to the identification of a GHR allele and isoform as an important factor contributing to differences in positive response to exogenous GH. The invention thus provides a method to predict the degree of a positive response to treatment with compounds that act via the GHR pathway, or preferably compounds that bind the GHR, such as GH compositions. The methods allow the classification of patients a priori as e.g. either high or low responders. Allowing a treatment to be adapted for a particular subject results in economic benefits and/or reduced side effects (e.g. from use of the appropriate dosage of GH compositions or from the use of a compound to which subjects do not show diminished GHR response).

[008] The invention demonstrates that subjects homozygous for the GHRfl allele show growth rates and height changes in response to treatment with GH that are greater than subjects heterozygous or homozygous for the GHRd3 allele. The invention further demonstrates that subjects heterozygous for the GHRd3 allele show growth rates and height changes in response to treatment with GH that are greater than subjects homozygous for the GHRd3 allele.

18
20

[0009] The present invention thus provides methods for determining or predicting GHR-mediated activity, including methods of predicting GHR response to treatment, and methods of identifying a subject at risk for or diagnosing a condition related to diminished GHR activity. Preferably the invention provides methods of predicting a subject's response to an agent capable of interacting with (e.g. binding to) a GHR polypeptide.

[0010] Accordingly, in one aspect, the present invention provides a method of predicting a subject's response to an agent capable of binding to a GHR protein, comprising determining in the subject the presence or absence of an allele of the GHR gene, wherein the allele is correlated with a likelihood of having an increased or decreased positive response to said agent, thereby identifying the subject as having an increased or decreased likelihood of responding to treatment with said agent. Preferably, the method comprises determining in the subject the presence or absence of a GHRd3 allele and/or a GHRf1 allele of the GHR gene, wherein the GHRd3 allele is correlated with a likelihood of having a decreased positive response to said agent and the GHRf1 allele is correlated with a likelihood of having an increased positive response to said agent. Preferably, said agent is used for increasing the height or growth rate of a subject.

[0011] The present invention also provides a method of predicting a subject's response to an agent for increasing the height or growth rate of a subject, comprising determining in the subject the presence or absence of an allele of the GHR gene, wherein the allele is correlated with a likelihood of having an increased or decreased positive response to said agent, thereby identifying the subject as having an increased or decreased likelihood of responding to treatment with said agent. Preferably, the method comprises determining in the subject the presence or absence of a GHRd3 allele and/or a GHRf1 allele of the GHR gene, wherein the GHRd3 allele is correlated with a likelihood of having a decreased positive response to said agent and the GHRf1 allele is correlated with a likelihood of having an increased positive response to said agent.

[0012] The invention also provides a method of predicting a subject's response to an agent for the treatment of a disease or a disorder involving GHR, said method comprising: determining in the subject the presence or absence of an allele of the GHR gene, wherein the allele is correlated with a likelihood of having an increased or decreased positive response to said agent, thereby identifying the subject as having an increased or decreased likelihood of responding to treatment with said agent.

[0013] Preferably, the methods of the invention comprise determining in the subject the presence or absence of a GHR allele having a deletion, insertion or substitution of one or more nucleic acids in exon 3, or most preferably having a deletion of substantially the entire exon 3. In a preferred embodiment of the above methods, said allele of the GHR gene is GHRd3 and/or GHRf1 allele.

[0014] Preferably, said subject has a short stature. More preferably, said subject having short a stature is idiopathic short stature (ISS), very low birth weight (VLBW), intra uterine growth retardation

19
21

(IUGR), or small for gestational age (SGA). Still more preferably, said subject is SGA. Alternatively, said subject suffers of any disease or disorder involving GHR.

[0015] In a preferred embodiment, said GHRd3 allele is correlated with a likelihood of having a decreased positive response to said agent (in comparison with a subject having a GHRf1 allele). In another preferred embodiment, said GHRf1 allele is correlated with a likelihood of having an increased positive response to said agent (in comparison with a subject having a GHRd3 allele). In one embodiment, said agent is a GHR antagonist such as pegvisomant. In another embodiment, said agent is a GHR agonist. Preferably, said agent is a GH composition, more preferably somatropin.

[0016] The methods of the invention can be used particularly advantageously in methods of treatment comprising genotyping an allele of a GHR gene, more preferably a GHRd3 and/or GHRf1 allele. Said genotyping is indicative of the efficacy or therapeutic benefits of said therapy. In one example, the methods of the invention are used to determine the amount of a medicament to be administered to a subject. In another example, the methods are used to assess the therapeutic response of subjects in a clinical trial or to select subjects for inclusion in a clinical trial. For instance, the methods of the invention may comprise determining the genotype of a subject at exon 3 of the GHR gene, wherein said genotype places said subject into a subgroup in a clinical trial or in a subgroup for inclusion in a clinical trial.

[0017] The invention also provides a method for treating a subject suffering of a disease or a disorder involving GHR, the method comprising:

- (a) determining in the subject the presence or absence of an allele of the GHR gene, wherein the allele is correlated with a likelihood of having an increased or decreased positive response to an agent capable of binding to a GHR protein or acting via the GHR pathway; and
- (b) selecting or determining an effective amount of said agent to administer to said subject.

[0018] Preferably, the method comprises determining the presence or absence of a GHRd3 allele and/or a GHRf1 allele of the GHR gene, wherein the GHRd3 allele is correlated with a likelihood of having a decreased positive response to an agent capable of binding to a GHR protein or acting via the GHR pathway and the GHRf1 allele is correlated with a likelihood of having an increased positive response to said agent. Preferably, said agent is used for increasing the height or growth rate of a subject.

[0019] In particularly preferred embodiments, the invention discloses a method for increasing the growth of a subject, the method comprising:

- (a) determining in the subject the presence or absence of an allele of the GHR gene, wherein the allele is correlated with a likelihood of having an increased or decreased positive response to an agent capable of increasing the growth of a subject; and

- (b) selecting or determining an effective amount of said agent to administer to said subject.

[0020] In a preferred aspect, the invention discloses a method for increasing the growth rate of a human subject, said method comprising:

- (a) detecting whether the subject has a height less than about 1 standard deviation, or more preferably less than about 2 standard deviations below normal for age and sex,
- (b) detecting whether the DNA of the subject encodes a GHRd3 and/or GHRf1 polypeptide; and,
- (c) administering to the subject an effective amount of GH that increases the growth rate of the subject.

[0021] An agent capable of binding to a GHR protein or acting via the GHR pathway according to any of the methods of the invention is preferably an agent effective in the treatment of a disorder or a disease involving GHR. In one embodiment, said agent or medicament is a GHR antagonist. In another embodiment, said agent or medicament is a GHR agonist. Said agent or medicament is preferably a GH composition. In a preferred embodiment, said agent or medicament is somatropin. In another preferred embodiment, said agent or medicament is pegvisomant.

[0022] Preferably, said subject has a short stature. More preferably, said subject having short a stature is idiopathic short stature (ISS), very low birth weight (VLBW), intra uterine growth retardation (IUGR), or small for gestational age (SGA). Still more preferably, said subject is SGA. Alternatively, said subject suffers of any disease or disorder involving GHR.

[0023] In a preferred embodiment, said GHRd3 allele is correlated with a decreased positive response to said medicament (in comparison with a subject having a GHRf1 allele). In another preferred embodiment, said GHRf1 allele is correlated with an increased positive response to said medicament (in comparison with a subject having a GHRd3 allele).

[0024] Preferably, said methods of treating a human subject comprise administering to a subject homozygous or heterozygous for the GHRd3 allele an effective dose of an agent or medicament which is greater than the effective dose that would be administered to an otherwise identical subject homozygous for the GHRf1 allele. Alternatively, said methods of treating a human subject comprise administering to a subject homozygous for the GHRd3 allele an effective dose of an agent or medicament which is greater than the effective dose that would be administered to an otherwise identical subject homozygous or heterozygous for the GHRf1 allele.

[0025] In preferred aspects, said agent is a GH molecule. Preferably, the effective amount of GH administered to a subject is between about 0.001 mg/kg/day and about 0.2 mg/kg/day; more preferably, the effective amount of GH is between about 0.01 mg/kg/day and about 0.1 mg/kg/day. In other aspects, the effective amount of GH administered to a subject is at least about 0.2 mg/kg/week.

In another aspect, the effective amount of GH is at least about 0.25 mg/kg/week. In another aspect, the effective amount of GH is at least about 0.3 mg/kg/week. Preferably, the GH is administered once per day. Preferably the GH is administered by subcutaneous injections. Most preferably, the growth hormone is formulated at a pH of about 7.4 to 7.8.

[0026] Another aspect of the invention concerns a method of using a medicament comprising: obtaining a DNA sample from a subject, determining whether the DNA sample contains a GHRf1 allele associated with an increased positive response to the medicament and/or whether the DNA sample contains a GHRd3 allele associated with a diminished positive response to the medicament, and administering an effective amount of the medicament to the subject if the DNA sample contains a GHRf1 allele associated with a increased positive response to the medicament and/or if the DNA sample lacks a GHRd3 allele associated with a diminished positive response to the medicament.

[0027] As discussed, the methods comprise determining in the subject the presence or absence of a GHR allele having a deletion, insertion or substitution of one or more nucleic acids in exon 3, or most preferably having a deletion of substantially the entire exon 3. An allele of the GHR gene associated with a decreased positive response to the medicament is a GHR allele lacking exon 3, preferably a GHRd3 allele. An allele of the GHR gene associated with an increased positive response to the medicament is preferably a GHR allele (GHRf1) containing exon 3.

[0028] The invention also concerns a method for the clinical testing of a medicament, the method comprising:

- a) administering a medicament to a population of individuals; and
- b) from said population, identifying a first subpopulation of individuals whose DNA encodes a GHRd3 polypeptide isoform and a second subpopulation of individuals whose DNA does not encode a GHRd3 polypeptide isoform.

[0029] Alternatively, the invention concerns a method for the clinical testing of a medicament, the method comprising:

- a) administering a medicament to a population of individuals; and
- b) from said population, identifying a first subpopulation of individuals whose DNA encodes a GHRf1 polypeptide isoform and a second subpopulation of individuals whose DNA does not encode a GHRf1 polypeptide isoform.

[0030] Said method may further comprise: (a) assessing the response to said medicament in said first subpopulation of individuals; and/or (b) assessing the response to said medicament in said second subpopulation of individuals. Preferably, the response to said medicament is assessed both in said first and said second subpopulation of individuals. Preferably said response is assessed separately in

said first and second subpopulation of individuals. Assessing the response to said medicament preferably comprises determining the change in height of a subject.

[0031] The invention also concerns a method for the clinical testing of a medicament, the method comprising:

- a) identifying a first population of individuals whose DNA encodes a GHRd3 polypeptide and a second population of individuals whose DNA does not encode a GHRd3 polypeptide; and
- b) administering a medicament to individuals of said first and/or said second population of individuals.

[0032] In one embodiment, the medicament is administered to individuals of said first population but not to individuals of said second population. In one embodiment, the medicament is administered to individuals of said second population but not to individuals of said first population. In another embodiment, the medicament is administered to the individuals of both said first and said second populations.

[0033] Alternatively, the invention concerns a method for the clinical testing of a medicament, the method comprising:

- a) identifying a first population of individuals whose DNA encodes a GHRf1 polypeptide and a second population of individuals whose DNA does not encode a GHRf1 polypeptide; and
- b) administering a medicament to individuals of said first and/or said second population of individuals.

[0034] In one embodiment, the medicament is administered to individuals of said first population but not to individuals of said second population. In one embodiment, the medicament is administered to individuals of said second population but not to individuals of said first population. In another embodiment, the medicament is administered to the individuals of both said first and said second populations.

[0035] The medicament according to the preceding methods is preferably a medicament for the treatment of short stature, obesity, infection, or diabetes; acromegaly or gigantism conditions which could be associated with lactogenic, diabetogenic, lipolytic and protein anabolic effects; conditions associated with sodium and water retention; metabolic syndromes; mood and sleep disorders, cancer, cardiac disease and hypertension.

[0036] A preferred aspect of the invention relates to a method for the clinical testing of a medicament, preferably a medicament capable of increasing the growth rate of a human subject, comprising:

- a) administering a medicament, preferably a medicament capable increasing the growth rate of a human subject, to a population of individuals; and
- b) from said population, identifying a first subpopulation of individuals whose DNA encodes a GHRd3 polypeptide isoform and a second subpopulation of individuals whose DNA does not encode a GHRd3 polypeptide isoform.

[0037] Another preferred aspect of the invention relates to a method for the clinical testing of a medicament, preferably a medicament capable of increasing the growth rate of a human subject, comprising:

- a) administering a medicament, preferably a medicament capable increasing the growth rate of a human subject, to a population of individuals; and
- b) from said population, identifying a first subpopulation of individuals whose DNA encodes a GHRf1 polypeptide isoform and a second subpopulation of individuals whose DNA does not encode a GHRf1 polypeptide isoform.

[0038] Preferably, said subject has a short stature. More preferably, said subject having short a stature is idiopathic short stature (ISS), very low birth weight (VLBW), intra uterine growth retardation (IUGR), or small for gestational age (SGA). Still more preferably, said subject is SGA. Alternatively, said subject suffers of any disease or disorder involving GHR. In one embodiment, the medicament is administered to individuals of said first population but not to individuals of said second population. In one embodiment, the medicament is administered to individuals of said second population but not to individuals of said first population. In another embodiment, the medicament is administered to the individuals of both said first and said second populations.

[0039] Assessing the response to a medicament capable of increasing the growth rate of a human subject or capable of ameliorating ISS, VLBW, IUGR or SGA comprises assessing the change in height of an individual. Increasing the growth rate of a human subject includes not only the situation where the subject attains at least the same ultimate height as GH-deficient subjects treated with GH (i.e., subjects diagnosed with GHD), but also refers to a situation where the subject catches up in height at the same growth rate as GH-deficient subjects treated with GH, or achieves adult height that is within the target height range, i.e., an ultimate height consistent with their genetic potential as determined by the mid-parental target height.

[0040] In one aspect of any of the methods of the invention, the step of determining whether the DNA of subject encodes a particular GHR polypeptide isoform can be performed using a nucleic acid molecule that specifically binds a GHR nucleic acid molecule. In another aspect, the step of determining whether the DNA of subject encodes a GHR polypeptide isoform is performed using a nucleic acid molecule that specifically binds a GHR nucleic acid molecule. Preferably, the methods of the invention comprise determining whether the DNA of an individual encodes a GHRd3 protein or polypeptide. Alternatively, the methods of the invention comprise determining whether the DNA of an

individual encodes a GHRf1 protein or polypeptide. However, the methods of the invention can comprise determining whether the DNA of an individual encodes GHRd3 and GHRf1 proteins or polypeptides. This may thus comprise determining whether the genomic DNA of an individual comprises a GHRd3 or GHRf1 allele, whether mRNA obtained from an individual encodes a GHRd3 or GHRf1 polypeptide, or whether the subject expresses a GHRd3 or GHRf1 polypeptide.

[0041] For example, in any of the above embodiments, determining whether the DNA of an individual encodes a GHRd3 or GHRf1 polypeptide may comprise:

- a) providing a biological sample;
- b) contacting said biological sample with:
 - II) a polynucleotide that hybridizes under stringent conditions to a GHR allele, preferably a GHRd3 or GHRf1 nucleic acid; or
 - III) a detectable polypeptide that selectively binds to a GHR allele, preferably a GHRd3 or GHRf1 polypeptide; and
- c) detecting the presence or absence of hybridization between said polynucleotide and an RNA species within said sample, or the presence or absence of binding of said detectable polypeptide to a polypeptide within said sample.

[0042] Preferably the biological sample is contacted with a polynucleotide that hybridizes under stringent conditions to a GHRd3 or GHRf1 nucleic acid or a detectable polypeptide that selectively binds to a GHRd3 or GHRf1 polypeptide, wherein a detection of said hybridization or of said binding indicates that said GHRd3 or GHRf1 is expressed within said sample.

[0043] Preferably, said polynucleotide is a primer, and wherein said hybridization is detected by detecting the presence of an amplification product comprising said primer sequence. Preferably, said genotyping step comprises a separate run in polyacrylamide electrophoresis and silver staining. Preferably, said detectable polypeptide is an antibody. Detecting the GHRd3 and GHRf1 polypeptides or nucleic acids can be carried out by any suitable method. For example, a serum level of the extracellular domain of GHRd3 or GHRf1 may be assessed (e.g. the high-affinity GH binding protein) can be assessed. Oligonucleotide probes or primers hybridizing specifically with a GHRd3 genomic or cDNA sequence are also part of the present invention, as well as DNA amplification and detection methods using said primers and probes.

DETAILED DESCRIPTION

[0044] GH activity is mediated by the GH receptor (GHR), discussed above. It has been shown that two molecules of GHR interact with a single molecule of GH (Cunningham et al., (1991) Science 254: 821-825; de Vos et al., (1992) Science 255: 306-312; Sundstrom et al., (1996) J. Biol. Chem. 271: 32197-32203; and Clackson et al., (1996) J. Mol. Biol. 277: 1111-1128. The binding happens at two

25
27

unique GHR binding sites on GH and a common binding pocket on the extracellular domain of two receptors. Site 1 on the GH molecule has a higher affinity than Site 2, and receptor dimerization is thought to occur sequentially, with one receptor binding to site 1 on GH followed by recruitment of a second receptor to site 2. Cunningham et al (1991, *supra*) have proposed that receptor dimerization is the key event leading to signal activation and that dimerization is driven by GH binding (Ross et al, *J. Clin. Endocrinol. & Metabolism* (2001) 86(4): 1716-171723. Upon ligand binding, GHRs are internalized rapidly (Maamra et al, (1999) *J. Biol. Chem* 274: 14791-14798; and Harding et al., (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 6708-6712), with a proportion recycled to the cell surface (Roupas et al., (1987) *Endocrinol.* 121: 1521-1530).

[0045] More recently a GHR isoform referred to as GHRd3 was discovered that contains a deletion of exon 3. (Urbanek M et al., *Mol Endocrinol* 1992 Feb;6(2):279-87; Godowski et al (1989) *PNAS USA* 86 : 8083-8087). The deletion was thought to be the result of an alternative splicing event leading to either the retention of the exclusion of exon 3, corresponding either to the full length GHRfl isoform or the exon 3-deleted GHRd3 isoform. Several contradictory results followed the identification of the GHRd3 isoform. Reports proposed that the GHRd3 isoform was subject to tissue-specific splicing, that the expression pattern was developmentally regulated, while other reports proposed that the GHRd3 isoform was specific to an individual. Another report suggested that splicing resulted from a genetic polymorphism that is transmitted as a Mendelian trait and alters splicing (Stallings-Mann et al., (1996) *P.N.A.S U.S.A.* 94: 12394-12399). Finally, Pantel et al. ((2000), *J. Biol. Chem.* 275 (25): 18664-18669), demonstrated upon analysis of the GHR locus that in humans the GHRd3 isoform is transcribed from a GHR allele that carried a 2.7kb genomic deletion spanning exon 3. Pantel further identified two flanking retroelements in the genomic DNA samples from individuals who express only GHRfl, but only a single a retroelement in the DNA of individuals expression GHRd3, suggesting that the exon 3 deletion is the result of a homologous recombination event between the two retroelements located on the same GHRfl allele.

[0046] The hGHRd3 protein differs from the full length hGHR (GHRfl) by a deletion of 22 amino acids within the extracellular domain of the receptor. The GHRd3 isoform encodes a stable and functional GHR protein (Urbanek et al., (1993) *J. Biol. Chem.* 268 (25): 19025-19032). While Urbanek et al. (1993) reported that the GHRd3 isoform is stably integrated into the cell membrane and binds and internalizes ligand as efficiently as hGHR, no functional differences from the GHRfl isoform were identified.

[0047] The present invention is based on the discovery that human subjects carrying a growth hormone receptor (GHR) allele having an exon 3 deletion (GHRd3) have a lower positive response to treatment with an agent acting via the GHR pathway than subjects not carrying the GHRd3 allele. In particular, subjects carrying the GHRd3 allele demonstrated a lower positive response to treatment with recombinant growth hormone (GH) than subjects not carrying said GHRd3 allele. Over the course of treatment with recombinant GH, subjects having ISS, IUGR, VLBW or SGA and carrying the GHRd3

28
28

had a loss in growth rates than subjects having ISS, IUGR, VLBW or SGA and not carrying the GHRd3 allele. More particularly, SGA subjects showed a loss in growth rate of about 40 %.

[0048] Indeed, 71 Children with SGA who had been enrolled in trials for treatment with recombinant GH were examined for association of the common GHR exon 3 variant and the response of growth velocity to treatment with GH. The GHRd3 allele was present in 36 patients, of which 9 were GHRd3/d3 homozygotes and 27 were GHRd3/f1 heterozygotes. After adjustment for age, sex, dose of rGH, it was found that children who carried the GHRf1 allele grew at a superior rate when treated with rGH. Growth velocity was 10.13 +/- 0.38 cm/yr after one year of therapy in children with GHRf1/f1 genotype and 9.56 +/- 0.27 cm/yr in children with GHRf1/d3 genotype, compared with 9.12 +/- 0.50 cm/yr in children with GHRd3/d3 genotypes. The genotypic groups were comparable with respect to other medical and therapeutic characteristics. The genomic variation of the GHR sequence is therefore associated with a marked difference in rGH efficiency.

[0049] As discussed above, the present invention pertains to the field of pharmacogenomics and predictive medicine in which diagnostic assays, prognostic assays, and monitoring clinical trials are used for prognostic (predictive) purposes to thereby treat an individual. Accordingly, one aspect of the present invention relates to diagnostic assays for determining GHR protein and/or nucleic acid expression, in the context of a biological sample (e.g., blood, serum, cells, tissue) to thereby determine the nature of an individual's GHR response, particularly to treatment with an exogenous GH composition. This may be useful also to detect whether an individual is afflicted with a disease or disorder, or is at risk of developing a disorder, associated with diminished GHR response or activity. Disorders or conditions involving GHR activity include short stature, obesity, infection, or diabetes; acromegaly or gigantism conditions which could be associated with lactogenic, diabetogenic, lipolytic and protein anabolic effects; conditions associated with sodium and water retention; metabolic syndromes; mood and sleep disorders, cancer, cardiac disease and hypertension. The invention also provides for prognostic (or predictive) assays for determining whether an individual is at risk of developing a disorder associated with GHR protein activity. For example, the GHRd3 and GHRf1 isoforms can be assayed in a biological sample. Such assays can be used for prognostic or predictive purpose to thereby prophylactically treat an individual prior to the onset of a disorder characterized by or associated with diminished GHR response, for example by administration of an effective amount of GH so that a subject attains an ultimate height consistent with their genetic potential. In other aspects, the invention provides methods of detecting agents that modulate GHRd3/GHRf1 heterodimer activity. Such agents may be useful in the treatment of the aforementioned conditions or disorders involving GHR activity.

Definitions.

[0050] The term "agent" is used herein to denote a chemical compound, a mixture of chemical compounds, a biological macromolecule, preferably a peptide or protein, or an extract made from biological materials such as bacteria, plants, fungi, or animal (particularly mammalian) cells or tissues.

[0051] In the context of the present invention, a "positive response" or "positive therapeutic response" to a medicament or agent can be defined as comprising a reduction of the symptoms related to a disease or condition. For example, a positive response may be an increase in height or growth rate upon administration of an agent. In the context of the present invention, a "negative response" to a medicament can be defined as comprising either a lack of positive response to the medicament, or which leads to a side-effect observed following administration of a medicament.

[0052] The term "polypeptide" refers to a polymer of amino acids without regard to the length of the polymer; thus, peptides, oligopeptides, and proteins are included within the definition of polypeptide. This term also does not specify or exclude post-expression modifications of polypeptides, for example, polypeptides which include the covalent attachment of glycosyl groups, acetyl groups, phosphate groups, lipid groups and the like are expressly encompassed by the term polypeptide. Also included within the definition are polypeptides which contain one or more analogs of an amino acid (including, for example, non-naturally occurring amino acids, amino acids which only occur naturally in an unrelated biological system, modified amino acids from mammalian systems etc.), polypeptides with substituted linkages, as well as other modifications known in the art, both naturally occurring and non-naturally occurring.

[0053] The term "recombinant polypeptide" is used herein to refer to polypeptides that have been artificially designed and which comprise at least two polypeptide sequences that are not found as contiguous polypeptide sequences in their initial natural environment, or to refer to polypeptides which have been expressed from a recombinant polynucleotide.

[0054] The term "primer" denotes a specific oligonucleotide sequence which is complementary to a target nucleotide sequence and used to hybridize to the target nucleotide sequence. A primer serves as an initiation point for nucleotide polymerization catalyzed by either DNA polymerase, RNA polymerase or reverse transcriptase.

[0055] The term "probe" denotes a defined nucleic acid segment (or nucleotide analog segment, e.g., polynucleotide as defined herein) which can be used to identify a specific polynucleotide sequence present in samples, said nucleic acid segment comprising a nucleotide sequence complementary of the specific polynucleotide sequence to be identified.

[0056] As used herein, a "test sample" refers to a biological sample obtained from a subject of interest. For example, a test sample can be a biological fluid (e.g., serum), cell sample, or tissue.

28
30

[0057] The terms "trait" and "phenotype" are used interchangeably herein and refer to any clinically distinguishable, detectable or otherwise measurable property of an organism such as symptoms of, or susceptibility to a disease for example. Typically the terms "trait" or "phenotype" are used herein to refer to an individual's response to an agent acting on GHR.

[0058] The term "genotype" as used herein refers the identity of the alleles present in an individual or a sample. In the context of the present invention a genotype preferably refers to the description of the alleles present in an individual or a sample. The term "genotyping" a sample or an individual for an allele involves determining the specific allele carried by an individual.

[0059] The term "allele" is used herein to refer to a variant of a nucleotide sequence. For example, alleles of the GHR nucleotide sequence include GHRd3 and GHRfl.

[0060] As used herein, "isoform" and "GHR isoform" refer to a polypeptide that is encoded by at least one exon of the GHR gene. Examples of a GHR isoform include GHRd3 and GHRfl polypeptides.

[0061] The term "polymorphism" as used herein refers to the occurrence of two or more alternative genomic sequences or alleles between or among different genomes or individuals. "Polymorphic" refers to the condition in which two or more variants of a specific genomic sequence can be found in a population. A "polymorphic site" is the locus at which the variation occurs. A polymorphism may comprise a substitution, deletion or insertion of one or more nucleotides. A single nucleotide polymorphism is a single base pair change.

[0062] As used herein, "exon" refers to any segment of an interrupted gene that is represented in the mature RNA product.

[0063] As used herein, "intron" refers to a segment of an interrupted gene that is not represented in the mature RNA product. Introns are part of the primary nuclear transcript but are spliced out to produce mRNA, which is then transported to the cytoplasm.

[0064] As used herein, "growth hormone" or "GH" refers to growth hormone in native-sequence or in variant form, and from any source, whether natural, synthetic, or recombinant. Examples include but are not limited to human growth hormone (hGH), which is natural or recombinant GH with the human native sequence (for example, GENOTROPIN™, somatotropin or somatropin), and recombinant growth hormone (rGH), which refers to any GH or GH variant produced by means of recombinant DNA technology, including somatrem, somatotropin, somatropin and pegvisomant. A GH molecule may be an agonist or antagonist at the GHR. In a particular embodiment, GH molecule or a variant thereof is modified, preferably is pegylated.

[0065] As used herein, "growth hormone receptor" or "GHR" refers to the growth hormone receptor in native-sequence or in variant form, and from any source, whether natural, synthetic, or

29
31

recombinant. The term "GHR" encompasses the GHRf1 as well as the GHRd3 isoforms. Examples include human growth hormone receptor (hGHR), which is natural or recombinant GHR with the human native sequence. As used herein "GHRd3" refers to an exon 3-deleted isoform of GHR. The term "GHRf1" refers to an exon 3-containing GHR isoform. The term GHRd3 includes but is not limited to the polypeptide described in Urbanek M et al, Mol Endocrinol 1992 Feb;6(2):279-87, incorporated herein by reference. The terms GHRf1 includes but is not limited to the polypeptide described in Leung et al., Nature, 330: 537-543 (1987), incorporated herein by reference.

[0066] The term "GHR gene", when used herein, encompasses genomic, mRNA and cDNA sequences encoding any GHR protein, including the untranslated regulatory regions of the genomic DNA. The term "GHR gene" also encompasses alleles of the GHR gene, such as the GHRd3 allele and the GHRf1 allele.

[0067] The term "under stringent conditions" is intended conditions under which a probe will hybridize to its target sequence to a detectably greater degree than to other sequences (e.g., at least two-fold over background). Stringent conditions are sequence-dependent and will be different in different circumstances. By controlling the stringency of the hybridization and/or washing conditions, target sequences that are 100% complementary to the probe can be identified (homologous probing). Alternatively, stringency conditions can be adjusted to allow some mismatching in sequences so that lower degrees of similarity are detected (heterologous probing). Generally, a probe is less than about 1000 nucleotides in length, preferably less than 500 nucleotides in length.

[0068] Typically, stringent conditions will be those in which the salt concentration is less than about 1.5 M Na ion, typically about 0.01 to 1.0 M Na ion concentration (or other salts) at pH 7.0 to 8.3 and the temperature is at least about 30° C for short probes (e.g., 10 to 50 nucleotides) and at least about 60° C for long probes (e.g., greater than 50 nucleotides). Stringent conditions may also be achieved with the addition of destabilizing agents such as formamide. Exemplary low stringency conditions include hybridization with a buffer solution of 30 to 35% formamide, 1 M NaCl, 1% SDS (sodium dodecyl sulphate) at 37°C, and a wash in 1x to 2xSSC (20xSSC=3.0 M NaCl/0.3 M trisodium citrate) at 50 to 55° C. Exemplary moderate stringency conditions include hybridization in 40 to 45% formamide, 1 M NaCl, 1% SDS at 37° C, and a wash in 0.5x to 1xSSC at 55 to 60° C. Exemplary high stringency conditions include hybridization in 50% formamide, 1 M NaCl, 1% SDS at 37.degree. C., and a wash in 0.1xSSC at 60 to 65° C. The duration of hybridization is generally less than about 24 hours, usually about 4 to about 12 hours.

[0069] The term "specific" or "specifically" and "selective" or "selectively" to a GHRf1 or GHRd3 allele refers to an antibody or a nucleic acid which is capable to discriminate between the two alleles. For example, an antibody or a nucleic acid specific to the GHRf1 allele will not significantly bound the GHRd3 allele. Preferably, the binding ratio of the antibody or nucleic acid is 1000:1 for GHRf1 :

36
32

GHRd3. By "not significantly" is preferably means that the binding is undetectable by currently used detection means.

[0070] The term "disease or disorder involving GHR" preferably refers to a disease and/or disorder selected from the group consisting of: growth hormone deficiency (GHD); adult growth hormone deficiency (aGHD); Turner's syndrome; short stature [among each short for gestational age (SGA), Idiopathic short stature (ISS), Very low birth weight (VLBW), and Intra uterine growth retardation' (IUGR)]; Prader-Willi syndrome (PWS); chronic renal insufficiency (CRI); AIDS wasting; Aging; end-stage Renal Failure; Cystic Fibrosis; Erectile dysfunction; HIV lipodystrophy; Fibromyalgia; Osteoporosis; Memory disorders; Depression; Crohn's disease; Skeletal dysplasias; Traumatic brain injury; Subarachnoid haemorrhage; Noonan's syndrome; Down's syndrome; End stage renal disease (ESRD); Bone marrow stem cell rescue; Metabolic syndrome; Glucocorticoid myopathy; Short stature due to glucocorticoid treatment in children; Failure of growth catching for short premature children; obesity; infection; diabetes; acromegaly or gigantism conditions which could be associated with lactogenic, diabetogenic, lipolytic and protein anabolic effects; conditions associated with sodium and water retention; mood and sleep disorders; cancer; cardiac disease and hypertension. Diseases and disorders involving GHR preferably include GHD, aGHD, SGA, ISS, VLBW, traumatic brain injury, metabolic syndrome and Noonan's syndrome.

The human GHR gene and protein

[0071] The human GHR gene is a single copy gene that spans 90kb of the 5p13-12 chromosomal region. It contains nine coding exons (numbered 2-10) and several untranslated exons: exon 2 codes for the signal peptide, exons 3 to 7 encode the extracellular domain, exon 8 encodes the transmembrane domain and exons 9 and 10 encode the cytoplasmic domain. As discussed above, the hGHRd3 protein differs from the hepatic hGHR by a deletion of 22 amino acids within the extracellular domain of the receptor Godowski et al (1989). Genbank accession number AF155812, the disclosure of which sequence is incorporated herein by reference, provides the nucleotide sequence of the genomic DNA region surrounding exon 3 of the GHR gene (e.g. GHRfl allele). This 6.8 bp fragment comprising exon 3 and a portion of introns 2 and 3 also comprises two 251 bp repeat elements. These repeat elements flank exon 3, with the 5' and 3' repeated elements located 577 bp upstream and 1821 bp downstream of the exon. The elements are composed of a 171 bp long terminal repeat (LTR) fragment from a human endogenous retrovirus which belongs to the HERV-P family (Boeke, J. D., and Stoye, J. P. (1997) in *Retroviruses* (Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E., eds), pp. 343-435, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). The LTR is followed by a 80bp from a medium reiteration frequency MER4-type sequence (Smit, A. F. (1996) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 743-748). The sequence of the two 251 bp-long copies referred to as 5' and 3' repeat are 99% identical, differing in only three nucleotides at position 14, 245 and 246 of the repeat. In particular, as reported by Pantel et al (2000), the element located upstream from exon 3 carries a cytosine at position 14 and a thymine at positions 245 and 246, whereas the element located

downstream of exon 3 carries a guanine, a cytosine and an adenine at these positions. Furthermore, other sequences of viral origin are found flanking exon 3.

[0072] The GHRd3 allele comprises a deletion of exon 3 and surrounding portions of introns 2 and 3. Unlike the GHRf1 allele, the GHRd3 allele contains a single 251 bp LTR which is identical in sequence to the LTR element to the 3' copy identified on GHRf1 alleles. The genomic DNA sequence of the GHRd3 allele in the region of the deleted exon 3 is shown in Genbank accession number AF210633, the disclosure of which sequence is incorporated herein by reference. Based on the GHRd3 and GHRf1 sequence, known methods for detecting GHR nucleic acids or polypeptides can be used to determine whether an individual carries a GHRd3 allele.

[0073] The GHRd3 protein containing a deletion of exon 3 differs from the full length hGHR (GHRf1) by a deletion of 22 amino acids within the extracellular domain of the receptor. Any known method can thus be used to detect the presence of a GHRd3 or GHRf1 protein. GHRd3 and GHRf1 may also be detected in their untruncated form, or in truncated form, as a "high-affinity growth hormone binding protein", "high-affinity GHBP" or "GHBP", referring to the extracellular domain of the GHR that circulates in blood and functions as a GHBP in several species (Ymer and Herington, (1985) Mol. Cell. Endocrinol. 41: 153; Smith and Talamantes, (1988) Endocrinology, 123: 1489-1494; Emtner and Roos, Acta Endocrinologica (Copenh.), 122: 298-302 (1990), including man. Baumann et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 62: 134-141 (1986); EP 366,710; Herington et al., J. Clin. Invest., 77: 1817-1823 (1986); Leung et al., Nature, 330: 537-543 (1987). Various methods exist for measuring functional GHBP in serum are available, with the preferred method being a ligand-mediated immunofunctional assay (LIFA) described in U.S. Pat. No. 5,210,017 and further herein.

GHRd3 and/or GHRf1 in Diagnostics, Therapy and Pharmacogenetics

[0074] The invention thus provides methods of detecting and diagnosing diminished GHR response or GHR activity in an individual who is homozygous or heterozygous for the GHRd3 allele. Diminished GHR activity can be the result for example of diminished GHR levels, expression or protein activity. Also provided are methods of detecting and diagnosing increased GHR response or GHR activity in an individual who is homozygous or heterozygous for the GHRf1 allele. Detecting increased or diminished GHR activity is predicted to be useful in the treatment of a variety of disorders treatable using therapeutic agents that act via the GHR pathway. Preferably, said disorder is a disease or a disorder involving GHR. Examples include treatment of short stature (e.g. preferably ISS, IUGR, VLBW, or SGA), obesity, infection, or diabetes; acromegaly or gigantism conditions which could be associated with lactogenic, diabetogenic, lipolytic and protein anabolic effects; conditions associated with sodium and water retention; metabolic syndromes; mood and sleep disorders, cancer, cardiac disease and hypertension. Preferred examples include agents that bind the GHR protein such as recombinant GH compositions acting as GHR agonists or antagonists.

[0075] In preferred embodiments, the invention involves determining whether a subject expresses a GHR allele associated with an increased or decreased response to treatment or with an increased or decreased GHR activity. Determining whether a subject expresses a GHR allele can be carried out by detecting a GHR protein or nucleic acid.

[0076] Preferably, the methods of treating, diagnosing or assessing a subject comprise assessing or determining whether a subject expresses a GHRd3 and/or GHRf1 allele, e.g. determining whether a subject is a homozygote for the GHRf1 allele (GHRf1/f1), a homozygote for the GHRd3 allele (GHRd3/d3), or a heterozygote (GHRd3/f1). The invention thus preferably involves determining whether GHRd3 and/or GHRf1 is expressed within a biological sample comprising:

- a) contacting said biological sample with:
 - i) a polynucleotide that hybridizes under stringent conditions specifically to a GHRd3 nucleic acid and/or a polynucleotide that hybridizes under stringent conditions specifically to a GHRf1 nucleic acid; or
 - ii) a detectable polypeptide that selectively binds to a GHRd3 polypeptide and/or a detectable polypeptide that selectively binds to a GHRf1 polypeptide; and
- b) detecting the presence or absence of hybridization between said polynucleotide and an RNA species within said sample, or the presence or absence of binding of said detectable polypeptide to a polypeptide within said sample.

[0077] A detection of said hybridization with the polynucleotide specific to a GHRd3 nucleic acid or of said binding of the GHRd3-selective polypeptide indicates that said GHRd3 allele or isoform is expressed within said sample. Similarly, a detection of said hybridization with the polynucleotide specific to a GHRf1 nucleic acid or of said binding of the GHRf1-selective polypeptide indicates that said GHRf1 allele or isoform is expressed within said sample. Preferably, the polynucleotide is a primer, and wherein said hybridization is detected by detecting the presence of an amplification product comprising said primer sequence, or the detectable polypeptide is an antibody. Preferably, said amplification product is detected by a polyacrylamide electrophoresis followed by ethidium bromide and/or silver staining. In a more preferred embodiment, said amplification product is analyzed by two separated polyacrylamide electrophoresis, wherein a first electrophoresis is stained by ethidium bromide and a second one by silver staining.

[0078] An exemplary method for detecting the presence or absence of the GHRd3 protein or nucleic acid in a biological sample involves obtaining a biological sample from a test subject and contacting the biological sample with a compound or an agent capable of detecting GHRd3 protein or nucleic acid (e.g., mRNA, genomic DNA) that encodes GHRd3 protein such that the presence of GHRd3 protein or nucleic acid is detected in the biological sample. A preferred agent for detecting GHRd3 mRNA or genomic DNA is a labeled nucleic acid probe capable of hybridizing to GHRd3 mRNA or genomic DNA. The nucleic acid probe can be, for example, a human nucleic acid, or a

33
35

portion thereof, such as an oligonucleotide of at least 15, 30, 50, 100, 250 or 500 nucleotides in length and sufficient to specifically hybridize under stringent conditions to GHRd3 mRNA or genomic DNA. Other suitable probes for use in the diagnostic assays of the invention are described herein.

[0079] Similarly, an exemplary method for detecting the presence or absence of the GHRf1 protein or nucleic acid in a biological sample involves obtaining a biological sample from a test subject and contacting the biological sample with a compound or an agent capable of detecting GHRf1 protein or nucleic acid (e.g., mRNA, genomic DNA) that encodes GHRf1 protein such that the presence of GHRf1 protein or nucleic acid is detected in the biological sample. A preferred agent for detecting GHRf1 mRNA or genomic DNA is a labeled nucleic acid probe capable of hybridizing to GHRf1 mRNA or genomic DNA. The nucleic acid probe can be, for example, a human nucleic acid, or a portion thereof, such as an oligonucleotide of at least 15, 30, 50, 100, 250 or 500 nucleotides in length and sufficient to specifically hybridize under stringent conditions to GHRf1 mRNA or genomic DNA. Other suitable probes for use in the diagnostic assays of the invention are described herein.

[0080] A preferred agent for detecting the GHRd3 protein is an antibody capable of specifically binding to the GHRd3 protein. A preferred agent for detecting the GHRf1 protein is an antibody capable of specifically binding to the GHRf1 protein. Preferably the antibody has a detectable label. Antibodies can be polyclonal, or more preferably, monoclonal. An intact antibody, or a fragment thereof (e.g., Fab or F(ab')₂) can be used. The term "labeled", with regard to the probe or antibody, is intended to encompass direct labeling of the probe or antibody by coupling (i.e., physically linking) a detectable substance to the probe or antibody, as well as indirect labeling of the probe or antibody by reactivity with another reagent that is directly labeled. Examples of indirect labeling include detection of a primary antibody using a fluorescently labeled secondary antibody and end-labeling of a DNA probe with biotin such that it can be detected with fluorescently labeled streptavidin.

[0081] The term "biological sample" is intended to include tissues, cells and biological fluids isolated from a subject, as well as tissues, cells and fluids present within a subject. That is, the detection method of the invention can be used to detect candidate mRNA, protein, or genomic DNA in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. For example, *in vitro* techniques for detection of candidate mRNA include Northern hybridizations and *in situ* hybridizations. *In vitro* techniques for detection of the candidate protein include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), Western blots, immunoprecipitations and immunofluorescence. *In vitro* techniques for detection of candidate genomic DNA include Southern hybridizations. Furthermore, *in vivo* techniques for detection of the GHRd3 or GHRf1 protein include introducing into a subject a labeled anti- antibody. For example, the antibody can be labeled with a radioactive marker whose presence and location in a subject can be detected by standard imaging techniques.

[0082] In one embodiment, the biological sample contains protein molecules from the test subject. Alternatively, the biological sample can contain mRNA molecules from the test subject or genomic

3A
3b

DNA molecules from the test subject. A preferred biological sample is a serum sample isolated by conventional means from a subject.

[0083] The invention also encompasses kits for detecting the presence of the GHRd3 and/or GHRf1 protein, mRNA, or genomic DNA in a biological sample. For example, the kit can comprise a labeled compound or agent capable of detecting GHRd3 protein or mRNA in a biological sample and/or a labeled compound or agent capable of detecting GHRf1 protein or mRNA in a biological sample; means for determining the amount of GHRd3 and/or GHRf1 protein or mRNA in the sample; and means for comparing the amount of GHRd3 and/or GHRf1 protein, mRNA, or genomic DNA in the sample with a standard. The compound or agent can be packaged in a suitable container. The kit can further comprise instructions for using the kit to detect GHRd3 and/or GHRf1 protein or nucleic acid.

[0084] Most preferably, the assays described herein, such as the preceding diagnostic assays or the following assays, can be utilized to identify a subject having or at risk of developing diminished GHR response. In particular, a GHRd3 homozygous or heterozygous subject is identified as having or at risk of developing a diminished GHR response. In other aspects, the diagnostic methods described herein may be utilized to identify subjects having or at risk of developing a disease, disorder or trait associated with aberrant or more particularly decreased GHR levels, expression or activity. For example, the assays described herein, such as the preceding diagnostic assays or the following assays, can be utilized to identify a subject having or at risk of developing a trait associated with decreased GHR levels, expression or activity. In another example, the assays described herein can be utilized to identify a subject having or at risk of developing a trait associated with decreased GHR levels, expression or activity. As discussed, a GHRf1/f1 homozygote and a GHRf1/d3 heterozygote are expected to have increased GHR response or GHR activity compared to a GHRd3/d3 homozygote. Similarly, a GHRf1/f1 homozygote is expected to have increased GHR response or GHR activity compared to a GHRf1/d3 heterozygote.

[0085] The prognostic assays described herein can be used to determine whether and/or according to which administration regimen a subject is to be administered an agent which acts through the GHR pathway to treat a disease or disorder. Thus, the present invention provides methods for determining whether a subject can be effectively treated with an agent which acts through the GHR pathway in which a test sample is obtained and GHRd3 and/or GHRf1 protein or nucleic acid expression or activity is detected. Optionally, only GHRf1 protein or nucleic acid expression or activity is detected. Alternatively, only GHRd3 protein or nucleic acid expression or activity is detected. Both GHRd3 and GHRf1 protein or nucleic acid expression or activity can also be detected. As discussed, a subject displaying the GHRd3 protein or nucleic acid is expected to have a decreased positive response to said agent relative to a subject not displaying the GHRd3 protein or nucleic acid.

[0086] In large part because the administration of agents that act through GHR-mediated pathways can be adapted to subjects having higher or lower responsiveness to the agent, the

35
37

detection of susceptibility to diminished GHR activity in individuals is very important. Said agents need not necessarily act directly on the GHR protein, but may act upstream of the GHR protein, for example acting on another molecule which ultimately interacts with the GHR protein. In a preferred embodiment, the agent is an agent that acts directly on the GHR protein. Most preferably, the agent is an agent that binds the GHR protein and acts either as an agonist or an antagonist. Most preferably the agent is a GH protein or a variant thereof capable of activating the GHR protein such as somatropin. In other embodiments, the agent is a GH protein capable of binding but not activating the GHR protein, such as pegvisomant.

[0087] A DNA sample is obtained from the individual to be tested to determine whether the DNA encodes a GHRd3 protein and/or a GHRf1 protein. The DNA sample is analyzed to determine whether it comprises the GHRd3 sequence and/or the GHRf1 sequence. DNA encoding a GHRd3 protein will be associated with a diminished positive response to treatment with the medicament, and lack of DNA encoding GHRd3 alleles is associated with a greater positive response when compared to GHRd3 individuals.

[0088] The methods of the invention can will also be useful in assessing and conducting clinical trials of medicaments. The methods accordingly comprise identifying a first population of individuals who respond positively to said medicament and a second population of individuals who respond negatively to said medicament or whose positive response to said medicament is diminished in comparison to said first population of individuals. In one embodiment, the medicament may be administered to the subject in a clinical trial if the DNA sample contains alleles of one or more alleles associated with a positive response to treatment with the medicament and/or if the DNA sample lacks alleles of one or more alleles associated with a negative or decreased positive response to treatment with the medicament. In another aspect, the medicament may be administered to the subject in a clinical trial if the DNA sample contains alleles of one or more alleles associated with a negative or decreased positive response to treatment with the medicament and/or if the DNA sample lacks alleles of one or more alleles associated with a positive or increased positive response to treatment with the medicament.

[0089] Thus, using the method of the present invention, drug efficacy can be assessed by taking account of differences in GHR response among drug trial subjects. If desired, a trial for evaluation of drug efficacy may be conducted in a population comprised substantially of individuals likely to respond favorably to the medicament, or in a population comprised substantially of individuals likely to respond less favorably to the medicament than another population. For example, a GH protein-containing composition may be evaluated in either a population of GHRd3 individuals or in a population of GHRf1 individuals. In another aspect, a medicament designed to treat individuals suffering from diminished GH response may be evaluated advantageously in a population of GHRd3 individuals.

Detecting GHRd3 and GHRfl

[0090] It is contemplated that other mutations in the GHR gene may be identified in accordance with the present invention by detecting a nucleotide change in particular nucleic acids (U.S. Pat. No. 4,988,617, incorporated herein by reference). A variety of different assays are contemplated in this regard, including but not limited to, fluorescent in situ hybridization (FISH; U.S. Pat. No. 5,633,365 and U.S. Pat. No. 5,665,549, each incorporated herein by reference), direct DNA sequencing, PFGE analysis, Southern or Northern blotting, single-stranded conformation analysis (SSCA), RNase protection assay, allele-specific oligonucleotide (ASO e.g., U.S. Pat. No. 5,639,611), dot blot analysis, denaturing gradient gel electrophoresis (e.g., U.S. Pat. No. 5,190,856 incorporated herein by reference), RFLP (e.g., U.S. Pat. No. 5,324,631 incorporated herein by reference) and PCR-SSCP. Methods for detecting and quantitating gene sequences in for example biological fluids are described in U.S. Pat. No. 5,496,699, incorporated herein by reference.

Primers and Probes

[0091] The term primer, as defined herein, is meant to encompass any nucleic acid that is capable of priming the synthesis of a nascent nucleic acid in a template-dependent process. Typically, primers are oligonucleotides from ten to twenty base pairs in length, but longer sequences can be employed. Primers may be provided in double-stranded or single-stranded form, although the single-stranded form is preferred. Probes are defined differently, although they may act as primers. Probes, while perhaps capable of priming, are designed to binding to the target DNA or RNA and need not be used in an amplification process.

[0092] SEQ ID NOs 3 and 4 provide the genomic DNA sequences surrounding exon 3 or the site of the exon 3 deletion in the GHR gene, respectively. A GHRfl cDNA sequence is shown in SEQ ID NO 1. Any difference in nucleotide sequence between the GHRd3 and GHRfl alleles may be used in the methods of the invention in order to detect and distinguish the particular GHR allele in an individual. To identify a GHRfl genomic DNA or cDNA molecule, a primer may be designed which hybridizes to an exon 3 nucleic acid. To identify a GHRd3 genomic DNA, a primer or probe may be designed such that it spans the junction of introns 2 and 3 of the GHR gene as found in the genomic DNA sequence of the GHRd3 allele, thereby distinguishing between the GHRfl allele which contains exon 3 and the GHRd3 allele which does not contain exon 3. In another example, a GHRd3 cDNA molecule may be identified by designing a primer or probe that spans the junction of exons 2 and 4, thereby distinguishing between an GHRfl cDNA molecule which contains exon 3 and a GHRd3 cDNA molecule which does not contain exon 3. Other examples of suitable primers for detection GHRd3 are listed in Pantel et al. (supra) and in Example 1 below.

[0093] The present invention encompasses polynucleotides for use as primers and probes in the methods of the invention. These polynucleotides may consist of, consist essentially of, or comprise a contiguous span of nucleotides of a sequence from any sequence provided herein as well as

sequences which are complementary thereto ("complements thereof"). The "contiguous span" may be at least 25, 35, 40, 50, 70, 80, 100, 250, 500 or 1000 nucleotides in length, to the extent that a contiguous span of these lengths is consistent with the lengths of the particular Sequence ID. It should be noted that the polynucleotides of the present invention are not limited to having the exact flanking sequences surrounding a target sequence of interest, which are enumerated in the Sequence Listing. Rather, it will be appreciated that the flanking sequences surrounding the polymorphisms, or any of the primers or probes of the invention which, are more distant from the markers, may be lengthened or shortened to any extent compatible with their intended use and the present invention specifically contemplates such sequences. It will be appreciated that the polynucleotides referred to herein may be of any length compatible with their intended use. Also the flanking regions outside of the contiguous span need not be homologous to native flanking sequences which actually occur in human subjects. The addition of any nucleotide sequence, which is compatible with the nucleotides intended use is specifically contemplated. Preferred polynucleotides may consist of, consist essentially of, or comprise a contiguous span of nucleotides of a sequence from SEQ ID No 1, 3 or 4 as well as sequences which are complementary thereto. The "contiguous span" may be at least 8, 10, 12, 15, 50, 70, 80, 100, 250, 500 or 1000 nucleotides in length.

[0094] The probes of the present invention may be designed from the disclosed sequences for any method known in the art, particularly methods which allow for testing if a particular sequence or marker disclosed herein is present. A preferred set of probes may be designed for use in the hybridization assays of the invention in any manner known in the art such that they selectively bind to one allele of a polymorphism, but not the other under any particular set of assay conditions.

[0095] Any of the polynucleotides of the present invention can be labeled, if desired, by incorporating a label detectable by spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical, or chemical means. For example, useful labels include radioactive substances, fluorescent dyes or biotin. Preferably, polynucleotides are labeled at their 3' and 5' ends. A label can also be used to capture the primer, so as to facilitate the immobilization of either the primer or a primer extension product, such as amplified DNA, on a solid support. A capture label is attached to the primers or probes and can be a specific binding member which forms a binding pair with the solid phase reagent's specific binding member (e. g. biotin and streptavidin). Therefore depending upon the type of label carried by a polynucleotide or a probe, it may be employed to capture or to detect the target DNA. Further, it will be understood that the polynucleotides, primers or probes provided herein, may, themselves, serve as the capture label. For example, in the case where a solid phase reagent's binding member is a nucleic acid sequence, it may be selected such that it binds a complementary portion of a primer or probe to thereby immobilize the primer or probe to the solid phase. In cases where a polynucleotide probe itself serves as the binding member, those skilled in the art will recognize that the probe will contain a sequence or "tail" that is not complementary to the target. In the case where a polynucleotide primer itself serves as the capture label, at least a portion of the primer

will be free to hybridize with a nucleic acid on a solid phase. DNA Labeling techniques are well known to the skilled technician.

[0096] Any of the polynucleotides, primers and probes of the present invention can be conveniently immobilized on a solid support. Solid supports are known to those skilled in the art and include the walls of wells of a reaction tray, test tubes, polystyrene beads, magnetic beads, nitrocellulose strips, membranes, microparticles such as latex particles, sheep (or other animal) red blood cells, duracytes) and others. The solid support is not critical and can be selected by one skilled in the art. Thus, latex particles, microparticles, magnetic or non-magnetic beads, membranes, plastic tubes, walls of microtiter wells, glass or silicon chips, sheep (or other suitable animal's) red blood cells and duracytes are all suitable examples. Suitable methods for immobilizing nucleic acids on solid phases include ionic, hydrophobic, covalent interactions and the like. A solid support, as used herein, refers to any material which is insoluble, or can be made insoluble by a subsequent reaction. The solid support can be chosen for its intrinsic ability to attract and immobilize the capture reagent. Alternatively, the solid phase can retain an additional receptor which has the ability to attract and immobilize the capture reagent. The additional receptor can include a charged substance that is oppositely charged with respect to the capture reagent itself or to a charged substance conjugated to the capture reagent. As yet another alternative, the receptor molecule can be any specific binding member which is immobilized upon (attached to) the solid support and which has the ability to immobilize the capture reagent through a specific binding reaction. The receptor molecule enables the indirect binding of the capture reagent to a solid support material before the performance of the assay or during the performance of the assay. The solid phase thus can be a plastic, derivatized plastic, magnetic or non-magnetic metal, glass or silicon surface of a test tube, microtiter well, sheet, bead, microparticle, chip, sheep (or other suitable animal's) red blood cells, duracytes and other configurations known to those of ordinary skill in the art. The polynucleotides of the invention can be attached to or immobilized on a solid support individually or in groups of at least 2, 5, 8, 10, 12, 15, 20, or 25 distinct polynucleotides of the inventions to a single solid support. In addition, polynucleotides other than those of the invention may be attached to the same solid support as one or more polynucleotides of the invention.

[0097] Any polynucleotide provided herein may be attached in overlapping areas or at random locations on the solid support. Alternatively the polynucleotides of the invention may be attached in an ordered array wherein each polynucleotide is attached to a distinct region of the solid support which does not overlap with the attachment site of any other polynucleotide. Preferably, such an ordered array of polynucleotides is designed to be "addressable" where the distinct locations are recorded and can be accessed as part of an assay procedure. Addressable polynucleotide arrays typically comprise a plurality of different oligonucleotide probes that are coupled to a surface of a substrate in different known locations. The knowledge of the precise location of each polynucleotides location makes these "addressable" arrays particularly useful in hybridization assays. Any addressable array technology known in the art can be employed with the polynucleotides of the invention. One particular embodiment

39
41

of these polynucleotide arrays is known as the Genechips, and has been generally described in US Patent 5, 143, 854; PCT publications WO 90/15070 and 92/10092. These arrays may generally be produced using mechanical synthesis methods or light directed synthesis methods, which incorporate a combination of photolithographic methods and solid phase oligonucleotide synthesis (Fodor et al., Science, 251: 767-777, 1991). The immobilization of arrays of oligonucleotides on solid supports has been rendered possible by the development of a technology generally identified as "Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis" (VLSIPS) in which, typically, probes are immobilized in a high density array on a solid surface of a chip. Examples of VLSIPS technologies are provided in US Patents 5, 143, 854 and 5, 412, 087 and in PCT Publications WO 90/15070, WO 92/10092 and WO 95/11995, which describe methods for forming oligonucleotide arrays through techniques such as light directed synthesis techniques. In designing strategies aimed at providing arrays of nucleotides immobilized on solid supports, further presentation strategies were developed to order and display the oligonucleotide arrays on the chips in an attempt to maximize hybridization patterns and sequence information. Examples of such presentation strategies are disclosed in PCT Publications WO 94/12305, WO 94/11530, WO 97/29212 and WO 97/31256.

Template Dependent Amplification Methods

[0098] A number of template dependent processes are available to amplify the marker sequences present in a given template sample. One of the best known amplification methods is the polymerase chain reaction (referred to as PCR) which is described in detail in U.S. Pat. No. Nos. 4,683,195, 4,683,202 and 4,800,159, and in Innis et al., PCR Protocols, Academic Press, Inc. San Diego Calif., 1990., each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

[0099] Briefly, in PCR, two primer sequences are prepared that are complementary to regions on opposite complementary strands of the marker sequence. An excess of deoxynucleoside triphosphates are added to a reaction mixture along with a DNA polymerase, e.g., Taq polymerase. If the marker sequence is present in a sample, the primers will bind to the marker and the polymerase will cause the primers to be extended along the marker sequence by adding on nucleotides. By raising and lowering the temperature of the reaction mixture, the extended primers will dissociate from the marker to form reaction products, excess primers will bind to the marker and to the reaction products and the process is repeated.

[00100] A reverse transcriptase PCR amplification procedure may be performed in order to quantify the amount of mRNA amplified. Methods of reverse transcribing RNA into cDNA are well known and described in Sambrook et al., In: Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Alternative methods for reverse transcription utilize thermostable, RNA-dependent DNA polymerases. These methods are described in WO 90/07641. Polymerase chain reaction methodologies are well known in the art.

40
42

[00101] Another method for amplification is the ligase chain reaction ("LCR" U.S. Pat. Nos. 5,484,810, 5,484,689, EPO No. 320 308, each incorporated herein by reference). In LCR, two complementary probe pairs are prepared, and in the presence of the target sequence, each pair will bind to opposite complementary strands of the target such that they abut. In the presence of a ligase, the two probe pairs will link to form a single unit.

[00102] By temperature cycling, as in PCR, bound ligated units dissociate from the target and then serve as "target sequences" for ligation of excess probe pairs. U.S. Pat. No. 4,883,750 describes a method similar to LCR for binding probe pairs to a target sequence.

[00103] Qbeta Replicase, an RNA-directed RNA polymerase, can be used as yet another amplification method in the present invention. In this method, a replicative sequence of RNA that has a region complementary to that of a target is added to a sample in the presence of an RNA polymerase. The polymerase will copy the replicative sequence that can then be detected. Similar methods also are described in U.S. Pat. No. 4,786,600, incorporated herein by reference, which concerns recombinant RNA molecules capable of serving as a template for the synthesis of complementary single-stranded molecules by RNA-directed RNA polymerase. The product molecules so formed also are capable of serving as a template for the synthesis of additional copies of the original recombinant RNA molecule.

[00104] An isothermal amplification method, in which restriction endonucleases and ligases are used to achieve the amplification of target molecules that contain nucleotide 5'-[alpha-thio]-triphosphates in one strand of a restriction site also may be useful in the amplification of nucleic acids in the present invention (Walker et al, (1992), Proc. Nat'l Acad Sci. USA, 89:392-396; U.S. Pat. No. 5,270,184 incorporated herein by reference). U.S. Pat. No. 5,747,255 (incorporated herein by reference) describes an isothermal amplification using cleavable oligonucleotides for polynucleotide detection. In the method described therein, separated populations of oligonucleotides are provided that contain complementary sequences to one another and that contain at least one scissile linkage which is cleaved whenever a perfectly matched duplex is formed containing the linkage. When a target polynucleotide contacts a first oligonucleotide cleavage occurs and a first fragment is produced which can hybridize with a second oligonucleotide. Upon such hybridization, the second oligonucleotide is cleaved releasing a second fragment that can, in turn, hybridize with a first oligonucleotide in a manner similar to that of the target polynucleotide.

[00105] Strand Displacement Amplification (SDA) is another method of carrying out isothermal amplification of nucleic acids which involves multiple rounds of strand displacement and synthesis, i.e., nick translation (e.g., U.S. Pat. Nos. 5,744,311; 5,733,752; 5,733,733; 5,712,124). A similar method, called Repair Chain Reaction (RCR), involves annealing several probes throughout a region targeted for amplification, followed by a repair reaction in which only two of the four bases are present. The other two bases can be added as biotinylated derivatives for easy detection. A similar approach is used in SDA. Target specific sequences can also be detected using a cyclic probe reaction (CPR). In

47
43

CPR, a probe having 3' and 5' sequences of non-specific DNA and a middle sequence of specific RNA is hybridized to DNA that is present in a sample. Upon hybridization, the reaction is treated with RNase H, and the products of the probe identified as distinctive products that are released after digestion. The original template is annealed to another cycling probe and the reaction is repeated.

[00106] Still another amplification methods described in GB Application No. 2 202 328, and in PCT Application No. PCT/US89/01025, each of which is incorporated herein by reference in its entirety, may be used in accordance with the present invention. In the former application, "modified" primers are used in a PCR-like, template-and enzyme-dependent synthesis. The primers may be modified by labeling with a capture moiety (e.g., biotin) and/or a detector moiety (e.g., enzyme). In the latter application, an excess of labeled probes are added to a sample. In the presence of the target sequence, the probe binds and is cleaved catalytically. After cleavage, the target sequence is released intact to be bound by excess probe. Cleavage of the labeled probe signals the presence of the target sequence.

[00107] Other nucleic acid amplification procedures include transcription-based amplification systems (TAS), including nucleic acid sequence based amplification (NASBA) and 3SR (Kwok et al., (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86: 1173; and WO 88/10315, incorporated herein by reference in their entirety). In NASBA, the nucleic acids can be prepared for amplification by standard phenol/chloroform extraction, heat denaturation of a clinical sample, treatment with lysis buffer and minispin columns for isolation of DNA and RNA or guanidinium chloride extraction of RNA. These amplification techniques involve annealing a primer which has target specific sequences. Following polymerization, DNA/RNA hybrids are digested with RNase H while double stranded DNA molecules are heat denatured again. In either case the single stranded DNA is made fully double stranded by addition of second target specific primer, followed by polymerization. The double-stranded DNA molecules are then multiply transcribed by an RNA polymerase such as T7 or SP6. In an isothermal cyclic reaction, the RNA's are reverse transcribed into single stranded DNA, which is then converted to double stranded DNA, and then transcribed once again with an RNA polymerase such as T7 or SP6. The resulting products, whether truncated or complete, indicate target specific sequences.

[00108] Davey et al., EPO No. 329 822 (incorporated herein by reference in its entirety) disclose a nucleic acid amplification process involving cyclically synthesizing single-stranded RNA ("ssRNA"), ssDNA; and double-stranded DNA (dsDNA), which may be used in accordance with the present invention. The ssRNA is a template for a first primer oligonucleotide, which is elongated by reverse transcriptase (RNA-dependent DNA polymerase). The RNA is then removed from the resulting DNA:RNA duplex by the action of ribonuclease H (RNase H, an RNase specific for RNA in duplex with either DNA or RNA). The resultant ssDNA is a template for a second primer, which also includes the sequences of an RNA polymerase promoter (exemplified by T7 RNA polymerase) 5' to its homology to the template. This primer is then extended by DNA polymerase (exemplified by the large "Klenow" fragment of E. coli DNA polymerase I), resulting in a double-stranded DNA ("dsDNA") molecule, having

A2
44

a sequence identical to that of the original RNA between the primers and having additionally, at one end, a promoter sequence. This promoter sequence can be used by the appropriate RNA polymerase to make many RNA copies of the DNA. These copies can then re-enter the cycle leading to very swift amplification. With proper choice of enzymes, this amplification can be done isothermally without addition of enzymes at each cycle. Because of the cyclical nature of this process, the starting sequence can be chosen to be in the form of either DNA or RNA.

[00109] PCT Application WO 88/06700 (Incorporated herein by reference in its entirety) disclose a nucleic acid sequence amplification scheme based on the hybridization of a promoter/primer sequence to a target single-stranded DNA ("ssDNA") followed by transcription of many RNA copies of the sequence. This scheme is not cyclic, i.e., new templates are not produced from the resultant RNA transcripts. Other amplification methods include "RACE" and "one-sided PCR" (Frohman,, In: PCR Protocols. A Guide To Methods And Applications, Academic Press, N.Y., 1990.; and O'hara et al., (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86: 5673-5677; each herein incorporated by reference in their entirety).

[00110] Methods based on ligation of two (or more) oligonucleotides in the presence of nucleic acid having the sequence of the resulting "di-oligonucleotide", thereby amplifying the di-oligonucleotide, also may be used in the amplification step of the present invention. (Wu et al., (1989) Genomics, 4:580, incorporated herein by reference).

Southern/Northern Blotting

[00111] Blotting techniques are well known to those of skill in the art. Southern blotting involves the use of DNA as a target, whereas Northern blotting involves the use of RNA as a target. Each provide different types of information, although cDNA blotting is analogous, in many aspects, to blotting of RNA species.

[00112] Briefly, a probe is used to target a DNA or RNA species that has been immobilized on a suitable matrix, often a filter of nitrocellulose. The different species should be spatially separated to facilitate analysis. This often is accomplished by gel electrophoresis of nucleic acid species followed by "blotting" on to the filter.

[00113] Subsequently, the blotted target is incubated with a probe (usually labeled) under conditions that promote denaturation and rehybridization. Because the probe is designed to base pair with the target, the probe will bind a portion of the target sequence under renaturing conditions. Unbound probe is then removed, and detection is accomplished as described above.

Separation Methods

[00114] It normally is desirable, at one stage or another, to separate the amplification product from the template and the excess primer for the purpose of determining whether specific amplification has

43
45

occurred. In one embodiment, amplification products are separated by agarose, agarose-acrylamide or polyacrylamide gel electrophoresis using standard methods. See Sambrook et al., 1989.

[00115] Alternatively, chromatographic techniques may be employed to effect separation. There are many kinds of chromatography which may be used in the present invention: adsorption, partition, ion-exchange and molecular sieve, and many specialized techniques for using them including column, paper, thin-layer and gas chromatography (Freifelder. *Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed. Wm. Freeman and Co., New York, N.Y., 1982.

Detection Methods

[00116] Products may be visualized in order to confirm amplification of the marker sequences. One typical visualization method involves staining of a gel with ethidium bromide and visualization under UV light. Alternatively, if the amplification products are integrally labeled with radio- or fluorometrically-labeled nucleotides, the amplification products can then be exposed to x-ray film or visualized under the appropriate stimulating spectra, following separation.

[00117] In one embodiment, visualization is achieved indirectly. Following separation of amplification products, a labeled nucleic acid probe is brought into contact with the amplified marker sequence. The probe preferably is conjugated to a chromophore but may be radiolabeled. In another embodiment, the probe is conjugated to a binding partner, such as an antibody or biotin, and the other member of the binding pair carries a detectable moiety.

[00118] In one embodiment, detection is by a labeled probe. The techniques involved are well known to those of skill in the art and can be found in many standard books on molecular protocols. See Sambrook et al., 1989. For example, chromophore or radiolabel probes or primers identify the target during or following amplification.

[00119] One example of the foregoing is described in U.S. Pat. No. 5,279,721, incorporated herein by reference, which discloses an apparatus and method for the automated electrophoresis and transfer of nucleic acids. The apparatus permits electrophoresis and blotting without external manipulation of the gel and is ideally suited to carrying out methods according to the present invention.

[00120] In addition, the amplification products described above may be subjected to sequence analysis to identify specific kinds of variations using standard sequence analysis techniques. Within certain methods, exhaustive analysis of genes is carried out by sequence analysis using primer sets designed for optimal sequencing (Pignon et al, (1994) *Hum. Mutat.*, 3:128-132, 1994). The present invention provides methods by which any or all of these types of analyses may be used. Using the sequences disclosed herein, oligonucleotide primers may be designed to permit the amplification of sequences throughout the GHR gene that may then be analyzed by direct sequencing.

QA
ub

[00121] Any of a variety of sequencing reactions known in the art can be used to directly sequence the GHR gene by comparing the sequence of the sample with the corresponding wild-type (control) sequence. Examples of sequencing reactions include those based on techniques developed by Maxam and Gilbert ((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560) or Sanger ((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463). It is also contemplated that any of a variety of automated sequencing procedures can be utilized when performing the diagnostic assays.

Kit Components

[00122] All the essential materials and reagents required for detecting and sequencing GHR and variants thereof may be assembled together in a kit. This generally will comprise preselected primers and probes. Also included may be enzymes suitable for amplifying nucleic acids including various polymerases (RT, Taq, Sequenase™ etc.), deoxynucleotides and buffers to provide the necessary reaction mixture for amplification. Such kits also generally will comprise, in suitable means, distinct containers for each individual reagent and enzyme as well as for each primer or probe.

Design and Theoretical Considerations for Relative Quantitative RT-PCR™.

[00123] Reverse transcription (RT) of RNA to cDNA followed by relative quantitative PCR (RT-PCR) can be used to determine the relative concentrations of specific mRNA species isolated from subjects. By determining that the concentration of a specific mRNA species varies, it is shown that the gene encoding the specific mRNA species is differentially expressed. Quantitative PCR may be useful for example in examining relative levels of GHRd3 and GHRfl mRNA in subjects to be treated with an agent acting via the GHR pathway, in a subject suspected of suffering from diminished GHR activity, or preferably suffering from short stature, obesity, infection, or diabetes; acromegaly or gigantism conditions which could be associated with lactogenic, diabetogenic, lipolytic and protein anabolic effects; conditions associated with sodium and water retention; metabolic syndromes; mood and sleep disorders, cancer, cardiac disease or hypertension.

[00124] In PCR, the number of molecules of the amplified target DNA increase by a factor approaching two with every cycle of the reaction until some reagent becomes limiting. Thereafter, the rate of amplification becomes increasingly diminished until there is no increase in the amplified target between cycles. If a graph is plotted in which the cycle number is on the X axis and the log of the concentration of the amplified target DNA is on the Y axis, a curved line of characteristic shape is formed by connecting the plotted points. Beginning with the first cycle, the slope of the line is positive and constant. This is said to be the linear portion of the curve. After a reagent becomes limiting, the slope of the line begins to decrease and eventually becomes zero. At this point the concentration of the amplified target DNA becomes asymptotic to some fixed value. This is said to be the plateau portion of the curve.

28
47

[00125] The concentration of the target DNA in the linear portion of the PCR amplification is directly proportional to the starting concentration of the target before the reaction began. By determining the concentration of the amplified products of the target DNA in PCR reactions that have completed the same number of cycles and are in their linear ranges, it is possible to determine the relative concentrations of the specific target sequence in the original DNA mixture. If the DNA mixtures are cDNAs synthesized from RNAs isolated from different tissues or cells, the relative abundances of the specific mRNA from which the target sequence was derived can be determined for the respective tissues or cells. This direct proportionality between the concentration of the PCR products and the relative mRNA abundances is only true in the linear range of the PCR reaction.

The final concentration of the target DNA in the plateau portion of the curve is determined by the availability of reagents in the reaction mix and is independent of the original concentration of target DNA. Therefore, the first condition that must be met before the relative abundances of a mRNA species can be determined by RT-PCR for a collection of RNA populations is that the concentrations of the amplified PCR products must be sampled when the PCR reactions are in the linear portion of their curves.

[00126] The second condition that must be met for an RT-PCR experiment to successfully determine the relative abundances of a particular mRNA species is that relative concentrations of the amplifiable cDNAs must be normalized to some independent standard. The goal of an RT-PCR experiment is to determine the abundance of a particular mRNA species relative to the average abundance of all mRNA species in the sample. In the experiments described below, mRNAs for GHRH can be used as standards to which the relative abundance of GHRH3 mRNAs are compared.

[00127] Most protocols for competitive PCR utilize internal PCR standards that are approximately as abundant as the target. These strategies are effective if the products of the PCR amplifications are sampled during their linear phases. If the products are sampled when the reactions are approaching the plateau phase, then the less abundant product becomes relatively over represented. Comparisons of relative abundances made for many different RNA samples, such as is the case when examining RNA samples for differential expression, become distorted in such a way as to make differences in relative abundances of RNAs appear less than they actually are. This is not a significant problem if the internal standard is much more abundant than the target. If the internal standard is more abundant than the target, then direct linear comparisons can be made between RNA samples.

[00128] The above discussion describes theoretical considerations for an RT-PCR assay for clinically derived materials. The problems inherent in clinical samples are that they are of variable quantity (making normalization problematic), and that they are of variable quality (necessitating the co-amplification of a reliable internal control, preferably of larger size than the target). Both of these problems are overcome if the RT-PCR is performed as a relative quantitative RT-PCR with an internal standard in which the internal standard is an amplifiable cDNA fragment that is larger than the target

46
48

cDNA fragment and in which the abundance of the mRNA encoding the internal standard is roughly 5-100 fold higher than the mRNA encoding the target. This assay measures relative abundance, not absolute abundance of the respective mRNA species.

[00129] Other studies may be performed using a more conventional relative quantitative RT-PCR assay with an external standard protocol. These assays sample the PCR products in the linear portion of their amplification curves. The number of PCR cycles that are optimal for sampling must be empirically determined for each target cDNA fragment. In addition, the reverse transcriptase products of each RNA population isolated from the various tissue samples must be carefully normalized for equal concentrations of amplifiable cDNAs. This consideration is very important since the assay measures absolute mRNA abundance. Absolute mRNA abundance can be used as a measure of differential gene expression only in normalized samples. While empirical determination of the linear range of the amplification curve and normalization of cDNA preparations are tedious and time consuming processes, the resulting RT-PCR assays can be superior to those derived from the relative quantitative RT-PCR assay with an internal standard.

[00130] One reason for this advantage is that without the internal standard/competitor, all of the reagents can be converted into a single PCR product in the linear range of the amplification curve, thus increasing the sensitivity of the assay. Another reason is that with only one PCR product, display of the product on an electrophoretic gel or another display method becomes less complex, has less background and is easier to interpret.

Chip Technologies

[00131] Specifically contemplated by the present inventors are chip-based DNA technologies such as those described by Hacia et al., ((1996) Nature Genetics, 14:441-447) and Shoemaker et al., ((1996) Nature Genetics 14:450-456. Briefly, these techniques involve quantitative methods for analyzing large numbers of genes rapidly and accurately. By tagging genes with oligonucleotides or using fixed probe arrays, one can employ chip technology to segregate target molecules as high density arrays and screen these molecules on the basis of hybridization. See also Pease et al., ((1994) Proc. Nat'l Acad Sci. USA, 91 :5022-5026); Fodor et al., ((1991) Science, 251:767-773).

Methods of detecting GHRd3 or GHRfl protein

[00132] Antibodies can be used in characterizing the GHRd3 and/or GHRfl content of tissues, through techniques such as ELISAs and Western blotting. Methods for obtaining GHRd3 and GHRfl polypeptides can be carried out using known methods. Likewise, methods of preparing antibodies capable of selectively binding GHRd3 and GHRfl isoforms are further described herein.

[00133] In one example, GHR antibodies, including GHRd3, GHRfl and GHR antibodies that do not distinguish between GHRd3 and GHRfl, can be used in an ELISA assay is contemplated. For example,

47
49

anti-GHR antibodies are immobilized onto a selected surface, preferably a surface exhibiting a protein affinity such as the wells of a polystyrene microtiter plate. After washing to remove incompletely adsorbed material, it is desirable to bind or coat the assay plate wells with a non-specific protein that is known to be antigenically neutral with regard to the test antisera such as bovine serum albumin (BSA), casein or solutions of powdered milk. This allows for blocking of non-specific adsorption sites on the immobilizing surface and thus reduces the background caused by non-specific binding of antigen onto the surface.

[00134] After binding of antibody to the well, coating with a non-reactive material to reduce background, and washing to remove unbound material, the immobilizing surface is contacted with the sample to be tested in a manner conducive to immune complex (antigen/antibody) formation.

[00135] Following formation of specific immunocomplexes between the test sample and the bound antibody, and subsequent washing, the occurrence and even amount of immunocomplex formation may be determined by subjecting same to a second antibody having specificity for GHR that differs the first antibody. Appropriate conditions preferably include diluting the sample with diluents such as BSA, bovine gamma globulin (BGG) and phosphate buffered saline (PBS)/Tween. These added agents also tend to assist in the reduction of nonspecific background. The layered antisera is then allowed to incubate for from about 2 to about 4 hr, at temperatures preferably on the order of about 25 °C to about 27 °C. Following incubation, the antisera-contacted surface is washed so as to remove non-immunocomplexed material. A preferred washing procedure includes washing with a solution such as PBS/Tween or borate buffer.

[00136] To provide a detecting means, the second antibody will preferably have an associated enzyme that will generate a color development upon incubating with an appropriate chromogenic substrate. Thus, for example, one will desire to contact and incubate the second antibody-bound surface with a urease or peroxidase-conjugated anti-human IgG for a period of time and under conditions which favor the development of immunocomplex formation (e.g., incubation for 2 hr at room temperature in a PBS-containing solution such as PBS/Tween).

[00137] After incubation with the second enzyme-tagged antibody, and subsequent to washing to remove unbound material, the amount of label is quantified by incubation with a chromogenic substrate such as urea and bromocresol purple or 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) and H₂O₂, in the case of peroxidase as the enzyme label. Quantitation is then achieved by measuring the degree of color generation, e.g., using a visible spectrum spectrophotometer.

[00138] The preceding format may be altered by first binding the sample to the assay plate. Then, primary antibody is incubated with the assay plate, followed by detecting of bound primary antibody using a labeled second antibody with specificity for the primary antibody.

48
50

[00139] The steps of various other useful immunodetection methods have been described in the scientific literature, such as, eg., Nakamura et al., in: Handbook of Experimental Immunology (4th Ed.), Weir, E., Herzenberg, L. A. Blackwell, C., Herzenberg, L. (eds). Vol. 1. Chapter 27, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987; incorporated herein by reference). Immunoassays, in their most simple and direct sense, are binding assays. Certain preferred immunoassays are the various types of radioimmunoassays (RIA) and immunobead capture assay. Immunohistochemical detection using tissue-sections also is particularly useful. However, it will be readily appreciated that detection is not limited to such techniques, and Western blotting, dot blotting, FACS analyses, and the like also may be used in connection with the present invention.

[00140] In a preferred example, GHRd3 levels can be detected using a GHRd3-specific antibody using the methods described above. In other methods, the total amount of GHR is determined without differentiating between GHRd3 and GHRf1, and the amount of GHRf1 is determined. The difference in amount of undifferentiated GHR and GHRf1 indicates the amount of GHRd3 present.

[00141] In an alternative example, GHRf1 levels can be detected using a GHRf1-specific antibody using the methods described above. In other methods, the total amount of GHR is determined without differentiating between GHRf1 and GHRd3, and the amount of GHRd3 is determined. The difference in amount of undifferentiated GHR and GHRd3 indicates the amount of GHRf1 present.

[00142] In an other example, GHRd3 levels can be detected using a GHRd3-specific antibody and GHRf1 levels can be detected using a GHRf1-specific antibody.

[00143] Preferably such methods detect GHBP (e.g. the extracellular portion of GHRd3 or GHRf1) in circulation. Preferred examples of procedures allow detection of undifferentiated GHR (e.g. for deducing GHRd3 from total undifferentiated GHR compared to GHRf1), detection of GHRd3 and/or detection of GHRf1. Such procedures include the ELISA assay, the ligand-mediated immunofunctional assay (LIFA) and the radioimmunoassay (RIA).

[00144] LIFA for the detection of undifferentiated (e.g. GHRd3 or GHRf1) GHR can be carried out according to the methods of Pflaum et al. ((1993) Exp. Clin. Endocrinol. 101. (Suppl. 1): 44) and Kratzsch et al. ((2001) Clin. Endocrinol. 54: 61-68. Briefly, in one example, undifferentiated GHR is detected using a monoclonal anti rGHBP antibody for coating microtiter plates. Serum sample or glycosylated rGHBP standards are incubated together with 10ng/well hGH and a monoclonal antibody directed against hGH as biotinylated tracer. The signal is amplified by the europium-labeled streptavidin system and measured using a fluorometer. In another example, a competitive radioimmunoassay (RIA) is carried out to detect undifferentiated GHBP, using an anti-rhGHBP antibody, rhGHBP standards and ¹²⁵I-rhGHBP as labeled antigen as described in Kratzsch et al. ((1995) Eur. J. Endocrinol. 132: 308-312).

49
51

[00145] In another example described in Kratzsch et al. ((2001) Clin. Endocrinol. 54: 61-68), undifferentiated GHBP is detected by coating a microtiter plate is coated with 100 µl of the monoclonal antibody 10B8 which binds GHBP outside of the hGH binding site (Rowlinson et al. (1999), in 50mmol/l sodium phosphate buffer, pH 9.6 After a washing step, 25 µl sample or standard and 50 ng biotin-labeled anti-GHGBP mAb 5C6 (which binds GHBP within the hGH binding site (Rowlinson et al (1999)) in 75 µl assay buffer (50mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, 150, mM NaCl , 0.05% NaN₃, 0.01% Tween 40, 0.5% BSA 0.05% bovine gamma-globulin, 20 µmol/l diethylenetriaminepenta acetic acid) are added and incubated overnight. The amount of GHRH is then determined using an antibody specific for the exon 3-containing fl form of GHBP). Briefly, mAb 10B8 is immobilized on microtiter plates as in the case of undifferentiated GHBP. After a washing step, 25 µl sample or standard and 75 µl of a rabbit polyclonal antibody against GHRd3 peptide described in Kratzsch et al. (2001) (diluted 1:10000) are added and incubated overnight. 20 ng biotinylated murine antirabbit IgG is added to each well and incubated for 2h followed by repeated rinsing. The signals are amplified by the europium-labeled streptavidin system and measured using a fluorometer. Recombinant nonglycosylated hGHBP, diluted in sheep serum, is used as a standard.

[00146] Antibodies specific for GHRd3 for use according to the present invention can be obtained using known methods. An isolated GHRd3 protein, or a portion or fragment thereof, can be used as an immunogen to generate antibodies that bind GHRd3 using standard techniques for polyclonal and monoclonal antibody preparation. A GHRd3 protein can be used or, alternatively, the invention provides antigenic peptide fragments of GHRd3 for use as immunogens.

[00147] GHRd3 polypeptides can be prepared using known means, either by purification from a biological sample obtained from an individual or more preferably as recombinant polypeptides. The GHRH amino acid sequence is shown in SEQ ID NO:2, from which GHRd3 differs by a deletion of 22 amino acids encoded by exon 3. The antigenic peptide of GHRd3 preferably comprises at least 8 amino acid residues of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, wherein at least one amino acid is outside of said exon 3-encoded amino acid residues. Said antigenic peptide encompasses an epitope of GHRd3 such that an antibody raised against the peptide forms a specific immune complex with GHRd3. Preferably the antibody binds selectively or preferentially to GHRd3 and does not substantially bind to GHRH. Preferably, the antigenic peptide comprises at least 10 amino acid residues, more preferably at least 15 amino acid residues, even more preferably at least 20 amino acid residues, and most preferably at least 30 amino acid residues.

[00148] Preferred epitopes encompassed by the antigenic peptide are regions of GHRd3 that are located on the surface of the protein, e.g., hydrophilic regions.

[00149] A GHRd3 immunogen typically is used to prepare antibodies by immunizing a suitable subject, (e.g., rabbit, goat, mouse or other mammal) with the immunogen. An appropriate

50
52

immunogenic preparation can contain, for example, recombinantly expressed GHRd3 protein or a chemically synthesized GHRd3 polypeptide. The preparation can further include an adjuvant, such as Freund's complete or incomplete adjuvant, or similar immunostimulatory agent. Immunization of a suitable subject with an immunogenic GHRd3 preparation induces a polyclonal anti-GHRd3 antibody response.

[00150] Accordingly, another aspect of the invention pertains to anti-GHRd3 antibodies. The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, i.e., molecules that contain an antigen binding site which specifically binds (immunoreacts with) an antigen, such as GHRd3. Examples of immunologically active portions of immunoglobulin molecules include F(ab) and F(ab')₂ fragments which can be generated by treating the antibody with an enzyme such as pepsin. The invention provides polyclonal and monoclonal antibodies that bind GHRd3. The term "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition", as used herein, refers to a population of antibody molecules that contain only one species of an antigen binding site capable of immunoreacting with a particular epitope of GHRd3. A monoclonal antibody composition thus typically displays a single binding affinity for a particular GHRd3 protein with which it immunoreacts.

[00151] The invention concerns antibody compositions, either polyclonal or monoclonal, capable of selectively binding, or selectively bind to an epitope-containing a polypeptide comprising a contiguous span of at least 6 amino acids, preferably at least 8 to 10 amino acids, more preferably at least 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, or 100 amino acids of SEQ ID No 2, said contiguous span preferably including at least one amino acid outside of said 22 amino acid span encoded by exon 3 of the GHR gene.

[00152] Polyclonal anti-GHRd3 antibodies can be prepared as described above by immunizing a suitable subject with a GHRd3 immunogen. The anti-GHRd3 antibody titer in the immunized subject can be monitored over time by standard techniques, such as with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using immobilized GHRd3. If desired, the antibody molecules directed against GHRd3 can be isolated from the mammal (e.g., from the blood) and further purified by well known techniques, such as protein A chromatography to obtain the IgG fraction. At an appropriate time after immunization, e.g., when the anti-GHRd3 antibody titers are highest, antibody-producing cells can be obtained from the subject and used to prepare monoclonal antibodies by standard techniques, such as the hybridoma technique originally described by Kohler and Milstein (1975) *Nature* 258:495-497 (see also, Brown et al. (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh et al. (1976) *PNAS* 76:2927-31; and Yeh et al. (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), the more recent human B cell hybridoma technique (Kozbor et al. (1983) *Immunol Today* 4:72), the EBV-hybridoma technique (Cole et al. (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) or trisoma techniques. The technology for producing monoclonal antibody hybridomas is well known (see generally R. H. Kenneth, In *Monoclonal Antibodies: A New Dimension in Biological Analyses*,

51
53

Plenum Publishing Corp., New York, N.Y. (1980); E. A. Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402; M. L. Gelfer et al. (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36). Briefly, an immortal cell line (typically a myeloma) is fused to lymphocytes (typically splenocytes) from a mammal immunized with a GHRd3 immunogen as described above, and the culture supernatants of the resulting hybridoma cells are screened to identify a hybridoma producing a monoclonal antibody that binds GHRd3.

[00153] Any of the many well known protocols used for fusing lymphocytes and immortalized cell lines can be applied for the purpose of generating an anti-GHRd3 monoclonal antibody (see, e.g., G. Galfre et al. (1977) *Nature* 266:55052; Gelfer et al. *Somatic Cell Genet.*, cited supra; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, cited supra; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, cited supra). Moreover, the ordinarily skilled worker will appreciate that there are many variations of such methods which also would be useful. Typically, the immortal cell line (e.g., a myeloma cell line) is derived from the same mammalian species as the lymphocytes. For example, murine hybridomas can be made by fusing lymphocytes from a mouse immunized with an immunogenic preparation of the present invention with an immortalized mouse cell line. Preferred immortal cell lines are mouse myeloma cell lines that are sensitive to culture medium containing hypoxanthine, aminopterin and thymidine ("HAT medium"). Any of a number of myeloma cell lines can be used as a fusion partner according to standard techniques, e.g., the P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 or Sp2/O-Ag14 myeloma lines. These myeloma lines are available from ATCC. Typically, HAT-sensitive mouse myeloma cells are fused to mouse splenocytes using polyethylene glycol ("PEG"). Hybridoma cells resulting from the fusion are then selected using HAT medium, which kills unfused and unproductively fused myeloma cells (unfused splenocytes die after several days because they are not transformed). Hybridoma cells producing a monoclonal antibody of the invention are detected by screening the hybridoma culture supernatants for antibodies that bind GHRd3, e.g., using a standard ELISA assay.

[00154] Alternative to preparing monoclonal antibody-secreting hybridomas, a monoclonal anti-GHRd3 antibody can be identified and isolated by screening a recombinant combinatorial immunoglobulin library (e.g., an antibody phage display library) with GHRd3 to thereby isolate immunoglobulin library members that bind GHRd3. Kits for generating and screening phage display libraries are commercially available (e.g., the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catalog No. 27-9400-01; and the Stratagene SurfZAP.TM. Phage Display Kit, Catalog No. 240612). Additionally, examples of methods and reagents particularly amenable for use in generating and screening antibody display library can be found in, for example, Ladner et al. U.S. Pat. No. 5,223,409; Kang et al. PCT International Publication No. WO 92/18619; Dower et al. PCT International Publication No. WO 91/17271; Winter et al. PCT International Publication WO 92/20791; Markland et al. PCT International Publication No. WO 92/15679; Breittling et al. PCT International Publication WO 93/01288; McCafferty et al. PCT International Publication No. WO 92/01047; Garrard et al. PCT International Publication No. WO 92/08690; Ladner et al. PCT International Publication No. WO 90/02808; Fuchs et

al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 248:1275-1281; Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al. (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; Barbas et al. (1991) *PNAS* 88:7978-7982; and McCafferty et al. *Nature* (1990) 348:552-554.

[00155] An anti-GHRd3 antibody (e.g., monoclonal antibody) can be used to isolate GHRd3 by standard techniques, such as affinity chromatography or immunoprecipitation. An anti-GHRd3 antibody can facilitate the purification of natural GHRd3 from cells and of recombinantly produced GHRd3 expressed in host cells. Moreover, an anti-GHRd3 antibody can be used to detect GHRd3 protein (e.g., in a cellular lysate or cell supernatant) in order to evaluate the abundance and pattern of expression of the GHRd3 protein. Anti-GHRd3 antibodies can be used diagnostically to monitor protein levels in tissue as part of a clinical testing procedure, e.g., to, for example, determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling (i.e., physically linking) the antibody to a detectable substance. Examples of detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, α -galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin, and examples of suitable radioactive material include ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S or ^3H .

[00156] In a preferred example, substantially pure GHRd3 protein or polypeptide is obtained. The concentration of protein in the final preparation is adjusted, for example, by concentration on an Amicon filter device, to the level of a few micrograms per ml. Monoclonal or polyclonal antibodies to the protein can then be prepared as follows: Monoclonal Antibody Production by Hybridoma Fusion. Monoclonal antibody to epitopes in the GHRd3 or a portion thereof can be prepared from murine hybridomas according to the classical method of Kohler and Milstein (*Nature*, 258: 495, 1975) or derivative methods thereof (see Harlow and Lane, *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 53-242, 1988).

[00157] Briefly, a mouse is repetitively inoculated with a few micrograms of the GHRd3 or a portion thereof over a period of a few weeks. The mouse is then sacrificed, and the antibody producing cells of the spleen isolated. The spleen cells are fused by means of polyethylene glycol with mouse myeloma cells, and the excess unfused cells destroyed by growth of the system on selective media comprising aminopterin (HAT media). The successfully fused cells are diluted and aliquots of the dilution placed in wells of a microtiter plate where growth of the culture is continued. Antibody-producing clones are

58
55

Identified by detection of antibody in the supernatant fluid of the wells by immunoassay procedures, such as ELISA, as original described by Engvall, E., Meth. Enzymol. 70: 419 (1980). Selected positive clones can be expanded and their monoclonal antibody product harvested for use. Detailed procedures for monoclonal antibody production are described in Davis, L. et al. Basic Methods in Molecular Biology Elsevier, New York. Section 21-2.

[00158] The antibody compositions of the present invention will find great use in immunoblot or Western blot analysis. The antibodies may be used as high-affinity primary reagents for the identification of proteins immobilized onto a solid support matrix, such as nitrocellulose, nylon or combinations thereof. In conjunction with immunoprecipitation, followed by gel electrophoresis, these may be used as a single step reagent for use in detecting antigens against which secondary reagents used in the detection of the antigen cause an adverse background. Immunologically-based detection methods for use in conjunction with Western blotting include enzymatically-, radiolabel-, or fluorescently-tagged secondary antibodies against the toxin moiety are considered to be of particular use in this regard. U.S. Patents concerning the use of such labels include U.S. Pat. Nos. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 and 4,386,241, each incorporated herein by reference. Of course, one may find additional advantages through the use of a secondary binding ligand such as a second antibody or a biotin/avidin ligand binding arrangement, as is known in the art.

Administration of GH compositions

[00159] The GH to be used in accordance with the invention may be in native-sequence or in variant form, and from any source, whether natural, synthetic, or recombinant. Examples include human growth hormone (hGH), which is natural or recombinant GH with the human native sequence (GENOTROPIN™, somatotropin or somatropin), and recombinant growth hormone (rGH), which refers to any GH or GH variant produced by means of recombinant DNA technology, including somatrem, somatotropin, and somatropin. Preferred herein for human use is recombinant human native-sequence, mature GH with or without a methionine at its N-terminus. Most preferred is GENOTROPIN™ (Pharmacia, U.S.A.) which is a recombinant human GH polypeptide. Also preferred is methionyl human growth hormone (met-hGH) produced in E. coli, e.g., by the process described in U.S. Pat. No. 4,755,465 issued Jul. 5, 1988 and Goeddel et al., Nature, 282: 544 (1979). Met-hGH, sold as PROTROPIN™ (Genentech, Inc. U.S.A.), is identical to the natural polypeptide, with the exception of the presence of an N-terminal methionine residue. Another example is recombinant hGH sold as NUTROPIN™ (Genentech, Inc., U.S.A.). This latter hGH lacks this methionine residue and has an amino acid sequence identical to that of the natural hormone. See Gray et al., Biotechnology 2: 161 (1984). Another GH example is an hGH variant that is a placental form of GH with pure somatogenic and no lactogenic activity as described in U.S. Pat. No. 4,670,393. Also included are GH variants, for example such as those described in WO 90/04788 and WO 82/09690. Other examples include GH compositions that act as GHR antagonists, such as pegvisomant (SOMAVERT™, Pharmacia, U.S.A.) which can be used for the treatment of acromegaly.

52
56

[00160] GH can be directly administered to a subject by any suitable technique, including parenterally, intranasally, intrapulmonary, orally, or by absorption through the skin. They can be administered locally or systemically. Examples of parenteral administration include subcutaneous, intramuscular, intravenous, intraarterial, and intraperitoneal administration. Preferably, they are administered by daily subcutaneous injection.

[00161] The GH to be used in the therapy will be formulated and dosed in a fashion consistent with good medical practice, taking into account the clinical condition of the individual subject (especially the side effects of treatment with GH alone), the site of delivery of the GH composition(s), the method of administration, the scheduling of administration, and other factors known to practitioners. The "effective amounts" of each component for purposes herein are thus determined by such considerations and are amounts that increase the growth rates of the subjects.

[00162] For GH, a dose of greater than about 0.2 mg/kg/week is preferably employed, more preferably greater than about 0.25 mg/kg/week, and even more preferably greater than or equal to about 0.3 mg/kg/week. In one embodiment, the dose of GH ranges from about 0.3 to 1.0 mg/kg/week, and in another embodiment, 0.35 to 1.0 mg/kg/week.

[00163] Preferably, the GH is administered once per day subcutaneously. In preferred aspects, the dose of GH is between about 0.001 and 0.2 mg/kg/day. Yet more preferably, the dose of GH is between about 0.010 and 0.10 mg/kg/day.

[00164] As discussed, subjects homozygous or heterozygous for the GHRf1 allele are expected to have a greater positive response to GH treatment than subjects homozygous for the GHRd3 allele. In preferred aspects, a dose administered to subjects homozygous for the GHRd3 allele will be greater than the dose administered to a subject that is heterozygous for the GHRd3 allele and the dose administered to subjects heterozygous for the GHRd3 allele will be greater than the dose administered to a subject that is homozygous for the GHRf1 allele.

[00165] The GH is suitably administered continuously or non-continuously, such as at particular times (e.g., once daily) in the form of an injection of a particular dose, where there will be a rise in plasma GH concentration at the time of the injection, and then a drop in plasma GH concentration until the time of the next injection. Another non-continuous administration method results from the use of PLGA microspheres and many implant devices available that provide a discontinuous release of active ingredient, such as an initial burst, and then a lag before release of the active ingredient. See, e.g., U.S. Pat. No. 4,767,628.

[00166] The GH may also be administered so as to have a continual presence in the blood that is maintained for the duration of the administration of the GH. This is most preferably accomplished by means of continuous infusion via, e.g., mini-pump such as an osmotic mini-pump. Alternatively, it is

53
52

properly accomplished by use of frequent injections of GH (i.e., more than once daily, for example, twice or three times daily).

[00167] In yet another embodiment, GH may be administered using long-acting GH formulations that either delay the clearance of GH from the blood or cause a slow release of GH from, e.g., an injection site. The long-acting formulation that prolongs GH plasma clearance may be in the form of GH complexed, or covalently conjugated (by reversible or irreversible bonding) to a macromolecule such as one or more of its binding proteins (WO 92/08985) or a water-soluble polymer selected from PEG and polypropylene glycol homopolymers and polyoxyethylene polyols, i.e., those that are soluble in water at room temperature. Alternatively, the GH may be complexed or bound to a polymer to increase its circulatory half-life. Examples of polyethylene polyols and polyoxyethylene polyols useful for this purpose include polyoxyethylene glycerol, polyethylene glycol, polyoxyethylene sorbitol, polyoxyethylene glucose, or the like. The glycerol backbone of polyoxyethylene glycerol is the same backbone occurring in, for example, animals and humans in mono-, di-, and triglycerides.

[00168] The polymer need not have any particular molecular weight, but it is preferred that the molecular weight be between about 3500 and 100,000, more preferably between 5000 and 40,000. Preferably the PEG homopolymer is unsubstituted, but it may also be substituted at one end with an alkyl group. Preferably, the alkyl group is a C1-C4 alkyl group, and most preferably a methyl group. Most preferably, the polymer is an unsubstituted homopolymer of PEG, a monomethyl-substituted homopolymer of PEG (mPEG), or polyoxyethylene glycerol (POG) and has a molecular weight of about 5000 to 40,000.

[00169] The GH is covalently bonded via one or more of the amino acid residues of the GH to a terminal reactive group on the polymer, depending mainly on the reaction conditions, the molecular weight of the polymer, etc. The polymer with the reactive group(s) is designated herein as activated polymer. The reactive group selectively reacts with free amino or other reactive groups on the GH. It will be understood, however, that the type and amount of the reactive group chosen, as well as the type of polymer employed, to obtain optimum results, will depend on the particular GH employed to avoid having the reactive group react with too many particularly active groups on the GH. As this may not be possible to avoid completely, it is recommended that generally from about 0.1 to 1000 moles, preferably 2 to 200 moles, of activated polymer per mole of protein, depending on protein concentration, is employed. The final amount of activated polymer per mole of protein is a balance to maintain optimum activity, while at the same time optimizing, if possible, the circulatory half-life of the protein.

[00170] While the residues may be any reactive amino acids on the protein, such as one or two cysteines or the N-terminal amino acid group, preferably the reactive amino acid is lysine, which is linked to the reactive group of the activated polymer through its free epsilon-amino group, or glutamic or aspartic acid, which is linked to the polymer through an amide bond.

[00171] The covalent modification reaction may take place by any appropriate method generally used for reacting biologically active materials with inert polymers, preferably at about pH 5-9, more preferably 7-9 if the reactive groups on the GH are lysine groups. Generally, the process involves preparing an activated polymer (with at least one terminal hydroxyl group), preparing an active substrate from this polymer, and thereafter reacting the GH with the active substrate to produce the GH suitable for formulation. The above modification reaction can be performed by several methods, which may involve one or more steps. Examples of modifying agents that can be used to produce the activated polymer in a one-step reaction include cyanuric acid chloride (2,4,6-trichloro-S-triazine) and cyanuric acid fluoride.

[00172] In one embodiment the modification reaction takes place in two steps wherein the polymer is reacted first with an acid anhydride such as succinic or glutaric anhydride to form a carboxylic acid, and the carboxylic acid is then reacted with a compound capable of reacting with the carboxylic acid to form an activated polymer with a reactive ester group that is capable of reacting with the GH. Examples of such compounds include N-hydroxysuccinimide, 4-hydroxy-3-nitrobenzene sulfonic acid, and the like, and preferably N-hydroxysuccinimide or 4-hydroxy-3-nitrobenzene sulfonic acid is used. For example, monomethyl substituted PEG may be reacted at elevated temperatures, preferably about 100-110 C for four hours, with glutaric anhydride. The monomethyl PEG-glutaric acid thus produced is then reacted with N-hydroxysuccinimide in the presence of a carbodimide reagent such as dicyclohexyl or isopropyl carbodimide to produce the activated polymer, methoxypolyethylene glycolyl-N-succinimidyl glutarate, which can then be reacted with the GH. This method is described in detail in Abuchowski et al., *Cancer Biochem. Biophys.*, 7: 175-186 (1984). In another example, the monomethyl substituted PEG may be reacted with glutaric anhydride followed by reaction with 4-hydroxy-3-nitrobenzene sulfonic acid (HNSA) in the presence of dicyclohexyl carbodimide to produce the activated polymer. HNSA is described by Bhattacharya et al., *Peptides: Synthesis-Structure-Function*, Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium, Rich et al. (eds.) (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., 1981), p. 97-100, and in Nitecki et al., *High-Technology Route to Virus Vaccines* (American Society for Microbiology: 1986) entitled "Novel Agent for Coupling Synthetic Peptides to Carriers and its Applications."

[00173] Specific methods of producing GH conjugated to PEG include the methods described in U.S. Pat. No. 4,179,337 on PEG-GH and U.S. Pat. No. 4,835,465, which discloses PEG reversibly but covalently linked to GH.

[00174] The GH can also be suitably administered by sustained-release systems. Examples of sustained-release compositions useful herein include semi-permeable polymer matrices in the form of shaped articles, e.g., films, or microcapsules. Sustained-release matrices include polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919, EP 58,481), copolymers of L-glutamic acid and gamma-ethyl-L-glutamate (Sikman et al., *Biopolymers*, 22, 547-556 (1983)), poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (Langer et al., *J. Biomed.*

57
59

Mater. Res., 15: 167-277 (1981); Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982), ethylene vinyl acetate (Langer et al., supra) or poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid (EP 133,988), or PLGA microspheres.

[00175] Sustained-release GH compositions also include liposomally entrapped GH. Liposomes containing GH are prepared by methods known per se: DE 3,218,121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 38,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; Japanese Pat. Appln. 83-118008; U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545; and EP 102,324. ordinarily, the liposomes are of the small (about 200-800 Angstroms) unilamellar type in which the lipid content is greater than about 30 mol. percent cholesterol, the selected proportion being adjusted for the optimal therapy. In addition, a biologically active sustained-release formulation can be made from an adduct of the GH covalently bonded to an activated polysaccharide as described in U.S. Pat. No. 4,857,505. In addition, U.S. Pat. No. 4,837,381 describes a microsphere composition of fat or wax or a mixture thereof and GH for slow release.

[00176] In another embodiment, the subjects identified above are also treated with an effective amount of IGF-I. As a general proposition, the total pharmaceutically effective amount of IGF-I administered parenterally per dose will be in the range of about 50 to 240 µg/kg/day, preferably 100 to 200 µg/kg/day, of subject body weight, although, as noted above, this will be subject to a great deal of therapeutic discretion. Also, preferably the IGF-I is administered once or twice per day by subcutaneous injection. In a further embodiment, both IGF-I and GH can be administered to the subject, each in effective amounts, or each in amounts that are sub-optimal but when combined are effective. Preferably about 0.001 to 0.2 mg/kg/day or more preferably about 0.01 to 0.1 mg/kg/day GH is administered. Preferably, the administration of both IGF-I and GH is by injection using, e.g., intravenous or subcutaneous means. More preferably, the administration is by subcutaneous injection for both IGF-I and GH, most preferably daily injections.

[00177] It is noted that practitioners devising doses of both IGF-I and GH should take into account the known side effects of treatment with these hormones. For GH, the side effects include sodium retention and expansion of extracellular volume (Ikkos et al., Acta Endocrinol. (Copenhagen), 32: 341-361 (1959); Biglieri et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 21: 361-370 (1961), as well as hyperinsulinemia and hyperglycemia. The major apparent side effect of IGF-I is hypoglycemia. Guler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2868-2872 (1989). Indeed, the combination of IGF-I and GH may lead to a reduction in the unwanted side effects of both agents (e.g., hypoglycemia for IGF-I and hyperinsulinemia for GH) and to a restoration of blood levels of GH, the secretion of which is suppressed by IGF-I.

[00178] For parenteral administration, in one embodiment, GH is formulated generally by mixing the GH at the desired degree of purity, in a unit dosage injectable form (solution, suspension, or emulsion), with a pharmaceutically acceptable carrier, i.e., one that is non-toxic to recipients at the dosages and concentrations employed and is compatible with other ingredients of the formulation. For example, the formulation preferably does not include oxidizing agents and other compounds that are

known to be deleterious to polypeptides. Generally, the formulations are prepared by contacting the GH with liquid carriers or finely divided solid carriers or both. Then, if necessary, the product is shaped into the desired formulation. Preferably the carrier is a parenteral carrier, more preferably a solution that is isotonic with the blood of the recipient. Examples of such carrier vehicles include water, saline, Ringer's solution, and dextrose solution. Non-aqueous vehicles such as fixed oils and ethyl oleate are also useful herein, as well as liposomes.

[00179] The carrier suitably contains minor amounts of additives such as substances that enhance isotonicity and chemical stability. Such materials are non-toxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, succinate, acetic acid, and other organic acids or their salts; antioxidants such as ascorbic acid; low molecular weight (less than about ten residues) polypeptides, e.g., polyarginine or tripeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids, such as glycine, glutamic acid, aspartic acid, or arginine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including cellulose or its derivatives, glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; counterions such as sodium; and/or non-ionic surfactants such as polysorbates, poloxamers, or PEG.

[00180] GH is typically formulated individually in such vehicles at a concentration of about 0.1 mg/mL to 100 mg/mL, preferably 1-10 mg/mL, at a pH of about 4.5 to 8. GH is preferably at a pH of 7.4-7.8. It will be understood that use of certain of the foregoing excipients, carriers, or stabilizers will result in the formation of GH salts.

[00181] While GH can be formulated by any suitable method, the preferred formulations for GH are as follows: for a preferred hGH (GENOTROPIN™), a single-dose syringe contains 0.2 mg, 0.4 mg, 0.6 mg, 0.8 mg, 1.0 mg, 1.2 mg, 1.4 mg, 1.6 mg, 1.8 mg or 2.0 mg recombinant somatotrophin. Said GENOTROPIN™ syringe also contains 0.21 mg glycine, 12.5 mg mannitol, 0.045 mg monoatriumphosphate, 0.025 mg disodium phosphate and water to 0.25 ml.

[00182] For met-GH (PROTROPIN™), the pre-lyophilized bulk solution contains 2.0 mg/mL met-GH, 16.0 mg/mL mannitol, 0.14 mg/mL sodium phosphate, and 1.6 mg/mL sodium phosphate (monobasic monohydrate), pH 7.8. The 5-mg vial of met-GH contains 5 mg met-GH, 40 mg mannitol, and 1.7 mg total sodium phosphate (dry weight) (dibasic anhydrous), pH 7.8. The 10-mg vial contains 10 mg met-GH, 80 mg mannitol, and 3.4 mg total sodium phosphate (dry weight) (dibasic anhydrous), pH 7.8.

[00183] For metless-GH (NUTROPIN™), the pre-lyophilized bulk solution contains 2.0 mg/mL GH, 16.0 mg/mL mannitol, 0.68 mg/mL glycine, 0.45 mg/mL sodium phosphate, and 1.3 mg/mL sodium phosphate (monobasic monohydrate), pH 7.4. The 5-mg vial contains 5 mg GH, 45 mg mannitol, 1.7 mg glycine, and 1.7 mg total sodium phosphates (dry weight) (dibasic anhydrous), pH 7.4. The 10-mg

59
61

vial contains 10 mg GH, 80 mg mannitol, 3.4 mg glycine, and 3.4 mg total sodium phosphates (dry weight) (dibasic anhydrous).

[00184] Alternatively, a liquid formulation for NUTROPIN™ hGH can be used, for example: 5.0+-.0.5 mg/mL rhGH; 8.8+-.0.9 mg/mL sodium chloride; 2.0+-.0.2 mg/mL Polysorbate 20; 2.5+-.0.3 mg/mL phenol; 2.68+-.0.3 mg/mL sodium citrate dihydrate; and 0.17+-.0.02 mg/mL citric acid anhydrous (total anhydrous sodium citrate/citric acid is 2.5 mg/mL, or 10 mM); pH 6.0+-.0.3. This formulation is suitably put in a 10-mg vial, which is a 2.0-mL fill of the above formulation in a 3-cc glass vial. Alternatively, a 10-mg (2.0 mL) cartridge containing the above formulation can be placed in an injection pen for injection of liquid GH to the subject.

[00185] GH compositions to be used for therapeutic administration are preferably sterile. Sterility is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes (e.g., 0.2 micron membranes). Therapeutic GH compositions generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

[00186] The GH ordinarily will be stored in unit or multi-dose containers, for example, sealed ampoules or vials, as an aqueous solution, or as a lyophilized formulation for reconstitution. As an example of a lyophilized formulation, vials are filled with sterile-filtered (w/v) aqueous GH solutions, and the resulting mixture is lyophilized. The infusion solution is prepared by reconstituting the lyophilized GH using bacteriostatic Water-for-Injection.

[00187] The invention will be more fully understood by reference to the following examples. They should not, however, be construed as limiting the scope of the invention. All literature and patent citations are expressly incorporated herein by reference.

EXAMPLES

Example 1

Genotyping for GHRd3 and GHRfl

[00188] Genomic DNA from patients was obtained from peripheral blood following the method described by Lahiri and Numberger (Nucl Ac Res 1991; 19: 5444). Amplification of a 3248 bp segment containing the GHRfl-GHRd3 polymorphisms reported by Stalling-Mann et al (Proc Nat Acad Sci USA 1996; 93: 12394-12398) for the exon 3 surrounding region of the GHR gene was carried out to investigate the possible GHR-dependent growth hormone response in SGA patients. DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using a multiplex strategy described by Pantel et al (J Biol Chem 2000; 275: 18664-18669) with modifications. Briefly, 200 ng of genomic DNA were added to a 50 µl reaction mixture of 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM each dNTP, 0.2 µM of each primer, and 0.5 U Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland). The G1, G2 and G3 primers are

60
62

described in GenBank™ accession number AF 155912. Cycling conditions were as follows: Initial step of denaturation of 30 secs at 98°C, followed by 40 cycles consisting of 98°C, 10secs; 60°C, 30secs; 72°C, 1min 30 secs, followed by a 7 min of final extension step.

[00189] Amplification products were analyzed by electrophoresis (90 v, 15 min at room temperature of 25°C) on pre-made 48-well 1.2% agarose gel containing ethidium bromide (Ready-to-run Agarose Gel, Amersham Biosciences, San Francisco, CA).

[00190] When homozygous GHRd3/GHRd3 genotype was detected, a new PCR amplification using only G1 and G3 was carried out from DNA, in the same conditions, to reveal the 935 bp product if mildly amplified in the multiplex reaction.

Primers (5'-3')	PCR product
G1:TGTGCTGGTCTGTTGGTCTG SEQ ID NO:5	f/f : 935 bp
G2:AGTCGTTCCTGGGACAGAGA SEQ ID NO:6	f/d3 : 935, and 532 bp
G3:CCTGGATTAACTTTGCAGACTC SEQ ID NO:7	d3/d3 : 532 bp

Comments:

[00191] We verified by automatic sequencing the identity of the two PCR products selected from homozygous DNA for each variant.

[00192] The Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland) used in this assay allows a robust amplification at shorter time and higher denaturation temperature (98°C).

[00193] In the first serie we carried out a second electrophoresis on PAGE followed by silver staining to better visualize the 935 bp mild band in some doubtful heterozygous samples. We further verified that a second PCR amplification with G1 and G3 primers allowed a definite result for doubtful samples, and accordingly recommend to perform this second PCR to establish the GHRd3/GHRd3 genotype. This verification is more accurate, faster and cheaper.

Example 2

Detection of GHRd3 allele associated with GH response

[00194] 71 SGA patients who had been enrolled in a trial for treatment with recombinant GH were examined for association of the common GHR exon 3 variant and the response of growth velocity

to treatment with GH. The patients enrolled in this study were selected according to the following inclusion and exclusion criteria:

Inclusion criteria

1. Boys or girls with a history of IGR assessed as body weight and/or stature at birth <P10 (Delgado et al. Anal Esp Ped. Medicina Fetal y Neonatológica 1996; . 44: 50-59).
2. A gestational age of over 35 weeks as determined by echography or the date of the last period (DLP), and clinical evaluation of the newborn infant.
3. A chronological age of over 3 years.
4. Current stature equal to or under percentile 3 or -1.88 SDS (Hernández, . Madrid. Editorial Garsi,1988).
5. Current growth rate equal to or under percentile 50, in relation to chronological age (Hernández, . Madrid. Editorial Garsi,1988).
6. A normal karyotype in girls.
7. Obtainment of Informed Consent in writing from the patient/legal representative.

Exclusion criteria

1. Post-ischemic neonatal encephalopathy.
2. Associated endocrine pathology, except hypothyroidism with substitution therapy.
4. Chronic steroid treatment.
5. Serious chronic illness (blood pathology, pulmonary disease, liver pathology, malabsorption, neurological alterations, etc.).
6. Neoplasms.
7. A history of intracranial radiation.
6. Syndromes (bone dysplasia, fetal alcoholic syndrome, Turner, Seckel and other dysmorphic syndromes) except Sylver-Russell.
7. Chromosomal alterations.
8. Patients previously treated with growth hormone.

[00195] Using the method described in Example 1, the genotypes for the GHRd3 were determined for the group 71 patients. The results are shown in Table 1 and Table 2.

Table 1: GHRd3 genotype distribution in SGA patients

	SGA patients N=71
f/f	35
d3/f	27
d3/d3	9

52
64

Table 2: GHRd3 genotype distribution in SGA patients by gender

GHR genotype	1/1	1/d3	d3/d3
N	35	27	9
Male	21	12	5
Female	14	15	4

[00196] Patients were treated with rhGH at a dose of 1.4 (U.kg.week). Growth rates were followed for a 1-year period during treatment with rhGH (Table 3). Patients who carried the GHRd3 variant grew at a slower rate when treated with rGH. The genomic variation of the GHR sequence is therefore associated with a marked difference in the increment of growth velocity after rGH treatment.

Table 3: Growth rates in the three genotypic groups

	1/1	1/d3	d3/d3
	35	27	9
Growth velocity at onset (cm/yr):	4.49 ± 0.38	4.95 ± 0.35	5.67 ± 0.50
Year 1	10.13 ± 0.38	9.56 ± 0.27	9.12 ± 0.50
Corrected Y1-0 (cm/yr):	5.63 ± 0.49	4.61 ± 0.39	3.44 ± 0.85

63
65**CLAIMS**

1. A method of predicting a subject's response to an agent capable of binding to a GHR protein, comprising determining in the subject the presence or absence of a GHRd3 allele and/or a GHRf1 allele of the GHR gene, wherein the GHRd3 allele is correlated with a likelihood of having a decreased positive response to said agent and the GHRf1 allele is correlated with a likelihood of having an increased positive response to said agent, thereby identifying the subject as having a decreased or an increased likelihood of responding to treatment with said agent.
2. The method according to claim 1, wherein said subject is idiopathic short stature (ISS), very low birth weight (VLBW), intra uterine growth retardation' (IUGR), or small for gestational age (SGA).
3. The method according to claim 2, wherein said subject is SGA.
4. The method according to any one of claims 1 to 3, wherein said agent is a GHR agonist.
5. The method according to claim 4, wherein said GHR agonist is GH, preferably somatropin.
6. The method according to claim 1, wherein said agent is a GHR antagonist.
7. The method according to claim 6, wherein said GHR antagonist is pegvisomant.
8. A method for treating a subject suffering of a disease or a disorder involving GHR, the method comprising:
 - (a) determining in the subject the presence or absence of a GHRd3 allele and/or a GHRf1 allele of the GHR gene, wherein the GHRd3 allele is correlated with a likelihood of having a decreased positive response to an agent capable of binding to a GHR protein or acting via the GHR pathway and the GHRf1 allele is correlated with a likelihood of having an increased positive response to said agent; and
 - (b) selecting or determining an effective amount of said agent to administer to said subject.
9. The method according to claim 8, wherein said subject having short a stature is idiopathic short stature (ISS), very low birth weight (VLBW), intra uterine growth retardation' (IUGR), or small for gestational age (SGA).
10. The method according to claim 9, wherein said subject is SGA.
11. The method according to any one of claims 8 to 10, wherein said agent is a GHR agonist.
12. The method according to claim 11, wherein said GHR agonist is GH, preferably somatropin.
13. The method according to claim 8, wherein said agent is a GHR antagonist.
14. The method according to claim 13, wherein said GHR antagonist is pegvisomant.

SA
66

15. The method according to any one of claims 8 to 14, further comprising (c) administering said effective amount of said agent to said subject.

67

SEQUENCE LISTING

<110> Pharmacia & Upjohn

<120> METHODS FOR PREDICTING THERAPEUTIC RESPONSE TO AGENTS ACTING ON THE GROWTH HORMONE RECEPTOR

<130> GH response

<150> 60/586,380

<151> 2004-07-08

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4414

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (44)..(1960)

<223>

<400> 1

```

ccgcgcctctc tgatcagagg cgaagctcgg aggtcctaca ggt atg gat ctc tgg      55
                                   Met Asp Leu Trp
                                   1

cag ctg ctg ttg acc ttg gca ctg gca gga tca agt gat gct ttt tct      103
Gln Leu Leu Leu Thr Leu Ala Leu Ala Gly Ser Ser Asp Ala Phe Ser
5              10              15              20

gga agt gag gcc aca gca gct atc ctt agc aga gca ccc tgg agt ctg      151
Gly Ser Glu Ala Thr Ala Ala Ile Leu Ser Arg Ala Pro Trp Ser Leu
25              30              35

caa agt gtt aat cca ggc cta aag aca aat tct tct aag gag cct aaa      199
Gln Ser Val Asn Pro Gly Leu Lys Thr Asn Ser Ser Lys Glu Pro Lys
40              45              50

ttc acc aag tgc cgt tca cct gag cga gag act ttt tca tgc cac tgg      247
Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe Ser Cys His Trp
55              60              65

aca gat gag gtt cat cat ggt aca aag aac cta gga ccc ata cag ctg      295
Thr Asp Glu Val His His Gly Thr Lys Asn Leu Gly Pro Ile Gln Leu
70              75              80

ttc tat acc aga agg aac act caa gaa tgg act caa gaa tgg aaa gaa      343
Phe Tyr Thr Arg Arg Asn Thr Gln Glu Trp Thr Gln Glu Trp Lys Glu
85              90              95              100

```

65
68

tgc cct gat tat gtt tct gct ggg gaa aac agc tgt tac ttt aat tca	391
Cys Pro Asp Tyr Val Ser Ala Gly Glu Asn Ser Cys Tyr Phe Asn Ser	
105 110 115	
tcg ttt acc tcc atc tgg ata cct tat tgt atc aag cta act agc aat	439
Ser Phe Thr Ser Ile Trp Ile Pro Tyr Cys Ile Lys Leu Thr Ser Asn	
120 125 130	
ggg ggt aca gtg gat gaa aag tgt ttc tct gtt gat gaa ata gtg caa	487
Gly Gly Thr Val Asp Glu Lys Cys Phe Ser Val Asp Glu Ile Val Gln	
135 140 145	
cca gat cca ccc att gcc ctc aac tgg act tta ctg aac gtc agt tta	535
Pro Asp Pro Pro Ile Ala Leu Asn Trp Thr Leu Leu Asn Val Ser Leu	
150 155 160	
act ggg att cat gca gat atc caa gtg aga tgg gaa gca cca cgc aat	583
Thr Gly Ile His Ala Asp Ile Gln Val Arg Trp Glu Ala Pro Arg Asn	
165 170 175 180	
gca gat att cag aaa gga tgg atg gtt ctg gag tat gaa ctt caa tac	631
Ala Asp Ile Gln Lys Gly Trp Met Val Leu Glu Tyr Glu Leu Gln Tyr	
185 190 195	
aaa gaa gta aat gaa act aaa tgg aaa atg atg gac cct ata ttg aca	679
Lys Glu Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met Met Asp Pro Ile Leu Thr	
200 205 210	
aca tca gtt cca gtg tac tca ttg aaa gtg gat aag gaa tat gaa gtg	727
Thr Ser Val Pro Val Tyr Ser Leu Lys Val Asp Lys Glu Tyr Glu Val	
215 220 225	
cgt gtg aga tcc aaa caa cga aac tct gga aat tat ggc gag ttc agt	775
Arg Val Arg Ser Lys Gln Arg Asn Ser Gly Asn Tyr Gly Glu Phe Ser	
230 235 240	
gag gtg ctc tat gta aca ctt cct cag atg agc caa ttt aca tgt gaa	823
Glu Val Leu Tyr Val Thr Leu Pro Gln Met Ser Gln Phe Thr Cys Glu	
245 250 255 260	
gaa gat ttc tac ttt cca tgg ctc tta att att atc ttt gga ata ttt	871
Glu Asp Phe Tyr Phe Pro Trp Leu Leu Ile Ile Ile Phe Gly Ile Phe	
265 270 275	
ggg cta aca gtg atg cta ttt gta ttc tta ttt tct aaa cag caa agg	919
Gly Leu Thr Val Met Leu Phe Val Phe Leu Phe Ser Lys Gln Gln Arg	
280 285 290	
att aaa atg ctg att ctg ccc cca gtt cca gtt cca aag att aaa gga	967
Ile Lys Met Leu Ile Leu Pro Pro Val Pro Val Pro Lys Ile Lys Gly	
295 300 305	
atc gat cca gat ctc ctc aag gaa gga aaa tta gag gag gtg aac aca	1015
Ile Asp Pro Asp Leu Leu Lys Glu Gly Lys Leu Glu Glu Val Asn Thr	

66
69

310	315	320	
atc tta gcc att cat gat agc tat aaa ccc gaa ttc cac agt gat gac Ile Leu Ala Ile His Asp Ser Tyr Lys Pro Glu Phe His Ser Asp Asp 325 330 335 340	1063		
tct tgg gtt gaa ttt att gag cta gat att gat gag cca gat gaa aag Ser Trp Val Glu Phe Ile Glu Leu Asp Ile Asp Glu Pro Asp Glu Lys 345 350 355	1111		
act gag gaa tca gac aca gac aga ctt cta agc agt gac cat gag aaa Thr Glu Glu Ser Asp Thr Asp Arg Leu Leu Ser Ser Asp His Glu Lys 360 365 370	1159		
tca cat agt aac cta ggg gtg aag gat ggc gac tct gga cgt acc agc Ser His Ser Asn Leu Gly Val Lys Asp Gly Asp Ser Gly Arg Thr Ser 375 380 385	1207		
tgt tgt gaa cct gac att ctg gag act gat ttc aat gcc aat gac ata Cys Cys Glu Pro Asp Ile Leu Glu Thr Asp Phe Asn Ala Asn Asp Ile 390 395 400	1255		
cat gag ggt acc tca gag gtt gct cag cca cag agg tta aaa ggg gaa His Glu Gly Thr Ser Glu Val Ala Gln Pro Gln Arg Leu Lys Gly Glu 405 410 415 420	1303		
gca gat ctc tta tgc ctt gac cag aag aat caa aat aac tca cct tat Ala Asp Leu Leu Cys Leu Asp Gln Lys Asn Gln Asn Asn Ser Pro Tyr 425 430 435	1351		
cat gat gct tgc cct gct act cag cag ccc agt gtt atc caa gca gag His Asp Ala Cys Pro Ala Thr Gln Gln Pro Ser Val Ile Gln Ala Glu 440 445 450	1399		
aaa aac aaa cca caa cca ctt cct act gaa gga gct gag tca act cac Lys Asn Lys Pro Gln Pro Leu Pro Thr Glu Gly Ala Glu Ser Thr His 455 460 465	1447		
caa gct gcc cat att cag cta agc aat cca agt tca ctg tca aac atc Gln Ala Ala His Ile Gln Leu Ser Asn Pro Ser Ser Leu Ser Asn Ile 470 475 480	1495		
gac ttt tat gcc cag gtg agc gac att aca cca gca ggt agt gtg gtc Asp Phe Tyr Ala Gln Val Ser Asp Ile Thr Pro Ala Gly Ser Val Val 485 490 495 500	1543		
ctt tcc ccg ggc caa aag aat aag gca ggg atg tcc caa tgt gac atg Leu Ser Pro Gly Gln Lys Asn Lys Ala Gly Met Ser Gln Cys Asp Met 505 510 515	1591		
cac ccg gaa atg gtc tca ctc tgc caa gaa aac ttc ctt atg gac aat His Pro Glu Met Val Ser Leu Cys Gln Glu Asn Phe Leu Met Asp Asn 520 525 530	1639		
gcc tac ttc tgt gag gca gat gcc aaa aag tgc atc cct gtg gct cct	1687		

67
20

Ala Tyr Phe Cys Glu Ala Asp Ala Lys Lys Cys Ile Pro Val Ala Pro	
535 540 545	
cac atc aag gtt gaa tca cac ata cag cca agc tta aac caa gag gac	1735
His Ile Lys Val Glu Ser His Ile Gln Pro Ser Leu Asn Gln Glu Asp	
550 555 560	
att tac atc acc aca gaa agc ctt acc act gct gct ggg agg cct ggg	1783
Ile Tyr Ile Thr Thr Glu Ser Leu Thr Thr Ala Ala Gly Arg Pro Gly	
565 570 575 580	
aca gga gaa cat gtt cca ggt tct gag atg cct gtc cca gac tat acc	1831
Thr Gly Glu His Val Pro Gly Ser Glu Met Pro Val Pro Asp Tyr Thr	
585 590 595	
tcc att cat ata gta cag tcc cca cag ggc ctc ata ctc aat gcg act	1879
Ser Ile His Ile Val Gln Ser Pro Gln Gly Leu Ile Leu Asn Ala Thr	
600 605 610	
gcc ttg ccc ttg cct gac aaa gag ttt ctc tca tca tgt ggc tat gtg	1927
Ala Leu Pro Leu Pro Asp Lys Glu Phe Leu Ser Ser Cys Gly Tyr Val	
615 620 625	
agc aca gac caa ctg aac aaa atc atg cct tag cctttctttg gtttcccaag	1980
Ser Thr Asp Gln Leu Asn Lys Ile Met Pro	
630 635	
agctacgtat ttaatagcaa agaattgact ggggcaataa cgtttaagcc aaacaatgt	2040
ttaaacccttt tttgggggag tgacaggatg gggatatggat tctaaaatgc cttttcccaa	2100
aatggttgaaa tatgatgtta aaaaaataag aagaatgctt aatcagatag atattcctat	2160
tgtgcaatgt aatatattta aagaattgtg tcagactgtt tagtagcagt gattgtctta	2220
atattgtggg tgtaattttt tgatactaag cattgaatgg ctatgttttt aatgtatagt	2280
aatcacgct ttttgaaaaa gcgaaaaaat caggtggcct ttgcggttca ggaattga	2340
atgcaaacca tagcacaggc taattttttg ttgtttctta aataagaac ttttttattt	2400
aaaaaactaa aaactagagg tgagaaattt aaactataag caagaaggca aaatagttt	2460
ggatatgtaa aacattttact ttgacataaa gttgataaag attttttaat aatttagact	2520
tcaagcatgg ctattttata ttacactaca cactgtgtac tgcagttggg atgaccctc	2580
taaggagtgt agcaactaca gtctaaagct ggtttaatgt tttggccaat gcacctaaag	2640
aaaaacaac tcgtttttta caagccctt ttatacctcc ccagactcct tcaacaattc	2700
taaatgatt gtagtaattc gcattattgg aatataattg ttttatctga attttaaac	2760
aagtatttgt taatttagaa aactttaag cgtttgcaca gatcaactta ccaggcacca	2820

68
21

aaagaagtaa aagcaaaaaa gaaaaccttt cttcaccana tcttggttga tgccaaaaaa 2880
 aaatacatgc taagagaagt agaaatcata gctgggtcac actgaccaag atacttaagt 2940
 gctgcaattg cagcgggagt gagtttttta gtgcgtgcag atggtgagag ataagatcta 3000
 tagcctctgc agcgggaatct gttcacaccc aacttggttt tgctacataa ttatccagga 3060
 agggaaataag gtacaagaag ctttttghta gttgaagcaa atcgaatgaa attaaactggg 3120
 taatgaaaca aagagttcaa gaaataagtt tttgtttcac agcctataac cagacacata 3180
 ctcatttttc atgataatga acagaacata gacagaagaa acaagggtttt cagtccccac 3240
 agataactga aaattattta aaccgctaaa agaaactttc tttctcacta aatcttttat 3300
 aggattttatt taaaatagca aaagaagaag tttcatcatt ttttacttcc tctctgagtg 3360
 gactggcctc aaagcaagca ttcagaagaa aaagaagcaa cctcagtaat ttagaaatca 3420
 ttttgcaatc ccttaatatc ctaaaccatca ttcatttttg ttgttggtgt tgttggtgag 3480
 acagagtctc gctctgtcgc caggctagag tgcggtggcg cgatcttgac tcaactgcaat 3540
 ctcacactcc cacaggttca ggcgattccc gtgcctcagc ctcttgagta gctgggacta 3600
 caggcacgca ccaccatgcc aggcataattt ttttgtattt tagcagagac ggggtttcac 3660
 catgttggcc aggatggtct cgagtctcct gacctcgtga tccacccgac tcggcctccc 3720
 aaagtgctgg gattacaggt gtaagccacc gtgccagcc ctaaaccatca ttcttgagag 3780
 cattgggata tctcctgaaa aggtttatga aaaagaagaa tctcatctca gtgaagaata 3840
 cttctcattt tttaaaaaag cttaaaactt tgaagttagc ttttaactta atagtatttc 3900
 ccatttatcg cagacctttt ttaggaagca agcttaatgy ctgataattt taaattctct 3960
 ctcttgaggg aaggactatg aaaagctaga attgagtggt taaagttcaa catgttattt 4020
 gtaatagatg tttgatagat tttctgctac tttgctgcta tggttttctc caagagctac 4080
 ataatttagt ttcatataaa gtatcatcag tgtagaacct aattcaattc aaagctgtgt 4140
 gtttggaaga ctatcttact atttcacaac agcctgacaa catttctata gccaaaaata 4200
 gctaaatacc tcaatcagtc tcagaatgtc attttggtac tttggtggcc acataagcca 4260
 ttattcacta gtatgactag ttgtgtctgy cagtttatat ttaactctct ttatgtctgt 4320
 ggattttttc cttcaagtt taataaattt attttcttgy attcctgata atgtgcttct 4380
 gttatcaaac accaacataa aatgatcta aacc 4414

69
72

<210> 2
 <211> 638
 <212> FRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Leu Trp Gln Leu Leu Leu Thr Leu Ala Leu Ala Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Asp Ala Phe Ser Gly Ser Glu Ala Thr Ala Ala Ile Leu Ser Arg Ala
 20 25 30

Pro Trp Ser Leu Gln Ser Val Asn Pro Gly Leu Lys Thr Asn Ser Ser
 35 40 45

Lys Glu Pro Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe
 50 55 60

Ser Cys His Trp Thr Asp Glu Val His His Gly Thr Lys Asn Leu Gly
 65 70 75 80

Pro Ile Gln Leu Phe Tyr Thr Arg Arg Asn Thr Gln Glu Trp Thr Gln
 85 90 95

Glu Trp Lys Glu Cys Pro Asp Tyr Val Ser Ala Gly Glu Asn Ser Cys
 100 105 110

Tyr Phe Asn Ser Ser Phe Thr Ser Ile Trp Ile Pro Tyr Cys Ile Lys
 115 120 125

Leu Thr Ser Asn Gly Gly Thr Val Asp Glu Lys Cys Phe Ser Val Asp
 130 135 140

Glu Ile Val Gln Pro Asp Pro Pro Ile Ala Leu Asn Trp Thr Leu Leu
 145 150 155 160

Asn Val Ser Leu Thr Gly Ile His Ala Asp Ile Gln Val Arg Trp Glu
 165 170 175

Ala Pro Arg Asn Ala Asp Ile Gln Lys Gly Trp Met Val Leu Glu Tyr
 180 185 190

70
73

Glu Leu Gln Tyr Lys Glu Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met Met Asp
195 200 205

Pro Ile Leu Thr Thr Ser Val Pro Val Tyr Ser Leu Lys Val Asp Lys
210 215 220

Glu Tyr Glu Val Arg Val Arg Ser Lys Gln Arg Asn Ser Gly Asn Tyr
225 230 235 240

Gly Glu Phe Ser Glu Val Leu Tyr Val Thr Leu Pro Gln Met Ser Gln
245 250 255

Phe Thr Cys Glu Glu Asp Phe Tyr Phe Pro Trp Leu Leu Ile Ile Ile
260 265 270

Phe Gly Ile Phe Gly Leu Thr Val Met Leu Phe Val Phe Leu Phe Ser
275 280 285

Lys Gln Gln Arg Ile Lys Met Leu Ile Leu Pro Pro Val Pro Val Pro
290 295 300

Lys Ile Lys Gly Ile Asp Pro Asp Leu Leu Lys Glu Gly Lys Leu Glu
305 310 315 320

Glu Val Asn Thr Ile Leu Ala Ile His Asp Ser Tyr Lys Pro Glu Phe
325 330 335

His Ser Asp Asp Ser Trp Val Glu Phe Ile Glu Leu Asp Ile Asp Glu
340 345 350

Pro Asp Glu Lys Thr Glu Glu Ser Asp Thr Asp Arg Leu Leu Ser Ser
355 360 365

Asp His Glu Lys Ser His Ser Asn Leu Gly Val Lys Asp Gly Asp Ser
370 375 380

Gly Arg Thr Ser Cys Cys Glu Pro Asp Ile Leu Glu Thr Asp Phe Asn
385 390 395 400

Ala Asn Asp Ile His Glu Gly Thr Ser Glu Val Ala Gln Pro Gln Arg
405 410 415

21
24.

Leu Lys Gly Glu Ala Asp Leu Leu Cys Leu Asp Gln Lys Asn Gln Asn
420 425 430

Asn Ser Pro Tyr His Asp Ala Cys Pro Ala Thr Gln Gln Pro Ser Val
435 440 445

Ile Gln Ala Glu Lys Asn Lys Pro Gln Pro Leu Pro Thr Glu Gly Ala
450 455 460

Glu Ser Thr His Gln Ala Ala His Ile Gln Leu Ser Asn Pro Ser Ser
465 470 475 480

Leu Ser Asn Ile Asp Phe Tyr Ala Gln Val Ser Asp Ile Thr Pro Ala
485 490 495

Gly Ser Val Val Leu Ser Pro Gly Gln Lys Asn Lys Ala Gly Met Ser
500 505 510

Gln Cys Asp Met His Pro Glu Met Val Ser Leu Cys Gln Glu Asn Phe
515 520 525

Leu Met Asp Asn Ala Tyr Phe Cys Glu Ala Asp Ala Lys Lys Cys Ile
530 535 540

Pro Val Ala Pro His Ile Lys Val Glu Ser His Ile Gln Pro Ser Leu
545 550 555 560

Asn Gln Glu Asp Ile Tyr Ile Thr Thr Glu Ser Leu Thr Thr Ala Ala
565 570 575

Gly Arg Pro Gly Thr Gly Glu His Val Pro Gly Ser Glu Met Pro Val
580 585 590

Pro Asp Tyr Thr Ser Ile His Ile Val Gln Ser Pro Gln Gly Leu Ile
595 600 605

Leu Asn Ala Thr Ala Leu Pro Leu Pro Asp Lys Glu Phe Leu Ser Ser
610 615 620

Cys Gly Tyr Val Ser Thr Asp Gln Leu Asn Lys Ile Met Pro
625 630 635

72
75

<210> 3
 <211> 6823
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n = a g t or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1064)..(1064)
 <223> n = a g t or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1447)..(1447)
 <223> n = a g t or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1450)..(1450)
 <223> n = a g t or c

<400> 3
 aacttanagt atcaaagcag caagtagatt tgaaggaatt gttacaatgc aattttgctt 60
 tcccgccact ttaaaatcaa ggtgtagtac tttatttact ttaggaaaat gtttgctttt 120
 tgtcataatt ccttattgca tatgagagta aatgatctat agatgaagat aataataaaa 180
 tttagagaga gaataaaaaa gaaacacttt cacagctgaa aggctgcttc ccagttagct 240
 aactgggagg agttactgaa aaagtacatt gaaaagcggc tcaggggcag gtgaattgga 300
 ctcaccaggc tctgacattc agagagatgg gaatgagtca gctcactgtc cagcacatct 360
 ttatttttatt tctcttttctt gttttatatac agaaatagat ttcttggcat tgttactgtg 420
 ggtttctatt aaggactgaa caaaagtatt aataatctga gagtatgtaa aaaaaaatte 480
 attttctcct actatactct cataacacag aatatttttg tgaccagaga tcaccaaaat 540
 gtgtgtgggtg tcaacgaaaa gagtcaaaact ctctaaaata tttgaagaga ttttttctga 600
 gccaaatgtg agtgaacatg gcctgtgaca tagccctcag gaggtcctga gaacatgtgc 660
 ccaagggtgt caggggtacag cttaggtttt atatatttta gggaggcata agacatcaat 720

23
26

caaatacatt taagaaatac gttgatttgg ttcagaaagg caggacaact caaatgggga 780
 gcttccaggc tataggtaaa ttttaacatt ttctggttga caattagttg agtttgtctg 840
 aagacctggg attaatggaa aggactattc aggttaagat atgtttctta ttggacctaa 900
 aactgtgcct ggctcttagt tgattactgc ctggatctgg gaaggaagga aggaaaacaa 960
 agggggaagg ggattctcta tagaatgtgg atttttccca taagagactt tgtagggcaa 1020
 tttcaaggca tggcaaggaa atatactttg gggctaatat tttnccttgt ctcataatgt 1080
 tatgccagag tcatattgaa aagcaagtca caatatacaa ggtcaaataa aacctctga 1140
 tgagaacca tggttttagt ggcattgactc cccagaacct ttaggttaga atttgggcaa 1200
 gataaaaaat cggaaacttag tcctcggcgg gaatctctcc ccacacaaat tctccaacag 1260
 attcttcagt gggacaccaa ctgggtggtt ctcaaattca attcaattct gaccaatcta 1320
 cctatctacc tggaaatagc atcagataac cacaggttta cggctcattc caacaatact 1380
 gtccccact tcagatgcca actgcaagta ataggttggt acctatactt ctagccagtc 1440
 agctgtnaan tgggtttccc acaacctccc cctccggttt gataatttga gacagcttgc 1500
 ttacatgtac cagcttatta gaaaggatat tacaaggac acagatgaag agatggatag 1560
 ggtaaggat gtgggttggg gttgcagagt ttccatgacc tctctgagtg cagcatcttc 1620
 atgtgttcag ctatccagaa tctctcggat taagacattg gccactggtg atcaaatcaa 1680
 ccttgagtcc ctctccccct cctgagggtg gagagtgggg ctgaagtgtc tcaacctcta 1740
 atcaactctt ggtctttcct gtgaccatgc cccatcctga ggctctccag gagccccag 1800
 gcatcagtca actcattagc atacgaaaga cacttatcac tacagagatt cgaaggattt 1860
 taggaactgt gtcaagaaac ggagacnagg tcaaatatgt atttcacaat atcaccagta 1920
 gtttcaactgg gaggtaaaac tcagtgttta ctgtgggcct gagccatgct gacctctaa 1980
 gaataactta gaggtaacgt gatcagatgt ggggaattct ggagaacac ctttcaccac 2040
 caagcccaga caagagatgc atacttttct agctgggatg cttacaaagc aaccactct 2100
 aatacttcaa ggtagagtga cactacattc atcatttttc attttttctt gttttttatg 2160
 ccatctacta ctaatgtcaa tcaaattacg actgtgttta tagtggatga attatggacc 2220
 atctcacacc ataaagtctt gtttctctca tgttgagctt ttcacctccc ttcattccct 2280
 ccctacttcc aggatcattc acatgtttat ttctaaaaat aaactttttt tactgaactt 2340

7A
77

```

tttttcatac tgtttaaaaa gaattttaiat ttctcttcat tcttacagat aagattcaag 2400
tttaaaactca aataatgtag gaaatctttt tttaaaaaat tgttccctac tgtgtctagg 2460
cgtgagaccc aaaagtaatt aagaccagggt tttcatttgc tgtgatttgt gtgagttctt 2520
tttagagggtt aggtgcaatt ttaattttta aaagggggat tattatgaga ggagaaatca 2580
tactttatca tttgaaaatg atgccataac aggtgttagc agaaaaatca aactgtaaaa 2640
tattttaaag agattttattc tgagccaata taagtgactg tggcccccatt gaaatgagcg 2700
agttccctga tccctctcac agagcttgcg acagggatgt ggctcacctg ttcagttgcc 2760
ccaccgctca aacccctagg gggagaatac agacggtcag gtgcaaaggc tggggcaagt 2820
gccttggccc cttggccct tagcccgag gtagtgtcta ggggtggggt gcctgcaacc 2880
ccagtgttac aaagttcttt cagctttgca gtccacggac agcttgagtg ttaatcagct 2940
caatggaccc tctgccttat agcaaaggca gagggccagt gtgacagctt tctgtatccc 3000
aagctcttgc ccagtgtcct agaaaaaaca gatcatcacag gggctcgaag gatgagtga 3060
aggttttatt gagtagtgga ggtggctctc agcaagatgg atggggagtg ggaagtgggg 3120
atggagtggg aaggtgaact tcctctgaag tcgggcagcc cagtggctgg actcttctcc 3180
aacctcccc aggcaagctc ctctcagcgt ccagatgttc ctcttccctc tctctctctg 3240
ccgcattcatt tcaccatctg tctgtgtgtc agctggcttg ctggtgtgct ggtctgttgg 3300
tctgtgtgtc tcttcttggg acctcagggt cagagtttat atgagtgcac gatagggggt 3360
gtttttgggc aaaaggtagc tttttggaca tgaanaacgga aatgcctgtt cccatttagg 3420
gctgcaggtc ttcaggcttg aggggtggggc ctttgcccag gaactaccct cttctaccca 3480
gtgtttccct gtctcctgtc catatcacca gtattcacag tctcaaggag tcttgagaaa 3540
gtgtgcccac ggcctgcaga ttcagtttgg ttctgtatgt ttcaggggag caggaattac 3600
aggcaaagac ataaatcagt acatgggaag tatacattgg ttactctga aaaggcagga 3660
tgtcttgaag tggggacttg caggtcatag tttggttcag agattcttta atctgcagtt 3720
ggttaaagga acaaaaactgt acagaagctt cgagttagca aaaagaaata tttaaatcaa 3780
gataaggatg ctatgtcaga gtcagccaca aaatgacctg tttagcaaga ttaatggcct 3840
atagggtgtg ctttaaccct gccttgcctg gcctaagggt ttgtttataa tttagtatct 3900
tattgcccac agagtctatt tagtcagtct tatgatctct actttaacat taatgctggt 3960
cacttgtgcc taaactccaa aggggaggta tatccaacct gccttcccat tgtggccagg 4020

```

28
28

aacctttctc tggagtcctc ttggccaaga aggggtccat tgggttgggt tgggaagctg 4080
 aggatthttgt ttttagttta cacaggggtca tatcagattg ttttgatggg gatgactaat 4140
 ggtttttctc tctttctgtt tcagccacag cagctatcct tagcagagca ccctggagtc 4200
 tgcaaagtgt taatccaggc ctaaagacaa gtaagaattt cagtcctttt tcttccttca 4260
 atgatatttt ccatgtttta gtgtaattaa gctactatcc tttctctatt ttatttggga 4320
 tggtagtaac tggaaatagt actgagttga aattttatag gcaagcaaaa cattttttta 4380
 ggattttatt ttttaacttct gatatagttt ggatgtttgt cccttccaaa tctcatgtaa 4440
 tccccaatgt tggaaagtga gactgggagg agatgttttg gtcattgtggg cagattcctc 4500
 atgaatgggt tagcaccctc ctctttgtgc tgtcctcacc atgagttagt tctcatgaga 4560
 tctggttgtt taaaagtgtg tggcacctcc cccttcaatc tcttgcctcc actctgcctc 4620
 tgtgagacac ctgctccgct tcaccatgat tataggcttc ctgaggcttt caccagaagc 4680
 agatgctaat acagcctgca gaactgtgag ccattttaat catttttctt tataaatcac 4740
 ccagcctcag gtactttttt atagcaatga aagcaaaacta atacaacttc tgtgcaaggc 4800
 tgcttttttt tctatttttt gcttgtgctt gaaggttaag taaggccaaa ttaatgaagg 4860
 agggaaaaag aggaatgat acatcatgga tcaacaatta tttattgaat ttaggaaact 4920
 gcctcttttt ataaattctt tttaaaatta ttttcattat tatcttgaag tatttatcta 4980
 aggtttacac tggtagaaag ttaaacttgt ctctccaacc aaattgcctt aagcttcaaa 5040
 attatgcctt attgtaagct ctttcttaac cttaaaatga ctttacacat tccccgtgg 5100
 tcttttgaca atctcctctt caaccacaag acagaacccc accatcaact ctgtggggaa 5160
 gcgtctccaa attctctagt cctgaacnac atgctgcctt ctctgcttcc atggaacttt 5220
 gtcttttaca acatgatagc gtttgcttcc tgacatttta gtgtgtgtgt tagccctgca 5280
 tatagaactc accagattgt gtggctctga tgaatgaatt aattctattg aactttaagg 5340
 caaagcctaa actttatgct tcttctaaat cccttacatc tcttaaaaaa attctgatcc 5400
 atagtagtag gtacttggtt aattaaattt tagggatgga tatttttcat cagtgggaagt 5460
 atatgctaga gtccatatta tgcaataagg gaagggaaga cagtgtacct aaatcagtta 5520
 agatattgct attcttggtg ttattctaaa tcagttaaga tattgctatt cttgttggtt 5580
 ttctagagtc acgaatcat aatttgaatt ttatgactaa attgcagaat taatttccaa 5640

76
79

tgtgagattt taacattatt tccttggagg tgaccaaaaa ggagagctgg tactgttttt 5700
aacaactgtc attcaattgt cagttgtgcc agaccacaaa tcctttatag ccctcctgtt 5760
taagaagcat ctgacatgtt aagctgctcc ctaattaaca cagaggttgt aaaagaagtg 5820
gctgttttgt tctgtttggg tttcccagcc agtatattcc aaagcctttt ttcactcaac 5880
agatgagtta tgtgctttat attctgtaag gaaatgagaa gtaatcagtt gaaaatgtgt 5940
tactaatggt acatgcttca cattgaancc atcctcctga cacaaacata atactttgcc 6000
cttcactgtc ccccaagtg gcagtaggat ttctctaagt aattttcttt acttatatga 6060
gtgcaggata gggggtgttt tgggccaaaa ggtagctttt tggacatgaa aacggaatg 6120
cctgttccca tttagggctg caggtcttca ggcttgaggg tggggccttt gccaggaac 6180
taccctcttc taccagtgt ttccctgtct cctgtccata tcaccagtat tcacagtctc 6240
aaggagtctt gagaaagtgt gcccaaggcc gtcagattca gtttggttct gtatgtcaca 6300
gggtctaaga agcgtaacaa ttgtgccttg ttgaataca gcctctaggt atggaggatg 6360
tgttgaacaa cttcctacca gtcatttggc atatgttgat ttccctgtct catgatacgt 6420
aagacgacta gctaattatc attcatatgt ggttaagtcac atagatactg acttccccta 6480
tctttccagc tttttcttat caaaagtcac ctgctctctg tcccaggaac gactggctaa 6540
agtaacctat atcagtgtct gtaacagtgg gcacctatca tagtgcacat gcttgaacat 6600
atcattgcct tttatcatca cgagcctcac atccagatgt gacagactca agtgctcaca 6660
tcacctcact ctgtcactgt atacattgtt accgtgtcac aaatatttaa cagtctgctg 6720
tgtactcagt ctttagctgt gtgccctgag ggagacagag taagatactg ccttgacatc 6780
aaggagctcc atagtgcaca tgcttgaaca tatcattgcc ttt 6823

<210> 4
<211> 1474
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
aatctttttt taaaaattg ttccctactg tgtctagggc tgagacccaa aagtaattaa 60
gaccaggttt tcatttgctg tgatttgtgt gagttctttt tagaggttag gtgcaatttt 120
aattttttaa agggggatta ttatgagagg agaaatcata ctttatcatt tgaaaatgat 180
gccataacag gtgttagcag aaaaatcaa ctgtanaata ttttaaagag atttattctg 240

77
80

agccaatata agtgactgtg gcccattga aatgagcag tteectgac cctctcacag 300
agcttgcgac agggatgtgg ctcacctgtt cagttgcccc accgctcaaa cccctagggg 360
gagaatacag acggtcaggt gcaaaggctg gggcaagtgc cttggccctt tggccctta 420
gccccgaggt agtgtctagg ggtggggtgc ctgcaacccc agtgttacaa agttctttca 480
gctttgcagt ccacggacag cttgagtgtt aatcagctca atggaccctc tgccttatag 540
caaaggcaga gggccagtgt gacagcttcc tgtatcccaa gctcttgccc agtgtcctag 600
aaaaaacaga tcatacaggg gctcgaagga tgagtgcagg gttttattga gtagtggagg 660
tggctctcag caagatggat ggggagtggt aagtggggat ggagtgggaa ggtgaacttc 720
ctctgaagtc gggcagccca gtggctggac tcttctccaa cctccccag gcaagctcct 780
ctcagcgtcc agatgttctt cttccctctc tctctctgcc gcattcttc accatctgtc 840
tgctggtcag ctggcttgtt ggtgtgctgg tctgttggtc tgctggcttg cttctggaac 900
ctcaggttca gagtttata gagtgcagga tagggggtgt tttgggcca aaggtagctt 960
tttggacatg aaacggaaa tgcctgttcc catttagggc tgcaggtctt caggcttgag 1020
ggtggggcct ttgccagga actacctct tctaccagt gtttcctgt ctcctgtcca 1080
tatcaccagt attcacagtc tcaaggagtc ttgagaaagt gtgccaagg ccgtcagatt 1140
cagtttggtt ctgtatgtca cagggctctaa gaagcgtaaa cattgtgcct tgttgaata 1200
cagcctctag gtatggagga tgtgttgaac aacttcctac cagtcatttg gcatatgttg 1260
atttcctgtc ttcattgata gtaagacgac tagctaatta tcattcatat gtggttaagtc 1320
acatagatac tgacttcccc tatctttcca gctttttctt atcaaaagtc acctgctctc 1380
tgtcccagga acgactggct aaagtaacct atatcagtgt ctgtaacagt gggcacctat 1440
catagtgcac atgcttgaac atatcattgc cttt 1474

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
tgtgctggtc tgttggctctg 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA

98
81

<213> Homo sapiens

<400> 6

agtcggttcct gggacagaga

20

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cctggattaa cactttgcag actc

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/IB2005/002086

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68 G01N33/74

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)

IPC 7 C12Q 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 practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DOS SANTOS CHRISTINE ET AL: "A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone." NATURE GENETICS. JUL 2004, vol. 36, no. 7, July 2004 (2004-07), pages 720-724, XP002346194 ISSN: 1061-4036 tables 2,3 -/-	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in 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 such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 September 2005

Date of mailing of the international search report

10/10/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 6616 Patentkanal 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 851 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Knudsen, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB2005/002086

88
83

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SEIDEL B ET AL: "Association between the GH receptor/exon 3 genotype and the level of exon 3-positive GH-binding protein in human serum." EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, vol. 148, no. 3, March 2003 (2003-03), pages 317-324, XP002346195 ISSN: 0804-4643 page 318, left-hand column, paragraph 1	1-15
A	GODDARD A D ET AL: "PARTIAL GROWTH-HORMONE INSENSITIVITY: THE ROLE OF GROWTH-HORMONE RECEPTOR MUTATIONS IN IDIOPATHIC SHORT STATURE" JOURNAL OF PEDIATRICS, MOSBY-YEAR BOOK, ST. LOUIS, MO, US, vol. 131, no. 1, PART 2, SUPPL, July 1997 (1997-07), pages S51-S56, XP009025507 ISSN: 0022-3476 abstract	1-15
A	GASTIER J M ET AL: "DIVERSE DELETIONS IN THE GROWTH HORMONE RECEPTOR GENE CAUSE GROWTH HORMONE INSENSITIVITY SYNDROME" HUMAN MUTATION, WILEY-LISS, NEW YORK, NY, US, vol. 16, no. 4, October 2000 (2000-10), pages 323-333, XP009025429 ISSN: 1059-7794 abstract	1-15
A	PANTEL J ET AL: "HETEROZYGOUS NONSENSE MUTATION IN EXON 3 OF THE GROWTH HORMONE RECEPTOR (GHR) IN SEVERE GH INSENSITIVITY (LARON SYNDROME) AND THE ISSUE OF THE ORIGIN AND FUNCTION OF THE GHRD3 ISOFORM" JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, NEW YORK, NY, US, vol. 88, no. 4, April 2003 (2003-04), pages 1705-1710, XP009025421 ISSN: 0021-972X abstract	1-15
P,X	WO 2004/056864 A (PHARMACIA AB; BOUGNERES, PIERRE) 8 July 2004 (2004-07-08) page 3, paragraph 1 page 16, lines 12-21; example 2	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/IB2005/002086

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 2004056864	A	08-07-2004	AU EP	2003278503 A1 1572738 A1	14-07-2004 14-09-2005

PROCEDIMIENTOS PARA PREDECIR LA RESPUESTA TERAPÉUTICA
FRENTE A AGENTES QUE FUNCIONAN SOBRE EL RECEPTOR DE LA
HORMONA DEL CRECIMIENTO

5

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a procedimientos para predecir la magnitud de la respuesta terapéutica de un sujeto frente a agentes que funcionan sobre el receptor de la hormona del crecimiento. Los aspectos preferidos incluyen procedimientos para aumentar la altura de sujetos humanos que tienen baja
10 estatura, y para tratar la obesidad y acromegalia.

ANTECEDENTES

La mayoría de los niños con baja estatura significativa no tienen deficiencia de hormona del crecimiento (GHD) como se define clásicamente por la respuesta de GH frente a estímulos desencadenantes. Una vez se han
15 excluido las causas conocidas de baja estatura, estos sujetos se clasifican con diversos términos, incluyendo baja estatura familiar, retraso constitucional del crecimiento, "muy bajo peso al nacer" (VLBW), baja estatura "Idiopática" (ISS). El caso de niños que han nacido bajos de padres de tamaño normal se llama "retardo del crecimiento intrauterino" (IUGR). Los niños que han nacido bajos
20 para su edad se llaman "pequeños para la edad gestacional" (SGA). Algunos, y presumiblemente una gran cantidad de estos niños puede no alcanzar su potencial genético para la altura, aunque no se ha informado de los resultados

de estudios de longitud a gran escala. Como hay muchos factores que contribuyen al crecimiento y desarrollo normales, es probable que sujetos con ISS, IUGR, SGA como se han definido, sean heterogéneos con respecto a su etiología de baja estatura. A pesar de no ser clásicamente deficientes en GH, la
5 mayoría de los niños con ISS responden al tratamiento con GH, aunque no todos igualmente bien.

Muchos investigadores han buscado los trastornos en la secreción de GH espontánea en este conjunto de sujetos. Una hipótesis sugiere que algunos de estos sujetos tienen una secreción inadecuada de GH endógena en
10 condiciones fisiológicas, pero son capaces de demostrar un aumento de GH en respuesta a estímulos farmacológicos, como en ensayos de estimulación de GH tradicionales. Este trastorno se ha llamado "disfunción neurosecretora de GH", y el diagnóstico se basa en la demostración de un patrón de GH en circulación anormal en una toma de muestras de suero prolongada. Varios
15 investigadores han informado de resultados de dichos estudios, y han descubierto que esta anomalía está sólo presente ocasionalmente. Otros investigadores han postulado que estos sujetos tienen "GH bioinactiva"; sin embargo, esto aún no se ha demostrado de manera concluyente.

Cuando se clonó el receptor de GH (GHR), se demostró que la actividad
20 de unión de GH principal en sangre se debía a una proteína que se obtiene del mismo gen que el GHR y corresponde al dominio extracelular del GHR de longitud completa. Casi todos los sujetos con síndrome de insensibilidad a la

hormona del crecimiento (o de Laron) (GHIS) carecen de actividad de unión al receptor de la hormona del crecimiento y tienen actividad de proteína de unión de GH (GHBP) ausente o muy baja. Dichos sujetos tienen un valor de desviación típica de altura medio (SDS) de aproximadamente -5 a -6, son
5 resistentes a tratamiento con GH, y tienen concentraciones en suero aumentadas de GH y bajas concentraciones en suero de factor de crecimiento tipo insulina (IGF-I). Responden al tratamiento con IGF-I. En sujetos con defectos en el dominio extracelular del GHR, la carencia de GHBP funcional en la circulación puede servir como marcador para la insensibilidad a GH.

10 Los sujetos con ISS que son tratados con GH exógena han mostrado diferentes proporciones de respuesta al tratamiento. En particular, muchos niños responden en cierta medida, pero no completamente, al tratamiento con GH. Estos sujetos tienen un aumento en sus velocidades de crecimiento que es sólo aproximadamente la mitad que la de los niños que responden
15 completamente. El aumento de altura total de los niños después del curso del tratamiento se reduce, por lo tanto, frente al de los niños que responden completamente, dependiendo de la duración del tratamiento. Un modo de mejorar el tratamiento de sujetos que no responden completamente ha sido aumentar la dosificación de GH, que ha dado como resultado velocidades de
20 crecimiento mejoradas en cierta medida y una ganancia de altura total. Sin embargo, la dosificación de GH aumentada no es deseable para todos los sujetos debido a los efectos secundarios potenciales. La dosificación de GH

aumentada también implica un coste aumentado. Desafortunadamente no hay actualmente ningún procedimiento para identificar sujetos con probabilidad de ser menos sensibles antes de un tratamiento y un periodo de observación prolongados.

5 Hay, por lo tanto, una necesidad en la técnica de procedimientos que puedan usarse para identificar un subconjunto de sujetos que muestren proporciones de respuesta disminuida frente al tratamiento con GH. También hay una necesidad de procedimientos que permitan el desarrollo de medicamentos mejorados para el tratamiento de sujetos que tienen respuesta
10 disminuida frente a GH exógena. También hay una necesidad en la técnica de procedimientos que puedan usarse para identificar un subconjunto de sujetos que muestren proporciones de respuesta aumentadas frente a GH y una necesidad de procedimientos que permitan el desarrollo de medicamentos mejorados para el tratamiento de sujetos que tengan una respuesta aumentada
15 frente a GH.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la identificación de un alelo e isoforma de GHR como un factor importante que contribuye a diferencias en la respuesta positiva frente a GH exógena. La invención por tanto proporciona un
20 procedimiento para predecir el grado de una respuesta positiva frente al tratamiento con compuestos que funcionan mediante la vía GHR, o preferiblemente compuestos que se unen al GHR, tal como composiciones de

GH. Los procedimientos permiten la clasificación de pacientes a priori como, por ejemplo, de alta o baja respuesta. Permitir que un tratamiento se adapte a un sujeto particular da como resultado beneficios económicos y/o efectos secundarios reducidos (por ejemplo, del uso de una dosificación apropiada de composiciones de GH o del uso de un compuesto al que los sujetos no muestran respuesta GHR disminuida).

La invención demuestra que sujetos homocigóticos para el alelo GHRf1 muestran velocidades de crecimiento y cambios de altura en respuesta al tratamiento con GH que son mayores que en sujetos heterocigóticos u homocigóticos para el alelo GHRd3. La invención también demuestra que sujetos heterocigóticos para el alelo GHRd3 muestran velocidades de crecimiento y cambios de altura en respuesta al tratamiento con GH que son superiores que en sujetos homocigóticos para el alelo GHRd3.

La presente invención por tanto proporciona procedimientos para determinar o predecir la actividad mediada por GHR, incluyendo procedimientos para predecir la respuesta GHR al tratamiento, y procedimientos para identificar un sujeto en riesgo de o diagnosticar una afección relacionada con la actividad de GHR disminuida. Preferiblemente la invención proporciona procedimientos para predecir la respuesta de un sujeto frente a un agente capaz de interactuar con (por ejemplo, unirse a) un polipéptido GHR.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un

procedimiento para predecir la respuesta de un sujeto frente a un agente capaz de unirse a una proteína GHR, que comprende determinar en el sujeto la presencia o ausencia de un alelo del gen de GHR, donde el alelo está correlacionado con la probabilidad de tener una respuesta positiva aumentada o disminuida frente a dicho agente, identificando de este modo el sujeto que tiene una probabilidad aumentada o disminuida de responder frente al tratamiento con dicho agente. Preferiblemente, el procedimiento comprende determinar en un sujeto la presencia o ausencia de un alelo GHRd3 y/o un alelo GHRf1 del gen de GHR, donde el alelo GHRd3 está correlacionado con una probabilidad de tener una respuesta positiva disminuida frente a dicho agente y el alelo GHRf1 está correlacionado con una probabilidad de tener una respuesta positiva aumentada frente a dicho agente. Preferiblemente, dicho agente se usa para aumentar la altura o velocidad de crecimiento de un sujeto.

La presente invención también proporciona un procedimiento para predecir la respuesta de un sujeto frente a un agente para aumentar la altura o velocidad de crecimiento de un sujeto, que comprende determinar en un sujeto la presencia o ausencia de un alelo del gen de GHR, donde el alelo está correlacionado con una probabilidad de tener una respuesta positiva aumentada o disminuida frente a dicho agente, identificando de este modo el sujeto que tiene una probabilidad aumentada o disminuida de responder frente al tratamiento con dicho agente. Preferiblemente, el procedimiento comprende determinar en un sujeto la presencia o ausencia de un alelo GHRd3 y/o un

alelo GHRf1 del gen de GHR, donde el alelo GHRd3 está correlacionado con una probabilidad de tener una respuesta positiva disminuida frente a dicho agente y el alelo GHRf1 está correlacionado con una probabilidad de tener una respuesta positiva aumentada frente a dicho agente.

5 La invención también proporciona un procedimiento para predecir la respuesta de un sujeto frente a un agente para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno que implica GHR, comprendiendo dicho procedimiento: determinar en el sujeto la presencia o ausencia de un alelo del gen de GHR, donde el alelo está correlacionado con una probabilidad de tener
10 una respuesta positiva disminuida o aumentada frente a dicho agente, identificando de este modo el sujeto que tiene una probabilidad aumentada o disminuida de responder frente al tratamiento con dicho agente.

Preferiblemente, los procedimientos de la invención comprenden determinar en un sujeto la presencia o ausencia de un alelo de GHR que tiene
15 una delección, inserción o sustitución de uno o más ácidos nucleicos en el exón 3, o más preferiblemente que tienen una delección de sustancialmente el exón 3 completo. En una realización preferida de los procedimientos anteriores, dicho alelo del gen de GHR es el alelo GHRd3 y/o GHRf1.

Preferiblemente, dicho sujeto tiene una baja estatura. Más
20 preferiblemente, dicho sujeto que tiene una baja estatura tiene baja estatura idlopática (ISS), muy bajo peso al nacer (VLBW), retardo del crecimiento intrauterino (IUGR), o es pequeño para la edad gestacional (SGA). Aún mas

preferiblemente, dicho sujeto es SGA. Como alternativa, dicho sujeto padece de cualquier enfermedad o trastorno que implica GHR.

En una realización preferida, dicho alelo GHRd3 está correlacionado con una probabilidad de tener una respuesta positiva disminuida frente a dicho agente (en comparación con un sujeto que tiene un alelo GHRf1). En otra realización preferida, dicho alelo GHRf1 está correlacionado con una probabilidad de tener una respuesta positiva aumentada frente a dicho agente (en comparación con un sujeto que tiene un alelo GHRd3). En una realización, dicho agente es un antagonista de GHR tal como pegvisomant. En otra realización, dicho agente es un agonista de GHR. Preferiblemente, dicho agente es una composición de GH, más preferiblemente somatropina.

Los procedimientos de la invención pueden usarse de manera particularmente ventajosa en procedimientos de tratamiento que comprenden genotipificar un alelo de un gen de GHR, más preferiblemente un alelo GHRd3 y/o GHRf1. Dicha genotipificación es indicativa de la eficacia o beneficios terapéuticos de dicha terapia. En un ejemplo, los procedimientos de la invención se usan para determinar la cantidad de un medicamento a administrar a un sujeto. En otro ejemplo, los procedimientos se usan para evaluar la respuesta terapéutica de sujetos en ensayo clínico o para seleccionar sujetos para la inclusión en un ensayo clínico. Por ejemplo, los procedimientos de la invención pueden comprender determinar el genotipo de un sujeto en el exón 3 del gen de GHR, donde dicho genotipo sitúa a dicho

sujeto en un subgrupo en un ensayo clínico o en un subgrupo para inclusión en un ensayo clínico.

La invención también proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto que padece de una enfermedad o un trastorno que implica GHR, comprendiendo el procedimiento:

- (a) determinar en el sujeto la presencia o ausencia de un alelo del gen de GHR, donde el alelo está correlacionado con una probabilidad de tener una respuesta positiva aumentada o disminuida frente a un agente capaz de unirse a una proteína GHR o funcionar mediante la vía GHR; y
- (b) seleccionar o determinar una cantidad eficaz de dicho agente para administrar a dicho sujeto.

Preferiblemente, el procedimiento comprende determinar la presencia o ausencia de un alelo GHRd3 y/o un alelo GHRf1 del gen de GHR, donde el alelo GHRd3 está correlacionado con una probabilidad de tener una respuesta positiva disminuida frente a un agente capaz de unirse a una proteína GHR o funcionar mediante la vía GHR y el alelo GHRf1 está correlacionado con una probabilidad de tener una respuesta positiva aumentada frente a dicho agente. Preferiblemente, dicho agente se usa para aumentar la altura o velocidad de crecimiento de un sujeto.

En realizaciones particularmente preferidas, la invención describe un procedimiento para aumentar el crecimiento de un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

(a) determinar en un sujeto la presencia o ausencia de un alelo del gen de GHR, donde el alelo está correlacionado con la probabilidad de tener una respuesta positiva aumentada o disminuida frente a un agente capaz de aumentar el crecimiento de un sujeto; y

- 5 (b) seleccionar o determinar una cantidad eficaz de dicho agente para administrar a dicho sujeto.

En un aspecto preferido, la invención describe un procedimiento para aumentar la velocidad de crecimiento de un sujeto humano, comprendiendo dicho procedimiento:

- 10 (a) detectar si el sujeto tiene una altura menor de aproximadamente 1 desviación típica, o más preferiblemente menos de aproximadamente 2 desviaciones típicas por debajo de la normal para la edad y sexo,

(b) detectar si el ADN del sujeto codifica un polipéptido GHRd3 y/o GHRf1; y,

- 15 (c) administrar al sujeto una cantidad eficaz de GH que aumente la velocidad de crecimiento del sujeto.

Un agente capaz de unirse a una proteína GHR o funcionar mediante la vía GHR de acuerdo con cualquiera de los procedimientos de la invención es preferiblemente un agente eficaz en el tratamiento de un trastorno o una
20 enfermedad que implica GHR. En una realización, dicho agente o medicamento es un antagonista de GHR. En otra realización, dicho agente o medicamento es un agonista de GHR. Dicho agente o medicamento es preferiblemente una

composición de GH. En una realización preferida, dicho agente o medicamento es somatropina. En otra realización preferida, dicho agente o medicamento es pegvisomant.

Preferiblemente, dicho sujeto tiene baja estatura. Más preferiblemente, dicho sujeto que tiene baja estatura tiene baja estatura idiopática (ISS), muy bajo peso al nacer (VLBW), retardo del crecimiento intrauterino (IUGR), o es pequeño para la edad gestacional (SGA). Aún más preferiblemente, dicho sujeto es SGA. Como alternativa, dicho sujeto padece de cualquier enfermedad o trastorno que implica GHR.

En una realización preferida, dicho alelo GHRd3 está correlacionado con una respuesta positiva disminuida frente a dicho medicamento (en comparación con un sujeto que tiene un alelo GHRf1). En otra realización preferida, dicho alelo GHRf1 está correlacionado con una respuesta positiva aumentada frente a dicho medicamento (en comparación con un sujeto que tiene un alelo GHRd3).

Preferiblemente, dichos procedimientos para tratar un sujeto humano comprenden administrar a un sujeto homocigótico o heterocigótico para el alelo GHRd3 una dosis eficaz de un agente o medicamento que es mayor que la dosis eficaz que se administraría a un sujeto homocigótico idéntico por lo demás para el alelo GHRf1. Como alternativa, dichos procedimientos para tratar un sujeto humano comprenden administrar a un sujeto homocigótico para el alelo GHRd3 una dosis eficaz de un agente o medicamento que es mayor

que la dosis eficaz que se administraría a un sujeto homocigótico o heterocigótico idéntico por lo demás para el alelo GHRf1.

En aspectos preferidos, dicho agente es una molécula GH. Preferiblemente, la cantidad eficaz de GH administrada a un sujeto está entre
5 aproximadamente 0,001 mg/kg/día y aproximadamente 0,2 mg/kg/día; más preferiblemente, la cantidad eficaz de GH está entre aproximadamente 0,01 mg/kg/día y aproximadamente 0,1 mg/kg/día. En otros aspectos, la cantidad eficaz de GH administrada a un sujeto es al menos aproximadamente 0,2 mg/kg/semana. En otro aspecto, la cantidad eficaz de GH es al menos
10 aproximadamente 0,25 mg/kg/semana. En otro aspecto, la cantidad eficaz de GH es al menos aproximadamente 0,3 mg/kg/semana. Preferiblemente, la GH se administra una vez al día. Preferiblemente la GH se administra por inyecciones subcutáneas. Más preferiblemente, la hormona del crecimiento se formula a un pH de aproximadamente 7,4 a 7,8.

15 Otro aspecto de la invención concierne a un procedimiento para usar un medicamento que comprende: obtener una muestra de ADN de un sujeto, determinar si la muestra de ADN contiene un alelo GHRf1 asociado con una respuesta positiva aumentada frente al medicamento y/o si la muestra de ADN contiene un alelo GHRd3 asociado con una respuesta positiva disminuida
20 frente al medicamento, y administrar una cantidad eficaz del medicamento al sujeto si la muestra de ADN contiene un alelo GHRf1 asociado con una respuesta positiva aumentada frente al medicamento y/o si la muestra de ADN

carece de un alelo GHRd3 asociado con una respuesta positiva disminuida frente al medicamento.

Como se analiza, los procedimientos comprenden determinar en el sujeto la presencia o ausencia de un alelo GHR que tiene una delección, inserción o sustitución de uno o más ácidos nucleicos en el exón 3, o más preferiblemente tiene una delección de sustancialmente el exón 3 completo. Un alelo del gen de GHR asociado con una respuesta positiva disminuida frente al medicamento es un alelo GHR que carece del exón 3, preferiblemente un alelo GHRd3. Un alelo del gen de GHR asociado con una respuesta positiva aumentada frente al medicamento es preferiblemente un alelo GHR (GHRf1) que contiene el exón 3.

La invención también concierne a un procedimiento para el ensayo clínico de un medicamento, comprendiendo el procedimiento:

- (a) administrar un medicamento a una población de individuos; y
- (b) a partir de dicha población, identificar una primera subpoblación de individuos cuyo ADN codifique una isoforma del polipéptido GHRd3 y una segunda subpoblación de individuos cuyo ADN no codifique una isoforma del polipéptido GHRd3.

Como alternativa, la invención concierne a un procedimiento para el ensayo clínico de un medicamento, comprendiendo el procedimiento:

- (a) administrar un medicamento a una población de individuos; y
- (b) a partir de dicha población, identificar una primera subpoblación de

individuos cuyo ADN codifique una isoforma del polipéptido GHRf1 y una segunda subpoblación de individuos cuyo ADN no codifique una isoforma del polipéptido GHRf1.

Dicho procedimiento también puede comprender: (a) evaluar la
5 respuesta frente a dicho medicamento en dicha primera subpoblación de individuos; y/o (b) evaluar la respuesta frente a dicho medicamento en dicha segunda subpoblación de individuos. Preferiblemente, la respuesta frente a dicho medicamento se evalúa tanto en dicha primera como en dicha segunda subpoblación de individuos. Preferiblemente, dicha respuesta se evalúa por
10 separado en dicha primera y segunda subpoblación de individuos. Evaluar la respuesta frente a dicho medicamento preferiblemente comprende determinar el cambio en la altura de un sujeto.

La invención también concierne un procedimiento para el ensayo clínico de un medicamento, comprendiendo el procedimiento:

15 (a) identificar una primera población de individuos cuyo ADN codifique un polipéptido GHRd3 y una segunda población de individuos cuyo ADN no codifique un polipéptido GHRd3; y

(b) administrar un medicamento a individuos de dicha primera y/o dicha segunda población de individuos.

20 En una realización, el medicamento se administra a individuos de dicha primera población pero no a individuos de dicha segunda población. En una realización, el medicamento se administra a individuos de dicha segunda

población pero no a individuos de dicha primera población. En otra realización, el medicamento se administra a los individuos tanto de dicha primera como de dicha segunda población.

Como alternativa, la invención concierne a un procedimiento para el
5 ensayo clínico de un medicamento, comprendiendo el procedimiento:

(a) identificar una primera población de individuos cuyo ADN codifique un polipéptido GHRf1 y una segunda población de individuos cuyo ADN no codifique un polipéptido GHRf1; y

(b) administrar un medicamento a individuos de dicha primera y/o dicha
10 segunda población de individuos.

En una realización, el medicamento se administra a individuos de dicha primera población pero no a individuos de dicha segunda población. En una realización, el medicamento se administra a individuos de dicha segunda población pero no a individuos de dicha primera población. En otra realización,
15 el medicamento se administra a los individuos tanto de dicha primera como de dicha segunda población.

El medicamento de acuerdo con los procedimientos precedentes es preferiblemente un medicamento para el tratamiento de baja estatura, obesidad, infección, o diabetes; acromegalia o afecciones de gigantismo que
20 podrían estar asociadas con efectos lactogénicos, diabetogénicos, lipolíticos y anabólicos de proteínas; afecciones asociadas con retención de sodio y agua; síndromes metabólicos; trastornos del estado de ánimo y el sueño, cáncer,

enfermedad cardíaca e hipertensión.

Un aspecto preferido de la invención se refiere a un procedimiento para el ensayo clínico de un medicamento, preferiblemente un medicamento capaz de aumentar la velocidad de crecimiento de un sujeto humano, que comprende:

5 (a) administrar un medicamento, preferiblemente un medicamento capaz de aumentar la velocidad de crecimiento de un sujeto humano, a una población de individuos; y

(b) a partir de dicha población, identificar una primera subpoblación de individuos cuyo ADN codifique una isoforma del polipéptido GHRd3 y una
10 segunda subpoblación de individuos cuyo ADN no codifique una isoforma del polipéptido GHRd3.

Otro aspecto preferido de la invención se refiere a un procedimiento para el ensayo clínico de un medicamento, preferiblemente un medicamento capaz de aumentar la velocidad de crecimiento de un sujeto humano, que comprende:

15 (a) administrar un medicamento, preferiblemente un medicamento capaz de aumentar la velocidad de crecimiento de un sujeto humano, a una población de individuos; y

(b) a partir de dicha población, identificar una primera subpoblación de individuos cuyo ADN codifique una isoforma del polipéptido GHRf1 y una
20 segunda subpoblación de individuos cuyo ADN no codifique una isoforma del polipéptido GHRf1.

Preferiblemente, dicho sujeto tiene baja estatura. Más preferiblemente,

dicho sujeto que tiene baja estatura tiene baja estatura idiopática (ISS), muy bajo peso al nacer (VLBW), retardo del crecimiento intrauterino (IUGR), o es pequeño para la edad gestacional (SGA). Aún mas preferiblemente, dicho sujeto es SGA. Como alternativa, dicho sujeto padece de cualquier enfermedad o trastorno que implica GHR. En una realización, el medicamento se administra a individuos de dicha primera población pero no a individuos de dicha segunda población. En una realización, el medicamento se administra a individuos de dicha segunda población pero no a individuos de dicha primera población. En otra realización, el medicamento se administra a los individuos tanto de dicha primera como de dicha segunda población.

Evaluar la respuesta frente a un medicamento capaz de aumentar la velocidad de crecimiento de un sujeto humano o capaz de mejorar ISS, VLBW, IUGR o SGA comprende evaluar el cambio en la altura de un individuo. Aumentar la velocidad de crecimiento de un sujeto humano incluye no sólo la situación en la que el sujeto alcanza al menos la misma altura máxima que sujetos deficientes en GH tratados con GH (es decir, sujetos diagnosticados con GHD), sino que también se refiere a una situación en la que el sujeto alcanza la altura a la misma velocidad de crecimiento que sujetos deficientes en GH tratados con GH, o consigue la altura adulta que está en el intervalo de altura diana, es decir, una altura final consistente con su potencial genético como se determina por la altura diana parental media.

En un aspecto de cualquiera de los procedimientos de la invención, la

99
102

etapa de determinar si el ADN del sujeto codifica una isoforma del polipéptido GHR particular puede realizarse usando una molécula de ácido nucleico que se une específicamente a una molécula de ácido nucleico de GHR. En otro aspecto, la etapa de determinar si el ADN del sujeto codifica una isoforma del polipéptido GHR se realiza usando una molécula de ácido nucleico que se une específicamente a una molécula de ácido nucleico de GHR. Preferiblemente, los procedimientos de la invención comprenden determinar si el ADN de un individuo codifica una proteína o polipéptido GHRd3. Como alternativa, los procedimientos de la invención comprenden determinar si el ADN de un individuo codifica una proteína o polipéptido GHRf1. Sin embargo, los procedimientos de la invención pueden comprender determinar si el ADN de un individuo codifica proteínas o polipéptidos GHRd3 y GHRf1. Por tanto, esto puede comprender determinar si el ADN genómico de un individuo comprende un alelo GHRd3 o GHRf1, si el ARNm obtenido de un individuo codifica un polipéptido GHRd3 o GHRf1, o si el sujeto expresa un polipéptido GHRd3 o GHRf1.

Por ejemplo, en cualquiera de las realizaciones anteriores, determinar si el ADN de un individuo codifica un polipéptido GHRd3 o GHRf1 puede comprender:

- (a) proporcionar una muestra biológica;
- (b) poner en contacto dicha muestra biológica con:
 - l) un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con un

alelo GHR, preferiblemente un ácido nucleico de GHRd3 o GHRf1; o

ii) un polipéptido detectable que se une selectivamente a un alelo GHR, preferiblemente un polipéptido GHRd3 o GHRf1; y

(c) detectar la presencia o ausencia de hibridación entre dicho
5 polinucleótido y una especie de ARN en dicha muestra, o la presencia o
ausencia de unión de dicho polipéptido detectable con un polipéptido en dicha
muestra.

Preferiblemente, la muestra biológica se pone en contacto con un
polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con un ácido nucleico de
10 GHRd3 o GHRf1 o un polipéptido detectable que se une selectivamente a un
polipéptido GHRd3 o GHRf1, donde una detección de dicha hibridación o de
dicha unión indica que dicho GHRd3 o GHRf1 se expresa en dicha muestra.

Preferiblemente, dicho polinucleótido es un cebador, y dicha hibridación
se detecta por detección de la presencia de un producto de amplificación que
15 comprende dicha secuencia cebadora. Preferiblemente, dicha etapa de
genotipificación comprende una realización por separado en electroforesis de
poliacrilamida y tinción con plata. Preferiblemente, dicho polipéptido detectable
es un anticuerpo. Detectar los polipéptidos o ácidos nucleicos de GHRd3 y
GHRf1 puede realizarse por cualquier procedimiento apropiado. Por ejemplo,
20 puede evaluarse un nivel en suero del dominio extracelular de GHRd3 o GHRf1
(por ejemplo, la proteína de unión a GH de alta afinidad). Las sondas o
cebadores oligonucleotídicos que hibridan específicamente con una secuencia

ADNc o genómica de GHRd3 también son parte de la presente invención, así como procedimientos de amplificación y detección de ADN usando dichos cebadores y sondas.

DESCRIPCION DETALLADA

5 La actividad GH está mediada por el receptor de GH (GHR), analizado anteriormente. Se ha demostrado que dos moléculas de GHR interaccionan con una única molécula de GH (Cunningham y col., (1991) Science 254: 821-825; de Vos y col., (1992) Science 255: 306-312; Sundstrom y col., (1996) J. Biol. Chem. 271: 32197-32203; y Clackson y col., (1998) J. Mol. Biol. 277: 10 1111-1128. La unión sucede en dos sitios de unión a GHR únicos en GH y un bolsillo de unión común en el dominio extracelular de dos receptores. El sitio 1 en la molécula GH tiene afinidad más alta que el sitio 2, y la dimerización del receptor se cree que sucede secuencialmente, con la unión de un receptor al sitio 1 en GH seguido por el reclutamiento de un segundo receptor en el sitio 2. 15 Cunningham y col (1991, *supra*) han propuesto que la dimerización del receptor es el suceso clave que conduce a la activación de señal y que la dimerización está dirigida mediante la unión de GH (Ross y col, J. Clin. Endocrinol. & Metabolism (2001) 86(4): 1716-171723. Tras la unión del ligando, los GHR se internalizan rápidamente (Maamra y col, (1999) J. Biol. Chem 274: 14791- 20 14798; y Harding y col., (1996) J. Biol. Chem. 271: 6708-6712), con una proporción reciclada a la superficie celular (Roupas y col., (1987) Endocrinol. 121: 1521-1530).

Más recientemente se ha descubierto una isoforma de GHR mencionada como GHRd3 que contiene una delección del exón 3. (Urbanek M y col., Mol Endocrinol Feb 1992; 6(2): 279-87; Godowski y col (1989) PNAS USA 86: 8083-8087). La delección se cree que es el resultado de un suceso de corte y empalme alternativo que conduce a la retención o la exclusión del exón 3, que corresponde a la isoforma GHRf1 de longitud completa o la isoforma GHRd3 con el exón 3 deleccionado. Varios resultados contradictorios siguieron a la identificación de la isoforma GHRd3. Los informes propusieron que la isoforma GHRd3 se somete a corte y empalme específico de tejido, que el patrón de expresión está regulado de forma desarrollada, mientras que otros informes propusieron que la isoforma GHRd3 es específica de un individuo. Otro informe sugirió que el corte y empalme es el resultado de un polimorfismo genético que se transmite como un rasgo mendeliano y altera el corte y empalme (Stallings-Mann y col., (1996) P.N.A.S U.S.A. 94: 12394-12399). Finalmente, Pantel y col ((2000), J. Biol. Chem. 275 (25): 18664-18669), demostró tras un análisis del locus GHR que en humanos la isoforma GHRd3 se transcribe a partir de un alelo GHR que lleva una delección genómica de 2,7kb que abarca el exón 3. Pantel también identificó dos retroelementos flanqueantes en las muestras de ADN genómico de individuos que expresan sólo GHRf1, pero sólo un único retroelemento en el ADN de individuos que expresan GHRd3, sugiriendo que la delección del exón 3 es el resultado de un suceso de recombinación homóloga entre los dos retroelementos localizados en el mismo alelo GHRf1.

La proteína hGHRd3 difiere de hGHR de longitud completa (GHRf1) por una delección de 22 aminoácidos en el dominio extracelular del receptor. La isoforma GHRd3 codifica una proteína GHR estable y funcional (Urbanek y col., (1993) J. Biol. Chem. 268 (25): 19025-19032). Como Urbanek y col. (1993) 5 informaron de que la isoforma GHRd3 se integra de manera estable en la membrana celular y une e internaliza el ligando tan eficazmente como hGHR, no se identificaron diferencias funcionales a partir de la isoforma GHRf1.

La presente invención está basada en el descubrimiento de que sujetos humanos que llevan un alelo del receptor de la hormona del crecimiento (GHR) 10 que tiene una delección en el exón 3 (GHRd3) tienen una respuesta positiva inferior frente al tratamiento con un agente que funciona mediante la vía GHR que sujetos que no llevan el alelo GHRd3. En particular, los sujetos que llevan el alelo GHRd3 mostraron una respuesta positiva inferior frente al tratamiento con hormona del crecimiento recombinante (GH) que sujetos que no llevan 15 dicho alelo GHRd3. Durante el curso del tratamiento con GH recombinante, los sujetos que tenían ISS, IUGR, VLBW o SGA y llevaban el GHRd3 tuvieron una pérdida en las velocidades de crecimiento con respecto a los sujetos que tenían ISS, IUGR, VLBW o SGA y no llevaban el alelo GHRd3. Más particularmente, los sujetos SGA mostraron una pérdida en la velocidad de 20 crecimiento de aproximadamente un 40%.

De hecho, 71 niños con SGA que se habían incluido en ensayos para el tratamiento con GH recombinante se examinaron respecto a la asociación de la

variante del exón 3 de GHR común y la respuesta de velocidad de crecimiento frente al tratamiento con GH. El alelo GHRd3 estuvo presente en 36 pacientes, de los cuales 9 fueron homocigotos GHRd3/d3 y 27 fueron heterocigotos GHRd3/f1. Después del ajuste para la edad, sexo, dosis de rGH, se descubrió
5 que niños que llevaban el alelo GHRf1 crecieron a una velocidad superior cuando se trataron con rGH. La velocidad de crecimiento fue 10,13 +/- 0,38 cm/año después de un año de terapia en niños con genotipo GHRf1/f1 y 9,56 +/- 0,27 cm/año en niños con genotipo GHRf1/d3, en comparación con 9,12 +/- 0,50 cm/año en niños con genotipo GHRd3/d3. Los grupos genotípicos fueron
10 comparables con respecto a otras características médicas y terapéuticas. La variación genómica de la secuencia de GHR está, por lo tanto, asociada con una diferencia marcada en la eficacia de rGH.

Como se ha analizado anteriormente, la presente invención pertenece al campo de la farmacogenómica y la medicina de predicción en las que se usa
15 ensayos de diagnóstico, ensayos de pronóstico, y ensayos clínicos de control para propósitos de pronóstico (de predicción) para tratar de este modo a un individuo. Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a ensayos de diagnóstico para determinar la expresión de la proteína y/o ácido nucleico de GHR, en el contexto de una muestra biológica (por ejemplo,
20 sangre, suero, células, tejido) para determinar de este modo la naturaleza de la respuesta GHR de un individuo, particularmente respecto al tratamiento con una composición de GH exógena. Esto puede ser útil también para detectar si

un individuo está afectado con una enfermedad o trastorno, o está en riesgo de desarrollar un trastorno, asociado con la respuesta o actividad disminuida de GHR. Los trastornos o afecciones que implican la actividad de GHR incluyen baja estatura, obesidad, infección, o diabetes; acromegalia o afecciones de gigantismo que podrían estar asociadas con efectos lactogénicos, diabetogénicos, lipolíticos y anabólicos de proteínas; afecciones asociadas con la retención de sodio y agua; síndromes metabólicos; trastornos del estado de ánimo y el sueño, cáncer, enfermedad cardíaca e hipertensión. La invención también proporciona ensayos de pronóstico (o de predicción) para determinar si un individuo está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la actividad de la proteína GHR. Por ejemplo, las isoformas GHRd3 y GHRf1 pueden ensayarse en una muestra biológica. Dichos ensayos pueden usarse para el propósito de pronóstico o de predicción para tratar de este modo de manera profiláctica a un individuo antes de la aparición de un trastorno caracterizado o asociado con una respuesta GHR disminuida, por ejemplo, por administración de una cantidad eficaz de GH de modo que un sujeto consiga una altura final consistente con su potencial genético. En otros aspectos, la invención proporciona procedimientos para detectar agentes que modulen la actividad del heterodímero GHRd3/GHRf1. Dichos agentes pueden ser útiles en el tratamiento de las afecciones o trastornos que implican actividad GHR mencionados anteriormente.

Definiciones

El término "agente" se usa en este documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, preferiblemente un péptido o proteína, o un extracto hecho a partir de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos, o células o tejidos
5 animales (particularmente mamíferos).

En el contexto de la presente invención, una "respuesta positiva" o "respuesta terapéutica positiva" frente a un medicamento o agente puede definirse como que comprende una reducción de los síntomas relacionados con una enfermedad o afección. Por ejemplo, una respuesta positiva puede ser un
10 aumento de la altura o velocidad de crecimiento después de la administración de un agente. En el contexto de la presente invención, una "respuesta negativa" frente a un medicamento puede definirse como que comprende una falta de respuesta positiva frente al medicamento, o que conduce a un efecto secundario observado después de la administración de un medicamento.

15 El término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos independientemente de la longitud del polímero; por tanto, se incluyen péptidos, oligopéptidos, y proteínas en la definición de polipéptido. Este término tampoco especifica o excluye las modificaciones de polipéptidos después de su expresión, por ejemplo, los polipéptidos que incluyen la unión covalente de
20 grupos glucosilo, grupos acetilo, grupos fosfato, grupos lipídicos y similares se abarcan expresamente por el término polipéptido. También se incluyen en la definición polipéptidos que contienen uno o más análogos de aminoácidos

(incluyendo, por ejemplo, aminoácidos que no son de origen natural, aminoácidos que sólo se encuentran en la naturaleza en un sistema biológico no relacionado, aminoácidos modificados a partir de sistemas de mamífero etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones
5 conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural.

El término "polipéptido recombinante" se usa en este documento para referirse a polipéptidos que se han diseñado artificialmente y que comprenden al menos dos secuencias polipeptídicas que no se encuentran como secuencias polipeptídicas contiguas en su medio natural inicial, o para referirse
10 a polipéptidos que se han expresado a partir de un polinucleótido recombinante.

El término "cebador" indica una secuencia oligonucleotídica específica que es complementaria a una secuencia de nucleótidos diana y se usa para hibridar con una secuencia de nucleótidos diana. Un cebador sirve como punto
15 de iniciación para la polimerización de nucleótidos catalizada por la ADN polimerasa, ARN polimerasa o transcriptasa inversa.

El término "sonda" indica un segmento de ácidos nucleicos definido (o segmento de análogo de nucleótido, por ejemplo, polinucleótido como se define en este documento) que puede usarse para identificar una secuencia
20 polinucleotídica específica presente en muestras, comprendiendo dicho segmento de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia polinucleotídica específica a identificar.

Como se usa en este documento, una "muestra de ensayo" se refiere a una muestra biológica obtenida de un sujeto de interés. Por ejemplo, una muestra de ensayo puede ser un fluido biológico (por ejemplo, suero), muestra celular, o tejido.

5 Los términos "rasgo" y "fenotipo" se usan de manera intercambiable en este documento y se refieren a cualquier propiedad clínicamente distinguible, detectable o medible de otro modo de un organismo tal como, por ejemplo, síntomas de, o susceptibilidad a una enfermedad. Típicamente los términos "rasgo" o "fenotipo" se usan en este documento para referirse a la respuesta de
10 un individuo frente a un agente que funciona sobre GHR.

El término "genotipo" como se usa en este documento se refiere a la identidad de los alelos presentes en un individuo o una muestra. En el contexto de la presente invención un genotipo preferiblemente se refiere a la descripción de los alelos presentes en un individuo o una muestra. El término "genotipificar"
15 una muestra o un individuo para un alelo implica determinar el alelo específico que lleva un individuo.

El término "alelo" se usa en este documento para referirse a una variante de una secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, los alelos de la secuencia de nucleótidos de GHR incluyen GHRd3 y GHRf1.

20 Como se usa en este documento, "isoforma" e "isoforma de GHR" se refieren a un polipéptido que está codificado por al menos un exón del gen de GHR. Los ejemplos de una isoforma de GHR incluyen polipéptidos GHRd3 y

GHRf1.

El término "polimorfismo" como se usa en este documento se refiere a la presencia de dos o más secuencias genómicas o alelos alternativos entre o en medio de diferentes genomas o individuos. "Polimórfico" se refiere a la
5 condición en la que dos o más variantes de una secuencia genómica específica pueden encontrarse en una población. Un "sitio polimórfico" es el locus en el que sucede la variación. Un polimorfismo puede comprender una sustitución, delección o inserción de uno o más nucleótidos. Un polimorfismo de un único nucleótido es un cambio en un único par de bases.

10 Como se usa en este documento, "exón" se refiere a cualquier segmento de un gen interrumpido que está representado en el producto de ARN maduro.

Como se usa en este documento, "intrón" se refiere a un segmento de un gen interrumpido que no está representado en el producto de ARN maduro. Los intrones son parte del transcrito nuclear primario pero se eliminan por corte y
15 empalme para producir el ARNm, que después se transporta al citoplasma.

Como se usa en este documento, "hormona del crecimiento" o "GH" se refiere a la hormona del crecimiento en forma de secuencia nativa o en forma variante, y de cualquier fuente, natural, sintética, o recombinante. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, la hormona del crecimiento humana (hGH), que
20 es GH natural o recombinante con la secuencia nativa humana (por ejemplo, GENOTROPIN™, somatotropina o somatropina), y la hormona del crecimiento recombinante (rGH), que se refiere a cualquier GH o variante de GH producida

por medio de tecnología de ADN recombinante, incluyendo somatrem, somatotropina, somatropina y pegvisomant. Una molécula GH puede ser agonista o antagonista de GHR. En una realización particular, una molécula GH o variante de la misma está modificada, preferiblemente está pegilada.

5 Como se usa en este documento "receptor de la hormona del crecimiento" o "GHR" se refiere al receptor de la hormona del crecimiento en su forma de secuencia nativa o en forma variante, y de cualquier fuente, natural, sintética, o recombinante. El término "GHR" abarca la isoforma GHRf1 así como GHRd3. Los ejemplos incluyen el receptor de la hormona de crecimiento
10 humana (hGHR), que es GHR natural o recombinante con la secuencia nativa humana. Como se usa en este documento "GHRd3" se refiere a una isoforma de GHR con el exón 3 deletado. El término "GHRf1" se refiere a una isoforma de GHR que contiene el exón 3. El término GHRd3 incluye, aunque sin limitación, el polipéptido descrito en Urbanek M y col, Mol Endocrinol Feb
15 1992; 6(2): 279-87, incorporado en este documento como referencia. El término GHRf1 incluye, aunque sin limitación, el polipéptido descrito en Leung y col., Nature, 330: 537-543 (1987), incorporado en este documento como referencia.

El término "gen de GHR", cuando se usa en este documento, abarca secuencias genómicas, de ARNm y ADNc que codifican cualquier proteína
20 GHR, incluyendo las regiones reguladoras no traducidas del ADN genómico. El término "gen de GHR" también abarca alelos del gen de GHR, tales como el alelo GHRd3 y el alelo GHRf1.

El término "en condiciones rigurosas" se refiere a condiciones en las que una sonda hibridará con su secuencia diana a un grado detectablemente superior que a otras secuencias (por ejemplo, al menos dos veces sobre la de fondo). Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y se 5 diferenciarán en diferentes circunstancias. Controlando la rigurosidad de la hibridación y/o condiciones de lavado, pueden identificarse secuencias diana que son 100% complementarias a la sonda (sondeo homólogo). Como alternativa, las condiciones de rigurosidad pueden ajustarse para permitir algún desapareamiento en las secuencias de modo que se detectan grados inferiores 10 de similitud (sondeo heterólogo). Generalmente, una sonda es menor de aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, preferiblemente menos de 500 nucleótidos de longitud.

Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración salina es menor de aproximadamente una concentración 1,5 M 15 de ión Na, típicamente una concentración aproximadamente 0,01 a 1,0 M de ión Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, más de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también pueden conseguirse por la 20 adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Las condiciones de rigurosidad baja ejemplares incluyen hibridación con una solución tampón de formamida del 30 al 35%, NaCl 1 M, SDS (dodecilsulfato sódico) al 1% a

37°C, y un lavado en 1x a 2xSSC (20xSSC = NaCl 3,0 M/citrato trisódico 0,3 M) de 50 a 55°C. Las condiciones de rigurosidad moderada ejemplares incluyen hibridación en formamida del 40 al 45%, NaCl 1M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 0,5x a 1xSSC de 55 a 60°C. Las condiciones de rigurosidad alta
5 ejemplares incluyen hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37 grados C, y un lavado en 0,1xSSC de 60 a 65°C. La duración de la hibridación generalmente es de menos de aproximadamente 24 horas, habitualmente aproximadamente de 4 a aproximadamente 12 horas.

El término "específico" o "específicamente" y "selectivo" o
10 "selectivamente" a un alelo GHRf1 o GHRd3 se refiere a un anticuerpo o ácido nucleico que es capaz de discriminar entre los dos alelos. Por ejemplo, un anticuerpo o un ácido nucleico específico para el alelo GHRf1 no se unirá de manera significativa al alelo GHRd3. Preferiblemente, la proporción de unión del anticuerpo o el ácido nucleico es 1000:1 para GHRf1:GHRd3. Por "de
15 manera no significativa" significa preferiblemente que la unión no es detectable por medios de detección usados actualmente.

El término "enfermedad o trastorno que implica GHR" se refiere preferiblemente a una enfermedad y/o trastorno seleccionado entre el grupo constituido por: deficiencia de la hormona del crecimiento (GHD); deficiencia de
20 la hormona del crecimiento en adultos (aGHD); síndrome de Turner; baja estatura [entre las cuales se encuentran bajo para la edad gestacional (SGA), estatura baja idiopática (ISS), muy bajo peso al nacer (VLBW), y retardo del

crecimiento intrauterino (IUGR)]; síndrome de Prader-Willi (PWS); insuficiencia renal crónica (CRI); sida debilitante; envejecimiento; insuficiencia renal en etapa final; fibrosis quística; disfunción eréctil; lipodistrofia por VIH; fibromialgia; osteoporosis; trastornos de la memoria; depresión; enfermedad de Crohn;

5 displasias esqueléticas; lesión cerebral traumática; hemorragia subaracnoidea; síndrome de Noonan; síndrome de Down; enfermedad renal en etapa final (ESRD); rescate de células madre de médula ósea; síndrome metabólico; miopatía por glucocorticoides; baja estatura debido al tratamiento con glucocorticoides en niños; insuficiencia de crecimiento que conduce a niños

10 prematuros pequeños; obesidad; infección, diabetes; acromegalia o afecciones de gigantismo que podrían estar asociadas con efectos lactogénicos, diabetogénicos, lipolíticos y anabólicos de proteínas; afecciones asociadas con la retención de sodio y agua; trastornos del estado de ánimo y el sueño; cáncer; enfermedad cardíaca e hipertensión. Las enfermedades y trastornos

15 que implican GHR preferiblemente incluyen GHD, aGHD, SGA, ISS, VLBW, lesión cerebral traumática, síndrome metabólico y síndrome de Noonan.

El gen y la proteína de GHR humano

El gen de GHR humano es un gen de única copia que abarca 90 kb de la región cromosómica 5p13-12. Contiene nueve exones codificantes (numerados

20 2-10) y varios exones no traducidos: el exón 2 codifica el péptido señal, los exones 3 a 7 codifican el dominio extracelular, el exón 8 codifica el dominio transmembrana y los exones 9 y 10 codifican el dominio citoplásmico. Como se

ha analizado anteriormente, la proteína hGHRd3 difiere del hGHR hepático por una delección de 22 aminoácidos en el dominio extracelular del receptor, Godowski y col (1989). El número de acceso a Genbank AF-155912, la descripción de cuya secuencia se incorpora en este documento como

5 referencia, proporciona la secuencia de nucleótidos de la región de ADN genómica alrededor del exón 3 del gen de GHR (por ejemplo, alelo GHRf1). Este fragmento de 6,8 pb que comprende el exón 3 y una porción de los intrones 2 y 3 también comprende dos elementos repetidos de 251 pb. Estos elementos repetidos flanquean el exón 3, con los elementos repetidos 5' y 3'

10 localizados 577 pb cadena arriba y 1821 pb cadena abajo del exón. Los elementos están compuestos de un fragmento de repetición terminal largo (LTR) de 171 pb de un retrovirus endógeno humano que pertenece a la familia HERV-P (Boeke, J. D., y Stoye, J. P. (1997) en *Retroviruses* (Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E., eds), páginas 343-435, Cold Spring Harbor

15 Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). El LTR está seguido por 80 pb de una secuencia tipo MER4 de frecuencia de reiteración media (Smit, A. F. (1996) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 743-748). La secuencia de las dos copias largas de 251 pb mencionadas como repetición 5' y 3' son un 99% idénticas, diferenciándose sólo en tres nucleótidos en la posición 14, 245 y 246 de la

20 repetición. En particular, como informa Pantel y col (2000), el elemento localizado cadena arriba del exón 3 lleva una citosina en la posición 14 y una timina en las posiciones 245 y 246, mientras que el elemento localizado cadena

abajo del exón 3 lleva una guanina, una citosina y una adenina en esas posiciones. Además, otras secuencias de origen viral se encuentran flanqueando el exón 3.

El alelo GHRd3 comprende una delección del exón 3 y porciones
5 circundantes de los intrones 2 y 3. A diferencia del alelo GHRf1, el alelo GHRd3 contiene un LTR de 251 pb único que es idéntico en secuencia al elemento LTR de la copia 3' identificado en los alelos GHRf1. La secuencia de ADN genómico del alelo GHRd3 en la región del exón 3 delecionado se muestra en el número de acceso a Genbank AF210633, la descripción de cuya secuencia
10 se incorpora en este documento como referencia. En base a la secuencia de GHRd3 y GHRf1, pueden usarse procedimientos conocidos para detectar los ácidos nucleicos o polipéptidos de GHR para determinar si un individuo lleva un alelo GHRd3.

La proteína GHRd3 que contiene una delección del exón 3 difiere del
15 hGHR de longitud completa (GHRf1) por una delección de 22 aminoácidos en el dominio extracelular del receptor. Por tanto puede usarse cualquier procedimiento conocido para detectar la presencia de una proteína GHRd3 o GHRf1. También pueden detectarse GHRd3 y GHRf1 en su forma no truncada, o en su forma truncada, como una "proteína de unión a la hormona de
20 crecimiento de alta afinidad", "GHBP de alta afinidad" o "GHBP", con referencia al dominio extracelular del GHR que circula en sangre y funciona como una GHBP en varias especies (Ymer y Herington, (1985) Mol. Cell. Endocrinol. 41:

153; Smith y Talamantes, (1988) *Endocrinology*, 123: 1489-1494; Emtner y Roos, *Acta Endocrinologica (Copenh.)*, 122: 296-302 (1990) incluyendo el hombre. Baumann y col., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 62: 134-141 (1986); documento EP 366.710; Herington y col., *J. Clin. Invest.*, 77: 1817-1823 (1986);
5 Leung y col., *Nature*, 330: 537-543 (1987). Están disponibles diversos procedimientos que existen para medir GHBP funcional en suero, siendo el procedimiento preferido un ensayo inmunofuncional mediado por ligando (LIFA) descrito en la Patente de Estados Unidos Nº 5.210.017 y adicionalmente en este documento.

10 **GHRd3 y/o GHRf1 en Diagnóstico, Terapia y Farmacogenética**

Por tanto la invención proporciona procedimientos para detectar y diagnosticar la respuesta GHR o actividad de GHR disminuida en un individuo que es homocigótico o heterocigótico para el alelo GHRd3. La actividad de GHR disminuida puede ser el resultado, por ejemplo, de niveles, expresión o
15 actividad proteica de GHR disminuidos. También se proporcionan procedimientos para detectar y diagnosticar una respuesta GHR o actividad de GHR aumentada en un individuo que es homocigótico o heterocigótico para el alelo GHRf1. Detectar la actividad de GHR aumentada o disminuida se cree que es útil en el tratamiento de una diversidad de trastornos tratables usando
20 agentes terapéuticos que funcionan mediante la vía GHR. Preferiblemente, dicho trastorno es una enfermedad o un trastorno que implica GHR. Los ejemplos incluyen tratamiento de baja estatura (por ejemplo, preferiblemente

ISS, IUGR, VLBW, o SGA), obesidad, infección, o diabetes; acromegalia o afecciones de gigantismo que podrían estar asociadas con efectos lactogénicos, diabetogénicos, lipolíticos y anabólicos de proteínas; afecciones asociadas con retención de sodio y agua; síndromes metabólicos; trastornos
5 del estado ánimo y el sueño, cáncer, enfermedad cardíaca e hipertensión. Los ejemplos preferidos incluyen agentes que se unen a la proteína GHR tal como composiciones de GH recombinante que funcionan como agonistas o antagonistas de GHR.

En realizaciones preferidas, la invención implica determinar si un sujeto
10 expresa un alelo GHR asociado con una respuesta aumentada o disminuida frente al tratamiento o con una actividad de GHR aumentada o disminuida. Determinar si un sujeto expresa un alelo GHR puede realizarse detectando una proteína o ácido nucleico de GHR.

Preferiblemente, los procedimientos para tratar, diagnosticar o evaluar a
15 un sujeto comprenden evaluar o determinar si un sujeto expresa un alelo GHRd3 y/o GHRf1, por ejemplo, determinando si un sujeto es un homocigoto para el alelo GHRf1 (GHRf1/f1), un homocigoto para el alelo GHRd3 (GHRd3/d3), o un heterocigoto (GHRd3/f1). Por tanto la invención implica preferiblemente determinar si GHRd3 y/o GHRf1 se expresan en una muestra
20 biológica que comprende:

(a) poner en contacto dicha muestra biológica con:

i) un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas

específicamente con un ácido nucleico de GHRd3 y/o polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas específicamente con un ácido nucleico de GHRf1; o

5 ii) un polipéptido detectable que se une selectivamente a un polipéptido GHRd3 y/o un polipéptido detectable que se une selectivamente a un polipéptido GHRf1; y

(b) detectar la presencia o ausencia de hibridación entre dicho polinucleótido y una especie de ARN en dicha muestra, o la presencia o ausencia de unión de dicho polipéptido detectable a un polipéptido en dicha
10 muestra.

Una detección de dicha hibridación con el polinucleótido específico a un ácido nucleico de GHRd3 o de dicha unión del polipéptido selectivo de GHRd3 indica que dicho alelo o isoforma GHRd3 se expresa en dicha muestra. De manera similar, una detección de dicha hibridación con el polinucleótido
15 específico al ácido nucleico de GHRf1 o de dicha unión del polipéptido selectivo de GHRf1 indica que dicho alelo o isoforma GHRf1 se expresa en dicha muestra. Preferiblemente, el polinucleótido es un cebador, y dicha hibridación se detecta detectando la presencia de un producto de amplificación que comprende dicha secuencia cebadora, o el polipéptido detectable es un
20 anticuerpo. Preferiblemente, dicho producto de amplificación se detecta por una electroforesis en poliacrilamida seguida de tinción con bromuro de etidio y/o plata. En una realización más preferida, dicho producto de amplificación se

analiza por dos electroforesis en poliacrilamida por separado, donde una primera electroforesis se tiñe con bromuro de etidio y la segunda con tinción con plata.

Un procedimiento ejemplar para detectar la presencia o ausencia de la
5 proteína o ácido nucleico de GHRd3 en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un sujeto de ensayo y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar la proteína GHRd3 o ácido nucleico (por ejemplo, ARNm, ADN genómico) que codifica la proteína GHRd3 de modo que se detecta la presencia de la proteína o ácido nucleico de
10 GHRd3 en la muestra biológica. Un agente preferido para detectar el ARNm o ADN genómico de GHRd3 es un sonda de ácidos nucleicos marcada capaz de hibridar con el ARNm o ADN genómico de GHRd3. La sonda de ácidos nucleicos puede, por ejemplo, ser un ácido nucleico humano, o una porción del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 15, 30, 50, 100, 250 ó 500
15 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente en condiciones rigurosas con el ARNm o ADN genómico de GHRd3. Se describen en este documento otras sondas apropiadas para usar en los ensayos de diagnóstico de la invención.

De manera similar, un procedimiento ejemplar para detectar la presencia
20 o ausencia de la proteína o ácido nucleico de GHRf1 en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un sujeto de ensayo y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar

la proteína o ácido nucleico GHRf1 (por ejemplo, ARNm, ADN genómico) que codifica la proteína GHRf1 de modo que se detecta la presencia de la proteína o ácido nucleico GHRf1 en la muestra biológica. Un agente preferido para detectar el ARNm o ADN genómico de GHRf1 es una sonda de ácidos nucleicos marcada capaz de hibridar con el ARNm o ADN genómico de GHRf1. La sonda de ácidos nucleicos puede, por ejemplo, ser un ácido nucleico humano, una porción del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 15, 30, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente en condiciones rigurosas con el ARNm o ADN genómico de GHRf1. Se describen en este documento otras sondas apropiadas para usar en los ensayos de diagnóstico de la invención.

Un agente preferido para detectar la proteína GHRd3 es un anticuerpo capaz de unirse específicamente a la proteína GHRd3. Un agente preferido para detectar la proteína GHRf1 es un anticuerpo capaz de unirse específicamente a la proteína GHRf1. Preferiblemente, el anticuerpo tiene un marcador detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Puede usarse un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab o F(ab')₂). El término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende abarcar el marcaje directo de la sonda o anticuerpo acoplado (es decir, unión física) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Los ejemplos

de marcaje indirecto incluyen detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado por fluorescencia y marcaje del extremo de una sonda de ADN con biotina de modo que puede detectarse con estreptavidina marcada por fluorescencia.

5 El término "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. Por tanto, el procedimiento de detección de la invención puede usarse para detectar ARNm, proteína, o ADN genómico candidato en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro*
10 para la detección de ARNm candidato incluyen hibridaciones de Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de la proteína candidata incluyen ensayo inmunoabsorbente (ELISA), transferencias de Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para detección de ADN genómico candidato incluyen hibridaciones de
15 Southern. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de la proteína GHRd3 o GHRf1 incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto puede detectarse por técnicas de creación de imágenes convencionales.

20 En una realización, la muestra biológica contiene moléculas proteicas del sujeto de ensayo. Como alternativa, la muestra biológica puede contener moléculas de ARNm del sujeto de ensayo o moléculas de ADN genómico del

sujeto de ensayo. Una muestra biológica preferida es una muestra de suero aislada por medios convencionales de un sujeto.

La invención también abarca kits para detectar la presencia de una proteína, ARNm o ADN genómico de GHRd3 y/o GHRf1 en una muestra biológica. Por ejemplo, el kit puede comprender un compuesto marcado o un agente capaz de detectar la proteína o ARNm de GHRd3 en una muestra biológica y/o un compuesto marcado o agente capaz de detectar la proteína o ARNm de GHRf1 en una muestra biológica; medios para la determinación de la cantidad de proteína o ARNm de GHRd3 y/o GHRf1 en la muestra; o medios para la comparación de la cantidad de proteína, ARNm, o ADN genómico de GHRd3 y/o GHRf1 en la muestra con un patrón. El compuesto o agente puede envasarse en un recipiente apropiado. El kit también puede comprender instrucciones de uso del kit para detectar proteína o ácido nucleico de GHRd3 y/o GHRf1.

Más preferiblemente, los ensayos descritos en este documento, tales como los ensayos de diagnóstico precedentes o los siguientes ensayos, pueden utilizarse para identificar un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una respuesta GHR disminuida. En particular, se identifica un sujeto homocigótico o heterocigótico para GHRd3 como el que tiene o está en riesgo de desarrollar una respuesta GHR disminuida. En otros aspectos, los procedimientos de diagnóstico descritos en este documento pueden utilizarse para identificar sujetos que tienen o están en riesgo de desarrollar una

enfermedad, trastorno o rasgo asociado con niveles, expresión o actividad aberrantes o más particularmente disminuidos de GHR. Por ejemplo, los ensayos descritos en este documento, tales como los ensayos de diagnóstico precedentes o los siguientes ensayos, pueden utilizarse para identificar un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar un rasgo asociado con niveles, expresión o actividad disminuidos de GHR. En otro ejemplo, los ensayos descritos en este documento pueden utilizarse para identificar un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar un rasgo asociado con niveles, expresión o actividad disminuidos de GHR. Como se analiza, se espera que un homocigoto GHRf1/f1 y un heterocigoto GHRf1/d3 tengan una respuesta GHR o actividad de GHR aumentadas en comparación con un homocigoto GHRd3/d3. De manera similar, se espera que un homocigoto GHRf1/f1 tenga una respuesta GHR o actividad de GHR aumentadas en comparación con un heterocigoto GHRf1/d3.

Los ensayos de pronóstico descritos en este documento pueden usarse para determinar si y/o de acuerdo con qué régimen de administración debe administrarse un agente que funciona a través de la vía GHR a un sujeto para tratar una enfermedad o trastorno. Por tanto, la presente invención proporciona procedimientos para determinar si un sujeto puede tratarse eficazmente con un agente que funciona a través de la vía GHR en la que se obtiene una muestra de ensayo y se detecta actividad o expresión de ácido nucleico o proteína de GHRd3 y/o GHRf1. Opcionalmente, sólo se detecta la expresión o actividad de

12A
129

la proteína o ácido nucleico de GHRf1. Como alternativa, sólo se detecta la expresión o actividad de la proteína o ácido nucleico de GHRd3. También puede detectarse la expresión o actividad de la proteína o ácido nucleico de GHRd3 y GHRf1. Como se ha analizado, un sujeto que presenta la proteína o ácido nucleico de GHRd3 se espera que tenga una respuesta positiva disminuida frente a dicho agente en relación con un sujeto que no presenta la proteína o ácido nucleico de GHRd3.

La detección de susceptibilidad a actividad de GHR disminuida en individuos es muy importante debido en gran medida a que la administración de agentes que funcionan a través de vías mediadas por GHR pueden adaptarse a sujetos que tienen sensibilidades superiores o inferiores frente al agente. Dichos agentes no necesitan necesariamente funcionar directamente sobre la proteína GHR, pero pueden funcionar cadena arriba de la proteína GHR, por ejemplo, funcionando sobre otra molécula que interacciona finalmente con la proteína GHR. En una realización preferida, el agente es un agente que funciona directamente sobre la proteína GHR. Más preferiblemente, el agente es un agente que se une a la proteína GHR y funciona como agonista o antagonista. Más preferiblemente, el agente es una proteína GH o una variante de la misma capaz de la activación de la proteína GHR tal como somatropina. En otras realizaciones, el agente es una proteína GH capaz de unirse pero no de activar la proteína GHR, tal como pegvisomant.

Una muestra de ADN se obtiene del individuo a ensayar para determinar

si el ADN codifica una proteína GHRd3 y/o una proteína GHRf1. La muestra de ADN se analiza para determinar si comprende la secuencia de GHRd3 y/o la secuencia de GHRf1. El ADN que codifica una proteína GHRd3 se asociará con una respuesta positiva disminuida frente al tratamiento con el medicamento, y una ausencia de ADN que codifica alelos GHRd3 se asocia con una respuesta positiva más alta en comparación con individuos GHRd3.

Los procedimientos de la invención también serán útiles para evaluar y realizar ensayos clínicos de medicamentos. Los procedimientos, por consiguiente, comprenden identificar una primera población de individuos que responden de manera positiva a dicho medicamento y una segunda población de individuos que responden de manera negativa a dicho medicamento o cuyas respuestas positivas frente a dicho medicamento están disminuidas en comparación con dicha primera población de individuos. En una realización, el medicamento puede administrarse al sujeto en un ensayo clínico si la muestra de ADN contiene alelos de uno o más alelos asociados con una respuesta positiva frente al tratamiento con el medicamento y/o si la muestra de ADN carece de alelos de uno o más alelos asociados con una respuesta negativa o positiva disminuida frente al tratamiento con el medicamento. En otro aspecto, el medicamento puede administrarse al sujeto en un ensayo clínico si la muestra de ADN contiene alelos de uno o más alelos asociados con una respuesta negativa o positiva disminuida frente al tratamiento con el medicamento y/o si la muestra de ADN carece de alelos de uno o más alelos

asociados con una respuesta positiva o positiva aumentada frente al tratamiento con el medicamento.

Por tanto, usando el procedimiento de la presente invención, puede evaluarse la eficacia del fármaco teniendo en cuenta las diferencias de la
5 respuesta GHR entre sujetos del ensayo de fármaco. Si se desea, puede realizarse un ensayo para la evaluación de la eficacia de fármaco en una población comprendida sustancialmente de individuos que probablemente responden de manera favorable al medicamento, o en una población comprendida sustancialmente de individuos que probablemente responden de
10 manera menos favorable al medicamento que otra población. Por ejemplo, una composición que contiene proteína GH puede evaluarse en una población de individuos GHRd3 o en una población de individuos GHRf1. En otro aspecto, puede evaluarse un medicamento diseñado para tratar individuos que padecen de una respuesta GH disminuida de manera ventajosa en una población de
15 individuos GHRd3.

Detección de GHRd3 y GHRf1

Se contempla que pueden identificarse otras mutaciones del gen de GHR de acuerdo con la presente invención detectando un cambio de nucleótido en ácidos nucleicos particulares (Patente de Estados Unidos Nº
20 4.988.617, incorporada en este documento como referencia). Se contemplan una diversidad de diferentes ensayos a este respecto, incluyendo, aunque sin limitación, hibridación in situ fluorescente (FISH; Patente de Estados Unidos Nº

5.633.635 y Patente de Estados Unidos Nº 5.665.549, incorporadas cada una en este documento como referencia), secuenciación directa de ADN, análisis PFGE, transferencia de Southern o Northern, análisis conformacional de hélice única (SSCA), ensayo de protección de ARNasa, oligonucleótido específico de alelo (ASO por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.639.611), análisis de transferencia por puntos electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.190.856 incorporada en este documento como referencia). RFLP (por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.324.631 incorporada en este documento como referencia) y PCR-SSCP.

10 Los procedimientos para detectar y cuantificar secuencias génicas en, por ejemplo, fluidos biológicos se describen en la Patente de Estados Unidos Nº 5.496.699, incorporada en este documento como referencia.

Cebadores y Sondas

El término cebador, como se define en este documento, se pretende que

15 abarque cualquier ácido nucleico que sea capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un procedimiento dependiente de molde. Típicamente, los cebadores son oligonucleótidos de diez a veinte pares de bases de longitud, pero pueden emplearse secuencias más largas. Los cebadores pueden proporcionarse en forma de doble hélice o hélice única,

20 aunque se prefiere la forma de hélice única. Las sondas se definen de manera diferente, aunque pueden funcionar como cebadores. Las sondas, aunque tal vez son capaces de cebar, se diseñan para unirse al ADN o ARN diana y no

necesitan usarse en un procedimiento de amplificación.

SEC ID Nº 3 y 4 proporcionan las secuencias de ADN genómico alrededor del exón 3 o el sitio de la delección del exón 3 en el gen GHR, respectivamente. Una secuencia de ADNc de GHRf1 se muestra en SEC ID Nº

5 1. Puede usarse cualquier diferencia en la secuencia de nucleótidos entre los alelos GHRd3 y GHRf1 en los procedimientos de la invención para detectar y distinguir el alelo GHR particular en un individuo. Para identificar una molécula de ADN genómico o ADNc de GHRf1, puede diseñarse un cebador que hibride con un ácido nucleico del exón 3. Para identificar un ADN genómico de GHRd3,
10 puede diseñarse un cebador o sonda de modo que abarque la unión de los intrones 2 y 3 del gen de GHR como se encuentra en la secuencia de ADN genómico del alelo GHRd3, distinguiendo de este modo entre el alelo GHRf1 que contiene el exón 3 y el alelo GHRd3 que no contiene el exón 3. En otro ejemplo, puede identificarse una molécula de ADNc de GHRd3 diseñando un
15 cebador o sonda que abarque la unión de los exones 2 y 4, distinguiendo de este modo entre una molécula de ADNc de GHRf1 que contiene el exón 3 y una molécula de ADNc de GHRd3 que no contiene el exón 3. Se enumeran otros ejemplos de cebadores apropiados para la detección de GHRd3 en Pantel y col. (supra) y en el Ejemplo 1 a continuación.

20 La presente invención abarca polinucleótidos para usar como cebadores y sondas en los procedimientos de la invención. Estos polinucleótidos pueden constar de, o constar esencialmente de, o comprender un tramo contiguo de

129
132

nucleótidos de una secuencia a partir de cualquier secuencia proporcionada en este documento así como secuencias que son complementarias a las mismas ("complementos de las mismas"). El "tramo contiguo" puede tener al menos 25, 35, 40, 50, 70, 80, 100, 250, 500 ó 1000 nucleótidos de longitud, hasta el punto en que un tramo contiguo de estas longitudes sea consistente con las longitudes de la secuencia ID particular. Debe observarse que los polinucleótidos de la presente invención no están limitados para que tengan secuencias flanqueantes exactas alrededor de una secuencia diana de interés, que se enumeran en la Lista de Secuencias. Además, se apreciará que las secuencias flanqueantes alrededor de los polimorfismos, o cualquiera de los cebadores o sondas de la invención, que están mas distantes de los marcadores, pueden alargarse o acortarse a cualquier longitud compatible con su uso pretendido y la presente invención contempla específicamente dichas secuencias. Se apreciará que los polinucleótidos mencionados en este documento pueden tener cualquier longitud compatible con su uso pretendido. Además las regiones flanqueantes fuera del tramo contiguo no necesitan ser homólogas a las secuencias flanqueantes nativas que realmente se encuentran en sujetos humanos. Se contempla específicamente la adición de cualquier secuencia de nucleótidos, que sea compatible con los nucleótidos que se pretenden usar. Los polinucleótidos preferidos pueden constar de, constar esencialmente de, o comprender un tramo contiguo de nucleótidos de una secuencia de SEC ID N^o 1, 3 ó 4 así como secuencias que son

complementarias a las mismas. El "tramo contiguo" puede tener al menos 8, 10, 12, 15, 50, 70, 80, 100, 250, 500 ó 1000 nucleótidos de longitud.

Las sondas de la presente invención pueden diseñarse a partir de secuencias descritas para cualquier procedimiento conocido en la técnica, particularmente procedimientos que permiten ensayar si una secuencia particular o marcador descrito en este documento está presente. Puede diseñarse un conjunto preferido de sondas para usar en los ensayos de hibridación de la presente invención de cualquier modo conocido en la técnica de modo que se unan selectivamente a un alelo de un polimorfismo, pero no a otro en cualquier conjunto particular de condiciones de ensayo.

Cualquiera de los polinucleótidos de la presente invención puede marcarse, si se desea, incorporando un marcador detectable por espectroscopía, fotoquímica, bioquímica, inmunoquímica, o medio químico. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen sustancias radiactivas, colorantes fluorescentes o biotina. Preferiblemente, los polinucleótidos se marcan en sus extremos 3' y 5'. Un marcador también puede usarse para capturar el cebador, de forma que se facilite la inmovilización del cebador o un producto de extensión del cebador, tal como ADN amplificado, sobre un soporte sólido. Un marcador de captura se une a los cebadores o sondas y puede ser un miembro de unión específica que forma un par de unión con el miembro de unión específico del reactivo en fase sólida (por ejemplo, biotina y estreptavidina). Por lo tanto, dependiendo del tipo de marcador que lleva un polinucleótido o una

sonda, puede emplearse para capturar o detectar el ADN diana. Además, se entenderá que los polinucleótidos, cebadores o sondas proporcionados en este documento, pueden, por sí mismos, servir como marcador de captura. Por ejemplo, en el caso en el que el miembro de unión de reactivo en fase sólida sea una secuencia de ácidos nucleicos, puede seleccionarse de modo que se una a una porción complementaria de un cebador o sonda para inmovilizar de ese modo el cebador o sonda en la fase sólida. En casos en los que la sonda polinucleotídica sirva por sí misma como el miembro de unión, los especialistas en la técnica reconocerán que la sonda contendrá una secuencia o "tramo final" que no es complementario a la diana. En el caso en el que un cebador polinucleotídico sirva por sí mismo como marcador de captura, al menos una porción del cebador estará libre de hibridar con un ácido nucleico en una fase sólida. Las técnicas de marcaje de ADN son bien conocidas por los especialistas en la técnica.

Cualquiera de los polinucleótidos, cebadores y sondas de la presente invención puede inmovilizarse de manera adecuada sobre un soporte sólido. Los soportes sólidos son bien conocidos por los especialistas en la técnica e incluyen las pareces de pocillos de una bandeja de reacción, tubos de ensayo, perlas de poliestireno, perlas magnéticas, tiras de nitrocelulosa, membranas, micropartículas tales como partículas de látex, células sanguíneas rojas de oveja (u otro animal), duracitos, y otros. El soporte sólido no es crítico y lo puede seleccionar un especialista en la técnica. Por tanto, partículas de látex,

B2
135

micropartículas, perlas magnéticas o no magnéticas, membranas, tubos de plástico, paredes de pocillos de microtitulación, chips de vidrio o silicona, células sanguíneas rojas de oveja (u otro animal apropiado) y duracitos son todos ejemplos apropiados. Los procedimientos apropiados para inmovilizar

5 ácidos nucleicos en fases sólidas incluyen interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. Un soporte sólido, como se usa en este documento, se refiere a cualquier material que es insoluble, o que puede hacerse insoluble por una reacción posterior. El soporte sólido puede elegirse por su capacidad intrínseca de atraer e inmovilizar el reactivo de captura. Como alternativa, la

10 fase sólida puede retener un receptor adicional que tiene la capacidad de atraer e inmovilizar el reactivo de captura. El receptor adicional puede incluir una sustancia cargada que está cargada de manera opuesta con respecto al reactivo de captura en sí mismo o a una sustancia cargada conjugada con el reactivo de captura. Como otra alternativa más, la molécula receptora puede

15 ser cualquier miembro de unión específica que se inmoviliza sobre (se une a) el soporte sólido y que tiene la capacidad de inmovilizar el reactivo de captura a través de una reacción de unión específica. La molécula receptora posibilita la unión indirecta del reactivo de captura con un material de soporte sólido antes de la realización del ensayo o durante la realización del ensayo. La fase sólida,

20 por tanto, puede ser un plástico, plástico derivatizado, metal magnético o no magnético, vidrio o superficie de silicona de un tubo de ensayo, pocillo de microtitulación, lámina, perla, micropartícula, chip, células sanguíneas rojas de

oveja (u otro animal apropiado), duracitos y otras configuraciones conocidas por los especialistas en la técnica. Los polinucleótidos de la invención pueden unirse a o inmovilizarse sobre un soporte sólido de manera individual o en grupos de al menos 2, 5, 8, 10, 12, 15, 20, ó 25 polinucleótidos distintos de la invención a un único soporte sólido. Además, los polinucleótidos distintos de los de la invención pueden unirse al mismo soporte sólido como uno o más polinucleótidos de la invención.

Cualquier polinucleótido proporcionado en este documento puede unirse en áreas solapantes o en posiciones aleatorias sobre el soporte sólido. Como alternativa, los polinucleótidos de la invención pueden unirse en una serie ordenada donde cada polinucleótido se une a una región distinta del soporte sólido que no solapa con el sitio de unión de cualquier otro polinucleótido. Preferiblemente, dicha serie ordenada de polinucleótidos se diseña para que sea "localizable", donde se registran las distintas posiciones y se puede acceder como parte de un procedimiento de ensayo. Las series de polinucleótidos localizables típicamente comprenden una pluralidad de sondas oligonucleotídicas diferentes que están acopladas a una superficie de un sustrato en diferentes posiciones conocidas. El conocimiento de la posición precisa de cada posición de polinucleótido hace a estas series "localizables" particularmente útiles en ensayos de hibridación. Puede emplearse cualquier tecnología de serie localizable conocida en la técnica con los polinucleótidos de la invención. Una realización particular de estas series de polinucleótidos se

conoce como el Genechips, y se ha descrito en líneas generales en la Patente de Estados Unidos Nº 5.143.854; Publicaciones PCT WO 90/15070 y 92/10092. . Estas series pueden producirse generalmente usando procedimientos de síntesis mecánica o procedimientos de síntesis dirigida con luz, que incorporan una combinación de procedimientos fotolitográficos y síntesis de oligonucleótidos en fase sólida (Fodor y col., Science, 251: 767-777, 1991). La inmovilización de series de oligonucleótidos en soportes sólidos se ha hecho posible por el desarrollo de una tecnología identificada generalmente como "Síntesis de Polímeros Inmovilizados a Muy Grande Escala" (VLSIPS) en la que, típicamente, se inmovilizan sondas en una serie de alta densidad en una superficie sólida de un chip. Los ejemplos de tecnología VLSIPS se proporcionan en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.143.854 y 5.412.087 y las Publicaciones PCT WO 90/15070, WO 92/10092 y WO 95/11995, que describen procedimientos para formar series de oligonucleótidos a través de técnicas tales como técnicas de síntesis dirigidas con luz. En el diseño de estrategias dirigidas para proporcionar series de nucleótidos Inmovilizados en soportes sólidos, se desarrollaron estrategias de presentación adicionales para ordenar y presentar las series de oligonucleótidos en los chips en un intento de maximizar los patrones de hibridación e información de secuencia. Ejemplos de dichas estrategias de presentación se describen en las Publicaciones PCT WO 94/12305, WO 94/11530, WO 97/29212 y WO 97/31256.

Procedimientos de Amplificación Dependiente de Molde

Están disponibles varios procedimientos dependientes de molde para amplificar las secuencias marcadoras presentes en una muestra molde dada. Uno de los procedimientos de amplificación mejor conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa (mencionada como PCR) que se describe con detalle en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159, y en Innis y col., PCR Protocols, Academic Press, Inc. San Diego Calif., 1990, cada una de las cuales se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.

Brevemente, en PCR, se preparan dos secuencias cebadoras que son complementarias a regiones en cadenas de complementariedad opuestas en la secuencia marcadora. Se añade un exceso de desoxinucleósido trifosfatos a una mezcla de reacción junto con una ADN polimerasa, por ejemplo, Taq polimerasa. Si la secuencia marcadora está presente en una muestra, los cebadores se unirán al marcador y la polimerasa provocará que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia marcadora añadiendo nucleótidos. Subiendo y bajando la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores ampliados se disociarán del marcador para formar productos de reacción, los cebadores en exceso se unirán al marcador y a los productos de reacción y el procedimiento se repite.

Puede realizarse un procedimiento de amplificación por PCR con transcriptasa inversa para cuantificar la cantidad de ARNm amplificado. Los procedimientos para transcribir de manera inversa ARN a ADNc son bien

conocidos y se describen en Sambrook y col., En: Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2ª. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Procedimientos alternativos para la transcripción inversa utilizan ADN polimerasas termoestables dependientes de ARN. Estos
5 procedimientos se describen en el documento WO 90/07641. Las metodologías de reacción en cadena de la polimerasa son bien conocidas en la técnica.

Otro procedimiento para amplificación es la reacción en cadena de la ligasa ("LCR" Patentes de Estados Unidos Nº 5.494.810, 5.484.699, documento EPO Nº 320 308, incorporados cada uno en este documento como referencia).
10 En LCR, se preparan dos pares de sondas complementarias, y en presencia de la secuencia diana, cada par se unirá a las cadenas complementarias opuestas de la diana de modo que quedarán contiguas. En presencia de una ligasa, los dos pares de sondas se unirán para formar una única unidad.

Ciclando la temperatura, como en PCR, las unidades ligadas se
15 disocian de la diana y después sirven como "secuencias diana" para el ligamiento de pares de sondas en exceso. La Patente de Estados Unidos Nº 4.883.750 describe un procedimiento similar a LCR para unir pares de sondas a una secuencia diana.

Puede usarse la Qbeta Replicasa, una ARN polimerasa dirigida por
20 ARN, como otro procedimiento más de amplificación en la presente invención. En este procedimiento, se añade a una muestra una secuencia replicativa de ARN que tiene una región complementaria a la de una diana, en presencia de

una ARN polimerasa. La polimerasa copiará la secuencia replicativa que después puede detectarse. También se describen procedimientos similares en la Patente de Estados Unidos Nº 4.786.600, incorporada en este documento como referencia, que concierne a moléculas de ARN recombinante capaces de servir como molde para la síntesis de moléculas de hélice única complementarias por ARN polimerasa dirigida por ARN. Las moléculas producto formadas de este modo también son capaces de servir como molde para la síntesis de copias adicionales de la molécula de ARN recombinante original.

10 También puede ser útil un procedimiento de amplificación isoterma, en el que se usan ligasas endonucleasas de restricción para conseguir la amplificación de moléculas diana que contienen nucleótidos 5'-[alpha-tio]-trifosfatos en una cadena de un sitio de restricción en la amplificación de ácidos nucleicos en la presente invención (Walker y col, (1992) Proc. Nat'l Acad Sci. USA, 89: 392-396; Patente de Estados Unidos Nº 5.270.184 incorporados en este documento como referencia). La Patente de Estados Unidos Nº 5.747.255 (incorporada en este documento como referencia) describe una amplificación isoterma usando oligonucleótidos que se pueden escindir para detección de polinucleótidos. En el procedimiento descrito en la misma, se proporcionan 15 poblaciones separadas de oligonucleótidos que contienen secuencias complementarias entre sí y que contienen al menos una unión que se puede cortar que se escinde cuando se forma un dúplex que coincide perfectamente

20

que contiene la unión. Cuando un polinucleótido diana contacta con un primer oligonucleótido sucede la escisión y se produce un primer fragmento que puede hibridar con un segundo oligonucleótido. Tras dicha hibridación, el segundo oligonucleótido se escinde liberando un segundo fragmento que puede, a su vez, hibridar con un primer oligonucleótido de un modo similar al del polinucleótido diana.

La Amplificación por Desplazamiento de Cadena (SDA) es otro procedimiento de realizar amplificación isoterma de ácidos nucleicos que implica múltiples rondas de desplazamiento y síntesis de cadena, es decir, desplazamiento de mella (por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nº 5.744.311; 5.733.752; 5.733.733; 5.712.124). Un procedimiento similar, llamado Reacción en Cadena de Reparación (RCR), implica hibridar varias sondas por toda una región marcada para amplificación, seguido por una reacción de reparación en la que sólo dos de las cuatro bases están presentes. Las otras dos bases puede añadirse como derivados biotinilados para una detección fácil. Un enfoque similar se usa en SDA. Las secuencias específicas diana también pueden detectarse usando una reacción de sonda cíclica (CPR). En CPR, se hibrida una sonda que tiene secuencias 3' y 5' de ADN no específico y una secuencia central de ARN específico con ADN que está presente en una muestra. Tras la hibridación, la reacción se trata con ARNasa H, y los productos de la sonda se identifican como productos distintos que se liberan después de la digestión. El molde original se hibrida con otra sonda de ciclado

y se repite la reacción.

Otros procedimientos más de amplificación descritos en la Solicitud GB N° 2 202 328, y en la Solicitud PCT N° PCT/US89/01025, cada una de las cuales se incorpora en este documento como referencia en su totalidad, 5 pueden usarse de acuerdo con la presente invención. En la solicitud anterior, se usan cebadores "modificados" en una síntesis dependiente de molde y enzima tipo PCR. Los cebadores pueden modificarse marcando con un resto de captura (por ejemplo, biotina) y/o un resto detector (por ejemplo, enzima). En la última solicitud, se añade un exceso de sondas marcadas a una muestra. 10 En presencia de una secuencia diana, la sonda se une y se escinde catalíticamente. Después de la escisión, la secuencia diana se libera intacta para unirse por exceso de sonda. La escisión de la sonda marcada señala la presencia de la secuencia diana.

Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen 15 sistemas de amplificación basados en la transcripción (TAS), incluyendo amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) y 3SR (Kwok y col., (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86: 1173; y el documento WO 88/10315, incorporados en este documento como referencia en su totalidad). En NASBA, los ácidos nucleicos pueden prepararse para amplificación por 20 extracción convencional con fenol/cloroformo, desnaturalización por calor de una muestra clínica, tratamiento con tampón de lisis y minicolumnas de centrifugación para asilamiento de ADN y ARN o extracción de ARN con

cloruro de guanidinio. Estas técnicas de amplificación implican hibridar un cebador que tiene secuencias específicas diana. Después de la polimerización, se digieren los híbridos ADN/ARN con ARNasa H mientras que las moléculas de ADN de doble hélice se desnaturalizan con calor otra vez. En cada caso el

5 ADN de hélice única se hace completamente de doble hélice por adición de un segundo cebador específico de diana, seguido por polimerización. Las moléculas de ADN de doble hélice después se transcriben de manera múltiple por una ARN polimerasa tal como T7 o SP6. En una reacción cíclica isoterma, los ARN se transcriben de manera inversa en ADN de hélice única, que

10 después se convierte en ADN de doble hélice, y después se transcribe otra vez con una ARN polimerasa tal como T7 o SP6. Los productos resultantes, truncados o completos, indican las secuencias específicas diana.

Davey y col., documento EPO Nº 329 822 (Incorporado en este documento como referencia en su totalidad) describen un procedimiento de

15 amplificación de ácidos nucleicos que implica sintetizar de manera cíclica ARN de hélice única ("ARNss"), ADNss; y ADN de doble hélice (ADNds) que puede usarse de acuerdo con la presente invención. El ARNss es un molde para un primer oligonucleótido cebador, que se elonga por transcriptasa inversa (ADN polimerasa dependiente de ARN). El ARN después se retira del dúplex

20 ADN:ARN resultante por la acción de ribonucleasa H (ARNasa H, una ARNasa específica para ARN en dúplex con ADN o ARN). El ADNss resultante es un molde para un segundo cebador, que también incluye las secuencias de un

promotor de ARN polimerasa (ejemplificada por ARN polimerasa T7) 5' a su homología al molde. Este cebador después se alarga por ADN polimerasa (ejemplificada por el fragmento grande "Klenow" de ADN polimerasa I de E. coli), dando como resultado una molécula de ADN de doble hélice ("ADNds"),
5 que tiene una secuencia idéntica a la del ARN original entre los cebadores y que tiene adicionalmente, en un extremo, una secuencia promotora. Esta secuencia promotora puede usarse por la ARN polimerasa apropiada para hacer muchas copias ARN del ADN. Estas copias después pueden re-entrar en el ciclo que conduce a amplificación muy veloz. Con la elección apropiada de
10 enzimas, esta amplificación puede hacerse de manera isoterma sin adición de enzimas en cada ciclo. A causa de la naturaleza cíclica de este procedimiento, la secuencia de partida puede elegirse para que esté en forma de ADN o ARN.

La Solicitud PCT WO 89/06700 (incorporada en este documento como referencia en su totalidad) describe un esquema de amplificación de secuencia
15 de ácidos nucleicos basado en la hibridación de una secuencia promotora/cebadora con un ADN de hélice única diana ("ADNss") seguido por la transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Este esquema no es cíclico, es decir, no se producen nuevos moldes a partir de los transcritos de ARN resultantes. Otros procedimientos de amplificación incluyen "RACE" y
20 "PCR unilateral" (Frohman., En: PCR Protocols. A Guide To Methods And Applications, Academic Press, N. Y., 1990; y O'hara y col., (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86: 5673-5677; cada uno de los cuales se incorpora en este

documento como referencia en sus totalidades).

Los procedimientos basados en ligamiento de dos (o más) oligonucleótidos en presencia de ácido nucleico que tiene la secuencia del "dioligonucleótido" resultante, amplificando de este modo el dioligonucleótido, también puede usarse en la etapa de amplificación de la presente invención (Wu y col., (1989) Genomics, 4: 560, incorporado en este documento como referencia).

Transferencia de Southern/Northern

Las técnicas de transferencia son bien conocidas por los especialistas en la técnica. La transferencia de Southern implica el uso de ADN como diana, mientras que la transferencia de Northern implica el uso de ARN como diana. Cada uno proporciona diferentes tipos de información, aunque la transferencia de ADN es análogo, en muchos aspectos, a la transferencia de especies de ARN.

Brevemente, se usa una sonda para marcar una especie de ADN o ARN que se ha inmovilizado en una matriz apropiada, a menudo un filtro de nitrocelulosa. Las diferentes especies deben separarse espacialmente para facilitar el análisis. Esto a menudo se consigue por electroforesis en gel de especies de ácidos nucleicos seguido por "transferencia" al filtro.

Posteriormente, la diana transferida se incuba con una sonda (habitualmente marcada) en condiciones que promueven la desnaturalización y rehibridación. Como la sonda se diseña para que forme pares de bases con la

diana, la sonda se unirá a una porción de la secuencia diana en condiciones renaturalizantes. La sonda no unida después se retira, y la detección se consigue como se ha descrito anteriormente.

Procedimientos de Separación

5 Normalmente es deseable, en una etapa u otra, separar el producto de amplificación del molde y el cebador en exceso para el propósito de determinar si ha sucedido la amplificación específica. En una realización, los productos de amplificación se separan por electroforesis en gel de agarosa, agarosa-acrilamida o poliacrilamida usando procedimientos convencionales. Véase,
10 Sambrook y col., 1989.

Como alternativa, pueden emplearse técnicas cromatográficas para efectuar la separación. Hay muchos tipos de cromatografía que pueden usarse en la presente invención: adsorción, reparto, intercambio iónico y tamiz molecular, y muchas técnicas especializadas para usarlas incluyendo columna,
15 papel, capa fina y cromatografía de gases (Freifelder. *Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology*, 2ª ed. Wm. Freeman y Co., Nueva York, N.Y., 1982).

Procedimientos de Detección

Los productos pueden visualizarse para confirmar la amplificación de las
20 secuencias marcadoras. Un procedimiento de visualización típico implica tinción de un gel con bromuro de etidio y visualización en luz UV. Como alternativa, si los productos de amplificación están marcados de manera

integral con nucleótidos radio o fluorométricamente marcados, los productos de amplificación pueden después exponerse a una película de rayos-x o visualizarse en el espectro de estimulación apropiado, después de la separación.

5 En una realización, la visualización se consigue de manera indirecta. Después de la separación de los productos de amplificación, se pone en contacto una sonda de ácidos nucleicos marcada con la secuencia marcadora amplificada. La sonda preferiblemente se conjuga a un cromóforo pero puede radiomarcarse. En otra realización, la sonda se conjuga con una pareja de
10 unión, tal como un anticuerpo o biotina, y el otro miembro del par de unión lleva un resto detectable.

En una realización, la detección es por una sonda marcada. Las técnicas implicadas son bien conocidas por los especialistas en la técnica y pueden encontrarse en muchos libros convencionales de protocolos moleculares.
15 Véase, Sambrook y col., 1989. Por ejemplo, cromóforos o sondas o cebadores radiomarcados identifican la diana durante o después de la amplificación.

Un ejemplo de lo anterior se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.279.721, incorporada en este documento como referencia, que describe un aparato y procedimiento para la electroforesis automática y transferencia de
20 ácidos nucleicos. El aparato permite la electroforesis y la transferencia sin la manipulación externa del gel y está equipado de manera ideal para que realice procedimientos de acuerdo con la presente invención.

Además, los productos de amplificación descritos anteriormente pueden someterse a análisis de secuencia para identificar tipos específicos de variaciones usando técnicas de análisis de secuencia convencionales. En ciertos procedimientos, se realiza un análisis exhaustivo de genes por análisis de secuencia usando lotes de cebadores diseñados para secuenciación óptima (Pignon y col, (1994) Hum. Mutat., 3: 126-132, 1994). La presente invención proporciona procedimientos por los que pueden usarse cualquiera o todos estos tipos de análisis. Usando las secuencias descritas en este documento, los cebadores oligonucleotídicos pueden diseñarse para permitir la amplificación de secuencias en todo el gen de GHR que puede después analizarse por secuenciación directa.

Cualquiera de una diversidad de reacciones de secuenciación conocidas en la técnica puede usarse para secuenciar de manera directa el gen de GHR comparando la secuencia de la muestra con la secuencia tipo silvestre correspondiente (control). Los ejemplos de reacciones de secuenciación incluyen las basadas en técnicas desarrolladas por Maxam y Gilbert ((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560) o Sanger ((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463). También se contempla que cualquiera de una diversidad de procedimientos de secuenciación automática puede utilizarse cuando se realizan los ensayos de diagnóstico.

Componentes de Kit

Todos los materiales esenciales y reactivos requeridos para la detección

y secuenciación de GHR y variantes del mismo pueden ensamblarse juntos en un kit. Esto generalmente comprenderá cebadores y sondas preseleccionados. También pueden incluirse enzimas apropiadas para amplificar ácidos nucleicos incluyendo diversas polimerasas (RT, Taq, Sequenase™ etc.),
5 desoxinucleótidos y tampones para proporcionar la mezcla de reacción necesaria para amplificación. Dichos kits también comprenderán generalmente, en un medio apropiado, recipientes distintos para cada reactivo y enzima individual así como para cada cebador o sonda.

Diseño y Consideraciones Teóricas para RT-PCR™ Cuantitativa Relativa

10 La transcripción inversa (RT) de ARN o ADNc seguida por PCR cuantitativa relativa (RT-PCR) puede usarse para determinar las concentraciones relativas de especies de ARNm específicas aisladas de sujetos. Determinando que la concentración de una especie de ARNm específica varía, se demuestra que el gen que codifica la especie de ARNm
15 específica se expresa de manera diferencial. La PCR cuantitativa puede ser útil, por ejemplo, para examinar niveles relativos de ARNm de GHRd3 y GHRf1 en sujetos a tratar con un agente que funciona mediante la vía GHR, en un sujeto que se sospecha que padece de actividad GHR disminuida, o preferiblemente que padece de baja estatura, obesidad, infección, o diabetes;
20 acromegalia o afecciones de gigantismo que podrían estar asociadas con efectos lactogénicos, diabetogénicos, lipolíticos y anabólicos de proteínas; afecciones asociadas con retención de sodio y agua; síndromes metabólicos;

150
127

trastornos del estado de ánimo y el sueño, cáncer, enfermedad cardíaca o hipertensión.

En PCR, la cantidad de moléculas del ADN diana amplificado aumenta por un factor que se aproxima a dos con cada ciclo de la reacción hasta que algún reactivo llega a ser limitante. Por lo tanto, la velocidad de amplificación llega a disminuir cada vez más hasta que no hay aumento en la diana amplificada entre ciclos. Si se dibuja una gráfica en la que el número de ciclos está en el eje X y el logaritmo de la concentración del ADN diana amplificado está en el eje Y, se forma una línea curva de forma característica conectando los puntos dibujados. Comenzando con el primer ciclo, la pendiente de la línea es positiva y constante. Se dice que es la porción lineal de la curva. Después de que un reactivo llega a ser limitante, la pendiente de la línea comienza a disminuir y llega finalmente a ser cero. En este punto la concentración del ADN diana amplificado se vuelve asintótica a algún valor fijado. Se dice que es la porción estacionaria de la curva.

La concentración del ADN diana en la porción lineal de la amplificación de PCR es directamente proporcional a la concentración de partida de la diana antes de que comience la reacción. Determinando la concentración de los productos amplificados del ADN diana en reacciones de PCR que han completado el mismo número de ciclos y están en sus intervalos lineales, es posible determinar las concentraciones relativas de la secuencia diana específica en la mezcla original de ADN. Si las mezclas de ADN son ADNc

sintetizados a partir de ARN aislados de diferentes tejidos o células, pueden determinarse las abundancias relativas del ARNm específico a partir del que se ha obtenido la secuencia diana para los tejidos o células respectivos. Esta proporcionalidad directa entre la concentración de los productos de PCR y las abundancias relativas de ARNm es sólo cierta en el intervalo lineal de la reacción de PCR.

La concentración final del ADN diana en la porción estacionaria de la curva se determina por la disponibilidad de reactivos en la mezcla de reacción y es independiente de la concentración original de ADN diana. Por lo tanto, la primera condición que debe cumplirse antes de poder determinar las abundancias relativas de una especie de ARNm por RT-PCR para una colección de poblaciones de ARN es que las concentraciones de los productos de PCR amplificados deben muestrearse cuando las reacciones de PCR están en la porción lineal de sus curvas.

La segunda condición que debe cumplirse para determinar de manera exitosa las abundancias relativas de una especie de ARNm particular en un experimento de RT-PCR es que las concentraciones relativas de los ADNc amplificables deben normalizarse a algún patrón independiente. El objetivo de un experimento de RT-PCR es determinar la abundancia de una especie particular de ARNm en relación con la abundancia media de todas las especies de ARNm en la muestra. En los experimentos descritos a continuación, pueden usarse ARNm para GHRf1 como patrones con los cuales se compara la

abundancia relativa de ARNm de GHRd3.

La mayoría de los protocolos para PCR competitiva utilizan patrones de PCR internos que son aproximadamente tan abundantes como la diana. Estas estrategias son eficaces si los productos de las amplificaciones de PCR se muestr
5 muestran durante sus fases lineales. Si los productos se muestran cuando las reacciones se están acercando a la fase estacionaria, entonces el producto menos abundante llega a sobre representarse relativamente. Las comparaciones de abundancias relativas hechas para muchas muestras de ARN diferentes, tal como es el caso cuando se examinan muestras de ARN
10 para la expresión diferencial, llegan a estar deformadas de tal modo como para hacer que las diferencias en las abundancias relativas de ARN parezcan menos de las que hay en realidad. Esto no es un problema significativo si el patrón interno es mucho más abundante que la diana. Si el patrón interno es más abundante que la diana, entonces pueden hacerse comparaciones lineales
15 directas entre muestras de ARN.

El anterior análisis describe consideraciones teóricas para un ensayo de RT-PCR para materiales obtenidos de manera clínica. Los problemas inherentes en las muestras clínicas son que son de cantidad variable (haciendo problemática la normalización), y que son de calidad variable (necesitando la
20 co-amplificación de un control interno fiable, preferiblemente de tamaño más grande que la diana). Ambos problemas se superan si la RT-PCR se realiza como una RT-PCR cuantitativa relativa con un patrón interno en la que el

patrón interno es un fragmento de ADNc amplificable que es más grande que el fragmento de ADNc diana y en la que la abundancia del ARNm que codifica el patrón interno es aproximadamente 5-100 veces superior que el ARNm que codifica la diana. Este ensayo mide la abundancia relativa, no abundancia
5 absoluta, de la especie de ARNm respectiva.

Pueden realizarse otros estudios usando un ensayo de RT-PCR cuantitativo relativo más convencional con un protocolo de patrón externo. Estos ensayos muestrean los productos de PCR en la porción lineal de sus curvas de amplificación. La cantidad de ciclos de PCR que son óptimos para
10 muestrear debe determinarse de manera empírica para cada fragmento de ADNc diana. Además, los productos de transcriptasa inversa de cada población de ARN aislada de las diversas muestras tisulares deben normalizarse cuidadosamente para obtener concentraciones iguales de ADNc amplificables. Esta comparación es muy importante ya que el ensayo mide la abundancia
15 absoluta de ARNm. La abundancia absoluta de ARNm puede usarse como medición de la expresión génica diferencial sólo en muestras normalizadas. Aunque la determinación empírica del intervalo lineal de la curva de amplificación y normalización de preparaciones de ADNc son procedimientos tediosos y que llevan mucho tiempo, los ensayos de RT-PCR resultantes
20 pueden ser superiores a los obtenidos del ensayo de RT-PCR cuantitativo relativo con un patrón interno.

Una razón para esta ventaja es que sin el patrón/competidor interno,

todos los reactivos pueden convertirse en un producto de PCR único en el intervalo lineal de la curva de amplificación, aumentando de este modo la sensibilidad del ensayo. Otra razón es que con un único producto de PCR, la presentación del producto en un gel de electroforesis u otro procedimiento de
5 presentación llega a ser menos complejo, tiene menos ruido de fondo y es más fácil de interpretar.

Tecnologías de Chip

Los presentes inventores contemplan específicamente tecnologías de ADN basadas en chip tales como las descritas por Hacia y col., ((1996) Nature
10 Genetics, 14: 441-447) y Shoemaker y col., ((1996) Nature Genetics 14: 450-456). Brevemente, estas técnicas implican procedimientos cuantitativos para analizar grandes cantidades de genes fácilmente y de manera precisa. Marcando genes con oligonucleótidos o usando series de sondas fijadas, se puede emplear la tecnología de chip para segregar moléculas diana como
15 series de alta densidad y seleccionar estas moléculas respecto a la hibridación. Véase también Pease y col, ((1994) Proc. Nat'l Acad Sci. USA, 91: 5022-5026); Fodor y col., ((1991) Science, 251: 767-773).

Procedimientos para detectar proteína GHRd3 o GHRf1

Pueden usarse anticuerpos en la caracterización del contenido de
20 GHRd3 y/o GHRf1 en tejidos, a través de técnicas tales como ELISA y transferencia de Western. Los procedimientos para obtener polipéptidos GHRd3 y GHRf1 pueden realizarse usando procedimientos conocidos. Así

mismo, se describen adicionalmente en este documento procedimientos para preparar anticuerpos capaces de unirse selectivamente a las isoformas GHRd3 y GHRf1.

En un ejemplo, se contempla que pueden usarse anticuerpos GHR, incluyendo anticuerpos GHRd3, GHRf1 y GHR que no distinguen entre GHRd3 y GHRf1, en un ensayo ELISA. Por ejemplo, se inmovilizan anticuerpos anti-GHR en una superficie seleccionada, preferiblemente una superficie que muestra una afinidad por proteína tal como los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno. Después del lavado para retirar el material incompletamente adsorbido, es deseable unir o revestir los pocillos de la placa de ensayo con una proteína no específica que se sabe que es antigénicamente neutra con respecto al antisuero de ensayo tal como albúmina de suero bovino (BSA), caseína o soluciones de leche en polvo. Esto permite bloquear los sitios de adsorción no específicos en la superficie de inmovilización y reducir de este modo el ruido de fondo causado por la unión no específica del antígeno sobre la superficie.

Después de la unión del anticuerpo al pocillo, el revestimiento con un material no reactivo para reducir el ruido de fondo, y el lavado para retirar el material no unido, la superficie de movilización se pone en contacto con la muestra a ensayar de un modo que conduce a la formación de complejo inmune (antígeno/anticuerpo).

Después de la formación de inmunocomplejos específicos entre la

muestra de ensayo y el anticuerpo unido, y el posterior lavado, puede determinarse la aparición y la cantidad uniforme de formación de inmunocomplejo sometiendo la misma a un segundo anticuerpo que tiene especificidad para GHR que difiere del primer anticuerpo. Las condiciones apropiadas preferiblemente incluyen diluir la muestra con diluyentes tales como BSA, gama globulina bovina (BGG) y solución salina tamponada con fosfato (PBS)/Tween. Estos agentes añadidos también tienden a ayudar en la reducción de ruido de fondo no específico. El antisuero colocado en capas después se deja incubar durante aproximadamente 2 a aproximadamente 4 horas, a temperaturas preferiblemente del orden de aproximadamente 25°C a aproximadamente 27°C. Después de la incubación, la superficie en contacto con antisuero se lava para retirar el material no inmunocomplejado. Un procedimiento de lavado preferido incluye lavar con una solución tal como PBS/Tween o tampón borato.

Para proporcionar un medio de detección, el segundo anticuerpo preferiblemente tendrá una enzima asociada que generará un desarrollo de color después de la incubación con un sustrato cromogénico apropiado. Por tanto, por ejemplo, se deseará poner en contacto e incubar la superficie unida al segundo anticuerpo con una IgG anti-humana conjugada con ureasa o peroxidasa durante un periodo de tiempo y en condiciones que favorezcan el desarrollo de formación de inmunocomplejo (por ejemplo, incubación durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución que contiene PBS tal como

12A
157

PBS-Tween).

Después de la incubación con el segundo anticuerpo marcado con enzima, y después de lavar para retirar el material no unido, la cantidad de marcador se cuantifica por incubación con un sustrato cromogénico tal como urea y púrpura de bromocresol o ácido 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) y H_2O_2 , en el caso de peroxidasa como marcador enzimático. La cuantificación después se consigue midiendo el grado de generación de color, por ejemplo, usando un espectrofotómetro de espectro visible.

El formato precedente puede alterarse uniendo primero la muestra a la placa de ensayo. Después, se incuba el anticuerpo primario con la placa de ensayo, seguido de detección del anticuerpo primario unido usando un segundo anticuerpo marcado con especificidad por el anticuerpo primario.

Las etapas de otros diversos procedimientos de inmunodetección útiles se han descrito en la bibliografía científica, tal como, por ejemplo, Nakamura y col., En: Handbook of Experimental Immunology (4ª Ed), Weir. E., Herzenberg, L. A. Blackwell, C., Herzenberg, L. (eds). Vol. 1. Capítulo 27, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987; incorporados en este documento como referencia). Los inmunoensayos, en su sentido más simple y directo, son ensayos de unión. Ciertos inmunoensayos preferidos son los diversos tipos de radioinmunoensayos (RIA) y ensayo de captura de inmunoperlas. La detección inmunohistoquímica que usa secciones de tejido también es particularmente útil. Sin embargo, se apreciará fácilmente que la detección no está limitada a

dichas técnicas, y que también se pueden usar transferencia de Western, transferencia por puntos, análisis FACS, y similares con respecto a la presente invención.

En un ejemplo preferido, los niveles de GHRd3 pueden detectarse
5 usando un anticuerpo específico de GHRd3 usando los procedimientos descritos anteriormente. En otros procedimientos, la cantidad total de GHR se determina sin diferenciar entre GHRd3 y GHRf1, y se determina la cantidad de GHRf1. La diferencia en la cantidad de GHR no diferenciado y GHRf1 indica la cantidad de GHRd3 presente.

10 En un ejemplo alternativo, los niveles de GHRf1 pueden detectarse usando un anticuerpo específico de GHRf1 usando los procedimientos descritos anteriormente. En otros procedimientos, se determina la cantidad total de GHR sin diferenciar entre GHRf1 y GHRd3, y se determina la cantidad de GHRd3. La diferencia en la cantidad de GHR no diferenciado y GHRd3 indica
15 la cantidad de GHRf1 presente.

En otro ejemplo, pueden detectarse los niveles de GHRd3 usando un anticuerpo específico de GHRd3 y pueden detectarse los niveles de GHRf1 usando un anticuerpo específico de GHRf1.

Preferiblemente, dichos procedimientos detectan GHBP (por ejemplo, la
20 porción extracelular de GHRd3 o GHRf1) en circulación. Los ejemplos preferidos de procedimientos permiten la detección de GRH no diferenciado (por ejemplo, para decidir GHRd3 a partir de GHR total no diferenciado en

156
159

comparación con GHRf1), la detección de GHRd3 y/o detección de GHRf1. Dichos procedimientos incluyen el ensayo ELISA, el ensayo inmunofuncional mediado por ligando (LIFA) y el radioinmunoensayo (RIA).

LIFA para la detección de GHR no diferenciado (por ejemplo, GHRd3 o
5 GHRf1) puede realizarse de acuerdo con los procedimientos de Pflaum y col. ((1993) Exp. Clin. Endocrinol. 101. (Supl. 1): 44) y Kratzsh y col ((2001) Clin. Endocrinol. 54: 61-68). Brevemente, en un ejemplo, se detecta el GHR no diferenciado usando un anticuerpo anti-rGHBP monoclonal para revestir las placas de microtitulación. La muestra sérica o patrones de rGHBP glicosilada
10 se incuban junto con 10 ng/pocillo de hGH y un anticuerpo monoclonal dirigido frente a hGH como indicador biotinilado. La señal se amplifica por el sistema de estreptavidina marcada con europio y se mide usando un fluorímetro. En otro ejemplo, se realiza un radioinmunoensayo competitivo (RIA) para detectar GHBP no diferenciada, usando un anticuerpo anti-rhGHBP, patrones rhGHBP y
15 125I-rhGHBP como antígeno marcado como se describe en Kratzsh y col. ((1995) Eur. J. Endocrinol. 132: 306-312).

En otro ejemplo descrito en Kratzsch y col. ((2001) Clin. Endocrinol. 54: 61-68), se detecta GHBP no diferenciada revistiendo una placa de microtitulación que se reviste con 100 µl del anticuerpo monoclonal 10B8 que
20 se une a GHBP fuera del sitio de unión a hGH (Rowlinson y col. (1999)), en 50mmol/litro de tampón fosfato sódico, pH 9,6. Después de la etapa de lavado, se añaden 25 µl de muestra o patrón y 50 ng de mAb 5C6 anti-GHGBP

marcado con biotina (que se une a GHBP en el sitio de unión a hGH) (Rowlinson y col (1999)) en 75 µl de tampón de ensayo (Tris-(hidroximetil)-aminometano 50 mM, NaCl 150 mM, NaN₃ al 0,05%, Tween 40 al 0,01%, BSA al 0,5%, gamma-globulina bovina al 0,05%, 20 µmo/litro de ácido dietilenotriaminopentacético) y se incuba durante una noche. La cantidad de GHRf1 después se determina usando un anticuerpo específico para la forma f1 que contiene el exón 3 de GHBP). Brevemente, se inmoviliza mAb 10B8 en las placas de microtitulación como en el caso de GHBP no diferenciado. Después de la etapa de lavado, se añaden 25 µl de muestra o patrón y 75µl de un anticuerpo policlonal de conejo frente a péptido GHRd3 descrito en Kratzsch y col. (2001) (diluido 1:10000) y se incuba durante una noche. Se añaden 20 ng de IgG murina biotinilada anti-conejo a cada pocillo y se incuban durante 2 horas seguido de un aclarado repetido. Las señales se amplifican por el sistema de estreptavidina marcada con europio y se mide usando un fluorímetro. Se usa hGHBP no glicosilada recombinante, diluida en suero de oveja, como un patrón.

Los anticuerpos específicos para GHRd3 para usar de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse usando procedimientos conocidos. Puede usarse una proteína GHRd3 aislada, o una porción o fragmento de la misma, como inmunógeno para generar anticuerpos que se unan a GHRd3 usando técnicas convencionales para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Puede usarse una proteína GHRd3 o,

alternativamente, la invención proporciona fragmentos de péptidos antigénicos de GHRd3 para usar como inmunógenos.

Los polipéptidos GHRd3 pueden prepararse usando medios conocidos, por purificación a partir de una muestra biológica obtenida de un individuo o
5 más preferiblemente como polipéptidos recombinantes. La secuencia de aminoácidos de GHRf1 se muestra en SEC ID N° 2, a partir de la cual GHRd3 difiere por una delección de 22 aminoácidos codificada por el exón 3. El péptido antigénico de GHRd3 comprende preferiblemente al menos 8 restos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 2, donde
10 al menos un aminoácido está fuera de dichos restos de aminoácidos codificados por el exón 3. Dichos péptido antigénico abarca un epítipo de GHRd3 de modo que un anticuerpo generado frente al péptido forma un complejo inmune específico con GHRd3. Preferiblemente, el anticuerpo se une de manera selectiva o preferencial a GHRd3 y no se une sustancialmente a
15 GHRf1. Preferiblemente, el péptido antigénico comprende al menos 10 restos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 15 restos de aminoácidos, incluso mas preferiblemente al menos 20 restos de aminoácidos, y más preferiblemente al menos 30 restos de aminoácidos.

Los epítipes preferidos abarcados por el péptido antigénico son
20 regiones de GHRd3 que están localizadas en la superficie de la proteína, por ejemplo, regiones hidrófilas.

Un inmunógeno de GHRd3 se usa típicamente para preparar

anticuerpos por inmunización de un sujeto apropiado (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) con el inmunógeno. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, proteína GHRd3 expresada de manera recombinante o un polipéptido GHRd3 sintetizado químicamente. La preparación también puede incluir un adyuvante, tal como el adyuvante completo o incompleto de Freund, o un agente inmunoestimulador similar. La inmunización de un sujeto apropiado con una preparación de GHRd3 inmunogénica induce una respuesta de anticuerpo anti-GHRd3 policlonal.

10 Por consiguiente, otro aspecto de la invención se refiere a los anticuerpos anti-GHRd3. El término "anticuerpo" como se usa en este documento se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un antígeno, tal como GHRd3. Los ejemplos de porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂ que pueden generarse tratando el anticuerpo con una enzima tal como pepsina. La invención proporciona anticuerpos policlonales y monoclonales que se unen a GHRd3. El

15

20 término "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa en este documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie de un sitio de unión a antígeno

capaz de inmunorreaccionar con un epítoto particular de GHRd3. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta, de este modo, típicamente una única afinidad de unión para una proteína GHRd3 particular con la que inmunorreacciona.

5 La invención concierne a las composiciones de anticuerpo, policlonales o monoclonales, capaces de la unión de manera selectiva, o unirse selectivamente a un polipéptido que contiene un epítoto que comprende un tramo contiguo de al menos 6 aminoácidos, preferiblemente al menos 8 a 10 aminoácidos, más preferiblemente al menos 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, ó 100
10 aminoácidos de SEC ID N° 2, incluyendo preferiblemente dicho tramo contiguo al menos un aminoácido fuera de dicho tramo de 22 aminoácidos codificado por el exón 3 del gen de GHR.

Los anticuerpos policlonales anti-GHRd3 pueden prepararse como se ha descrito anteriormente inmunizando un sujeto apropiado con inmunógeno
15 GHRd3. El título del anticuerpo anti-GHRd3 en el sujeto inmunizado puede controlarse durante un tiempo por técnicas convencionales, tales como con un enzimoensayo inuniosorbente (ELISA) usando GHRd3 inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas frente a GHRd3 pueden asilarse del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente por
20 técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de proteína A para obtener la fracción IgG. En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpo anti-GHRd3 están más altos, pueden

obtenerse células productoras de anticuerpo a partir del sujeto y usarse para preparar anticuerpos monoclonales por técnicas convencionales, tales como la técnica de hibridoma descrita en un principio por Kohler y Milstein ((1975) Nature 256: 495-497) (véase también, Brown y col (1981) J. Immunol. 127: 539-46; Brown y col. (1980) J. Biol. Chem. 255: 4980-83; Yeh y col (1976) PNAS 76: 2927-31; y Yeh y col (1982) Int. J. Cancer 29: 269-75), la técnica más reciente de hibridoma de células B humanas (Kozbor y col. (1983) Immunol Today 4: 72), la técnica de EBV-hibridoma (Cole y col. (1985), Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96) o técnicas de trioma. La tecnología de producción de hibridomas de anticuerpos monoclonales es bien conocida (véase, en líneas generales, R. H. Kenneth, en Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., Nueva York, N. Y. (1980); E. A. Lerner (1981) Yale J. Biol. Med., 54: 387-402; M. L. Geffer y col. (1977) Somatic Cell Genet. 3: 231-36). Brevemente, se fusiona una línea celular inmortal (típicamente un mieloma) a linfocitos (típicamente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un inmunógeno GHRd3 como se ha descrito anteriormente, y los sobrenadantes del cultivo de las células de hibridoma resultantes se exploran para identificar un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal que se una a GHRd3.

Cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos usados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas puede aplicarse para el

propósito de generar un anticuerpo monoclonal anti-GHRd3 (véase, por ejemplo, G. Galfre y col. (1977) Nature 266: 55052; Gefter y col. Somatic Cell Genet., citado supra; Lerner, Yale J Biol. Med, citado supra; Kenneth, Monoclonal Antibodies, citado supra). Además, un especialista en la técnica

5 apreciará que hay muchas variaciones de dichos procedimientos que también serían útiles. Típicamente, la línea celular inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma) se obtiene de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, los híbrdomas murinos pueden hacerse por fusión de linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la

10 presente invención con una línea celular de ratón inmortalizada. Las líneas celulares inmortales preferidas son líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles a medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Cualquiera de varias líneas celulares de mieloma pueden usarse como pareja de fusión de acuerdo con técnicas convencionales,

15 por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de mieloma están disponibles por la ATCC. Típicamente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan a esplenocitos de ratón usando polietilenglicol ("PEG"). Las células de híbrdoma resultantes de la fusión se seleccionan después usando medio HAT, que elimina células de

20 mieloma fusionadas de manera no productiva y no fusionadas (los esplenocitos no fusionados mueren después de varios días porque no se han transformado). Las células de híbrdoma que producen un anticuerpo monoclonal de la

invención se detectan por exploración de los sobrenadantes de cultivo de hibridoma respecto a anticuerpos que se unen a GHRd3, por ejemplo, usando un ensayo ELISA convencional.

De manera alternativa a la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, puede identificarse un anticuerpo anti-GHRd3 monoclonal y asilarse por exploración de una biblioteca de inmunoglobulinas combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca que presente fagos de anticuerpo) con GHRd3 para aislar de este modo miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que se unen a GHRd3. Los kits para generar y explorar las bibliotecas que muestran fagos están disponibles en el mercado (por ejemplo, el Sistema de Anticuerpo de Fago Recombinante Pharmacia, N° de catálogo 27-9400-01; y el Kit de Presentación de Fago Stratagene SurfZAP.TM., N° de catálogo 240612). Adicionalmente, pueden encontrarse ejemplos de procedimientos y reactivos particularmente flexibles para usar en la generación y exploración de una biblioteca que presente anticuerpos en, por ejemplo, Ladner y col. Patente de Estados Unidos N° 5.223.409; Kang y col. Publicación Internacional PCT N° WO 92/18619; Dower y col. Publicación Internacional PCT N° WO 91/17271; Winter y col. Publicación Internacional PCT N° WO 92/20791; Markland y col. Publicación Internacional PCT N° WO 92/15679; Breitling y col. Publicación Internacional PCT N° WO 93/01288; McCafferty y col. Publicación Internacional PCT N° WO 92/01047; Garrard y col. Publicación Internacional PCT N° WO 92/09690; Ladner y col. Publicación Internacional

169
167

PCT Nº WO 90/02809; Fuchs y col. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay y col (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3: 81-85; Huse y col. (1989) *Science* 246: 1275-1281; Griffiths y col (1993) *EMBO J* 12: 725-734; Hawkins y col. (1992) *J. Mol. Biol.* 226: 889-896; Clarkson y col. (1991) *Nature* 352: 624-628; Gram y
 5 col. (1992) *PNAS* 89: 3576-3580; Garrad y col. (1991) *Bio/Technology* 9: 1373-1377; Hoogenboom y col. (1991) *Nuc. Acid Res.* 19: 4133-4137; Barbas y col. (1991) *PNAS* 88: 7978-7982; y McCafferty y col. *Nature* (1990) 348: 552-554.

Puede usarse un anticuerpo anti-GHRd3 (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) para aislar GHRd3 por técnicas convencionales, tales como
 10 cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Un anticuerpo anti-GHRd3 puede facilitar la purificación de GHRd3 natural a partir de células y de GHRd3 producida de manera recombinante expresada en células huésped. Además, un anticuerpo anti-GHRd3 puede usarse para detectar proteína GHRd3 (por ejemplo, en un lisado celular o sobrenadante celular) para evaluar la
 15 abundancia y patrón de expresión de la proteína GHRd3. Los anticuerpos anti-GHRd3 pueden usarse a manera de diagnóstico para controlar los niveles proteicos en tejido como parte del procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse por el acoplamiento (es decir, unión física) del
 20 anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radiactivos.

Los ejemplos de enzimas apropiadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos apropiados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes apropiados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, 5 fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorin, y ejemplos de materiales radiactivos apropiados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

10 En un ejemplo preferido, se obtiene la proteína o polipéptido GHRd3 sustancialmente puro. La concentración de proteína en la preparación final se ajusta, por ejemplo, por concentración en un dispositivo de filtro Amicon, al nivel de unos pocos microgramos por ml. Los anticuerpos monoclonales o policlonales frente a la proteína después pueden prepararse del siguiente 15 modo: Producción de Anticuerpos Monoclonales por Fusión de Hibridoma. Los anticuerpos monoclonales frente a epítopes en el GHRd3 o una porción del mismo pueden prepararse a partir de hibridomas murinos de acuerdo con el procedimiento clásico de Kohler y Milstein (Nature, 256: 495, 1975) o procedimientos derivados del mismo (véase, Harlow y Lane, Antibodies A 20 Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, páginas 53-242, 1988).

Brevemente, un ratón se inocula de manera repetida con unos pocos microgramos del GHRd3 o una porción del mismo durante un periodo de una

pocas semanas. El ratón después se sacrifica, y las células productoras de anticuerpos del bazo se aíslan. Las células del bazo se fusionan por medio de polietilenglicol con células de mieloma de ratón, y el exceso de células no fusionadas se destruye por crecimiento del sistema en medio selectivo que comprende aminopterina (medio HAT). Las células fusionadas exitosamente se diluyen y se colocan alícuotas de la dilución en pocillos de una placa de microtitulación donde continúa el crecimiento del cultivo. Los clones productores de anticuerpos se identifican por detección de anticuerpos en el fluido sobrenadante de los pocillos por procedimientos de inmunoensayo, tales como ELISA, como se describe en un principio por Engvall, E., Meth. Enzymol. 70: 419 (1980). Los clones positivos seleccionados pueden expandirse y su producto de anticuerpo monoclonal se recoge para el uso. Los procedimientos detallados para la producción de anticuerpos monoclonales se describen en Davis, L. y col. Basic Methods in Molecular Biology Elsevier, Nueva York.

15 Sección 21-2.

Las composiciones de anticuerpo de la presente invención encontrarán gran uso en análisis de inmunotransferencia o transferencia de Western. Los anticuerpos pueden usarse como reactivos primarios de alta afinidad para la identificación de proteínas inmovilizadas en una matriz de soporte sólido, tal como nitrocelulosa, nylon o combinaciones de los mismos. Junto con inmunoprecipitación, seguido por electroforesis en gel, estos pueden usarse como un reactivo de etapa única para usar en la detección de antígenos frente

20

a los cuales los reactivos secundarios usados en la detección del antígeno provocan un ruido de fondo adverso. Los procedimientos de detección de base inmunológica para usar junto con la transferencia de Western que incluyen anticuerpos secundarios frente al resto de toxina marcados de manera 5 enzimática, radiomarcados, o marcados de manera fluorescente se consideran de particular uso a este respecto. Las Patentes de Estados Unidos con respecto al uso de dichos marcadores incluyen las Patentes de Estados Unidos N° 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241, incorporada cada una en este documento como referencia. Por 10 supuesto, pueden encontrarse ventajas adicionales a través del uso de un ligando de unión secundario tal como un anticuerpo secundario o un ordenamiento de unión de ligando biotina/avidina, como se conoce en la técnica.

Administración de composiciones de GH

15 La GH a usar de acuerdo con la invención puede estar en forma de secuencia nativa o en forma variante, y a partir de cualquier fuente, natural, sintética, o recombinante. Los ejemplos incluyen hormona del crecimiento humana (hGH) que es GH natural o recombinante con la secuencia nativa humana (GENOTROPIN™, somatotropina o somatropina), y hormona del 20 crecimiento recombinante (rGH), que se refiere a cualquier GH o variante de GH producida por medio de tecnología de ADN recombinante, incluyendo somatrem, somatotropina, y somatropina. Para el uso humano se prefiere en

este documento una GH madura de secuencia nativa humana recombinante con o sin una metionina en su extremo N-terminal. Es mas preferido GENOTROPIN™ (Pharmacia, U.S.A.) que es un polipéptido GH humano recombinante. También se prefiere metionil-hormona del crecimiento humano
5 (met-hGH) producida en E. coli, por ejemplo, por el proceso descrito en la Patente de Estados Unidos Nº 4.755.465 expedida el 5 de julio de 1988 y Goeddel y col. Nature, 282: 544 (1979). Met-hGH, vendida como PROTROPIN™ (Genentech, Inc. U.S.A.), es idéntica al polipéptido natural, con la excepción de la presencia de un resto de metionina N-terminal. Otro ejemplo
10 es hGH recombinante vendida como NUTROPIN™ (Genentech. Inc. U.S.A.). Esta última hGH carece del resto de metionina y tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la hormona natural. Véase Gray y col., Biotechnology 2: 161 (1984). Otro ejemplo de GH es una variante de hGH que es una forma placentaria de GH con actividad somatogénica pura y no
15 lactogénica, como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 4.670.393. También se incluyen variantes de GH, por ejemplo, las descritas en los documentos WO 90/04788 y WO 92/09690. Otros ejemplos incluyen composiciones de GH que funcionan como antagonistas de GHR, tales como pegvisomant (SOMAVERT™, Pharmacia, U.S.A.) que puede usarse para el
20 tratamiento de acromegalia.

GH puede administrarse directamente a un sujeto por cualquier técnica apropiada, incluyendo por vía parenteral, intranasal, intrapulmonar, oral, o por

169
172

absorción a través de la piel. Pueden administrarse de manera local o sistémica. Los ejemplos de administración parenteral incluyen administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, e intraperitoneal. Preferiblemente, se administran por inyección subcutánea diaria.

5 La GH a usar en la terapia se formulará y dosificará de un modo consistente con la buena práctica médica, teniendo en cuenta la condición clínica del sujeto individuo (especialmente los efectos secundarios del tratamiento con GH sola), el sitio de suministro de la composición o composiciones de GH, el procedimiento de administración, la programación de
10 administración, y otros factores conocidos por los médicos. Las "cantidades eficaces" de cada componente para propósitos de este documento se determinan, por tanto, por dichas consideraciones y son cantidades que aumentan las velocidades de crecimiento de los sujetos.

Para GH, se emplea preferiblemente una dosis de más de
15 aproximadamente 0,2 mg/kg/semana, más preferiblemente más de aproximadamente 0,25 mg/kg/semana, e incluso más preferiblemente más de o igual a aproximadamente 0,3 mg/kg/semana. En una realización, la dosis de GH varía de aproximadamente 0,3 a 1,0 mg/kg/semana, y en otra realización, 0,35 a 1,0 mg/kg/semana.

20 Preferiblemente, la GH se administra una vez por día por vía subcutánea. En aspectos preferidos, la dosis de GH está entre aproximadamente 0,001 y 0,2 mg/kg/día. Aún más preferiblemente, la dosis de

GH está entre aproximadamente 0,010 y 0,10 mg/kg/día.

Como se ha analizado, los sujetos homocigóticos o heterocigóticos para el alelo GHRf1 se espera que tengan una respuesta positiva superior frente al tratamiento con GH que sujetos homocigóticos para el alelo GHRd3. En
5 aspectos preferidos, una dosis administrada a sujetos homocigóticos para el alelo GHRd3 será mayor que la dosis administrada a un sujeto que es heterocigótico para el alelo GHRd3 y la dosis administrada a sujetos heterocigóticos para el alelo GHRd3 será mayor que la dosis administrada a un sujeto que es homocigótico para el alelo GHRf1.

10 La GH se administra apropiadamente de manera continua o no continua, tal como a tiempos particulares (por ejemplo, una vez al día) en forma de una inyección o una dosis particular, donde habrá un aumento en la concentración de GH en plasma en el momento de la inyección, y después una bajada en la concentración de GH en plasma hasta el momento de la siguiente inyección.
15 Otro procedimiento de administración no continuo es el resultado del uso de microesferas PLGA y muchos dispositivos de implante disponibles que proporcionan una liberación discontinua de ingrediente activo, tal como una explosión inicial, y después un retardo antes de la liberación del ingrediente activo. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.767.628.

20 La GH también puede administrarse para que tenga una presencia continua en la sangre que se mantiene durante la duración de la administración de la GH. Esto se consigue más preferiblemente por medio de infusión continua

mediante, por ejemplo, minibombas tales como una minibomba osmótica. Como alternativa, se consigue apropiadamente por el uso de inyecciones frecuentes de GH (es decir, más de una vez al día, por ejemplo, dos o tres veces al día)

5 En otra realización más, puede administrarse GH usando formulaciones de GH de larga duración que retardan la eliminación de GH de la sangre o provocan una liberación lenta de GH a partir de, por ejemplo, un sitio de inyección. La formulación de larga duración que prolonga la eliminación de GH en plasma puede estar en forma de GH complejada, o conjugada de manera
10 covalente (por unión reversible o irreversible) a una macromolécula tal como una o más de sus proteínas de unión (documento WO 92/08985) o un polímero soluble en agua seleccionado entre PEG y homopolímeros de polipropilenglicol y polioles de polioxietileno, es decir, los que son solubles en agua a temperatura ambiente. Como alternativa, la GH puede complejarse o unirse a
15 un polímero para aumentar su semivida en circulación. Los ejemplos de polioles de polietileno y polioles de polioxietileno útiles para este propósito incluyen polioxietilenglicerol, polietilenglicol, polioxietilensorbitol, polioxietilenglucosa, o similares. La estructura glicerol de polioxietilenglicerol es la misma estructura que se encuentra en, por ejemplo, animales y seres
20 humanos en mono-, di-, y triglicéridos.

El polímero no necesita tener ningún peso molecular particular, pero se prefiere que el peso molecular esté entre aproximadamente 3500 y 100.000,

mas preferiblemente entre 5000 y 40.000. Preferiblemente el homopolímero PEG está sin sustituir, pero también puede estar sustituido en un extremo con un grupo alquilo. Preferiblemente, el grupo alquilo es un grupo alquilo C1-C4, y más preferiblemente un grupo metilo. Más preferiblemente, el polímero es un

5 homopolímero no sustituido de PEG, un homopolímero monometil-sustituido de PEG (mPEG), o polioxietilenglicerol (POG) y tiene un peso molecular de aproximadamente 5000 a 40.000.

La GH se une de manera covalente mediante uno o más de los restos de aminoácidos de la GH a un grupo reactivo terminal del polímero, dependiendo

10 principalmente de las condiciones de reacción, el peso molecular del polímero, etc. El polímero con el grupo o grupos reactivos se denomina en este documento como polímero activado. El grupo reactivo reacciona de manera selectiva con grupos amino libres u otros grupos reactivos en la GH. Se entenderá, sin embargo, que el tipo y cantidad del grupo reactivo elegido, así

15 como el tipo de polímero empleado, para obtener resultados óptimos, dependerá de la GH particular empleada para evitar que el grupo reactivo reaccione con demasiados grupos particularmente activos en la GH. Como no puede ser posible evitarlo completamente, se recomienda que se emplee generalmente de aproximadamente 0,1 a 1000 moles, preferiblemente 2 a 200

20 moles, de polímero activado por mol de proteína, dependiendo de la concentración de proteína. La cantidad final de polímero activado por mol de proteína es un equilibrio que mantiene la actividad óptima aunque optimizando

al mismo tiempo, si es posible, la semivida en circulación de la proteína.

Aunque los restos pueden ser cualquier aminoácido reactivo de la proteína, tal como una o dos cisteínas o el grupo aminoácido N-terminal, preferiblemente el aminoácido reactivo es lisina, que se une al grupo reactivo
5 del polímero activado a través de su grupo epsilon-amino libre, o ácido glutámico o aspártico, que se une al polímero a través de un enlace amida.

La reacción de modificación covalente puede tener lugar por cualquier procedimiento apropiado usado generalmente para hacer reaccionar materiales biológicamente activos con polímeros inertes, preferiblemente
10 aproximadamente a pH 5-9, más preferiblemente 7-9 si los grupos reactivos de la GH son grupos lisina. En líneas generales, el procedimiento implica preparar un polímero activado (con al menos un grupo hidroxilo terminal), preparar un sustrato activo a partir de este polímero, y hacer reaccionar después la GH con el sustrato activo para producir la GH apropiada para formulación. La reacción
15 de modificación anterior puede realizarse por varios procedimientos, que pueden implicar una o más etapas. Los ejemplos de agentes modificadores que pueden usarse para producir el polímero activado en una reacción de una etapa incluyen cloruro de ácido cianúrico (2, 4, 6-tricloro-S-triazina) y fluoruro de ácido cianúrico.

20 En una realización la reacción de modificación tiene lugar en dos etapas donde el polímero primero se hace reaccionar con un anhídrido ácido tal como anhídrido succínico o glutárico para formar un ácido carboxílico, y el ácido

carboxílico después se hace reaccionar con un compuesto capaz de reaccionar con el ácido carboxílico para formar un polímero activado con un grupo éster reactivo que es capaz de reaccionar con la GH. Los ejemplos de dichos compuestos incluyen N-hidroxisuccinimida, ácido 4-hidroxi-3-nitrobencenosulfónico, y similares, y preferiblemente se usan N-hidroxisuccinimida o ácido 4-hidroxi-3-nitrobencenosulfónico. Por ejemplo, puede hacerse reaccionar PEG monometil-sustituido a elevadas temperaturas, preferiblemente aproximadamente 100-110°C durante cuatro horas, con anhídrido glutárico. El monometil PEG-ácido glutárico producido de este modo después se hace reaccionar con N-hidroxisuccinimida en presencia de un reactivo carbodiimida tal como diciclohexil o isopropil carbodiimida para producir el polímero activado, metoxipolietilenglicolil-N-succinimidil glutarato, que después puede hacerse reaccionar con la GH. Este procedimiento se describe con detalle en Abuchowski y col., Cancer Biochem. Biophys., 7: 175-186 (1984). En otro ejemplo, el PEG sustituido con monometilo puede hacerse reaccionar con anhídrido glutárico seguido de reacción con ácido 4-hidroxi-3-nitrobencenosulfónico (HNSA) en presencia de diciclohexilcarbodiimida para producir el polímero activado. HNSA se describe por Bhatnagar y col., Peptides: Synthesis-Structure-Function, Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium, Rich y col., (eds.) (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., 1981), páginas 97-100, y en Nitecki y col., High-Technology Route to Virus Vaccines (American Society for Microbiology: 1986) titulado "Novel Agent for

~~175~~
178

Coupling Synthetic Peptides to Carriers y Its Applications."

Los procedimientos específicos para producir GH conjugada con PEG incluyen los procedimientos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 4.179.337 sobre PEG-GH y la Patente de Estados Unidos N° 4.935.465, que describe PEG unido de manera reversible pero covalente a GH.

La GH también puede administrarse de manera apropiada por sistemas de liberación sostenida. Los ejemplos de composiciones de liberación sostenida útiles en este documento incluyen matrices de polímeros semipermeables en forma de artículos con forma, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen polilactidas (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919, documento EP 58.481), copolímeros de ácidos L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman y col., Biopolymers, 22, 547-556 (1983), poli(2-hidroxietilmetacrilato) (Langer y col., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981); Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982), etilenvinilacetato (Langer y col., supra) o ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988), o microesferas PLGA.

Las composiciones de GH de liberación sostenida también incluyen GH atrapada en liposomas. Los liposomas que contienen GH se preparan por procedimientos conocidos per se: documento DE 3.218.121; Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 3688-3692 (1985); Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980); documentos EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; Solicitud de Patente japonesa 83-118008;

Patente de Estados Unidos Nº 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 102.324. Generalmente, los liposomas son de tipo unilamelar pequeños (aproximadamente 200-800 Angstroms) en los que el contenido lipídico es mayor de aproximadamente el 30% en moles de colesterol, estando la
5 proporción seleccionada ajustada para la terapia óptima. Además, una formulación de liberación sostenida biológicamente activa puede hacerse a partir de un aducto de la GH unida de manera covalente a un polisacárido activado como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 4.857.505. Además, la patente de Estados Unidos Nº 4.837.381 describe una composición
10 de microesfera de grasa o cera o una mezcla de las mismas y GH para liberación lenta.

En otra realización, los sujetos identificados anteriormente también se tratan con una cantidad eficaz de IGF-I. Como proposición general, la cantidad farmacéuticamente eficaz total de IGF-I administrada por vía parenteral por
15 dosis estará en el intervalo de aproximadamente 50 a 240 µg/kg/día, preferiblemente 100 a 200 µg/kg/día, de peso corporal del sujeto, aunque, como se ha observado anteriormente, esto estará sometido al criterio de la discreción terapéutica. Además, preferiblemente el IGF-1 se administra una vez o dos veces por día por inyección subcutánea. En otra realización, tanto IGF-1
20 como GH pueden administrarse al sujeto, cada uno en cantidades eficaces, o cada uno en cantidades que están por debajo de la óptima pero que cuando se combinan son eficaces. Preferiblemente se administra GH aproximadamente

0,001 a 0,2 mg/kg/día o más preferiblemente aproximadamente 0,01 a 0,1 mg/kg/día de GH. Preferiblemente, la administración tanto de IGF-I como GH es por inyección usando, por ejemplo, un medio intravenoso o subcutáneo. Más preferiblemente, la administración es por inyección subcutánea tanto para IGF-I
5 como para GH, más preferiblemente inyecciones diarias.

Se observa que los médicos que elaboran dosis tanto de IGF-I como de GH deben tener en cuenta los efectos secundarios conocidos del tratamiento con estas hormonas. Para GH, los efectos secundarios incluyen retención de sodio y expansión del volumen extracelular (Ikko y col., Acta Endocrinol.
10 (Copenhagen); 32: 341-361 (1959); Biglieri y col., J. Clin. Endocrinol. Metab., 21: 361-370 (1961), así como hiperinsulinemia e hiperglucemia. El efecto secundario aparente principal de IGF-I es hipoglucemia. Guler y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2868-2872 (1989). De hecho, la combinación de IGF-I y GH puede conducir a una reducción de los efectos secundarios no deseados
15 de ambos agentes (por ejemplo, hipoglucemia para IGF-I e hiperinsulinismo para GH) y a una restauración de los niveles sanguíneos de GH, la secreción de la cual se suprime por IGF-I.

Para administración parenteral, en una realización, GH se formula generalmente mezclando la GH en el grado de pureza deseado, en una forma
20 inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión, o emulsión), con un vehículo farmacéuticamente aceptable, es decir, uno que es no tóxico para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y es compatible

con otros ingredientes de la formulación. Por ejemplo, la formulación preferiblemente no incluye agentes oxidantes y otros compuestos que se sabe que son nocivos para los polipéptidos. Generalmente, las formulaciones se preparan poniendo en contacto la GH con vehículos líquidos o vehículos sólidos divididos en trozos muy pequeños o ambos. Después, si es necesario, al producto se da forma en la formulación deseada. Preferiblemente, el vehículo es un vehículo parenteral, más preferiblemente una solución que es isotónica con la sangre del receptor. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, y solución de dextrosa. Los vehículos no acuosos tales como aceites fijados y oleato de etilo también son útiles en este documento, así como liposomas.

El vehículo contiene apropiadamente cantidades minoritarias de aditivos tales como sustancias que potencian la isotonicidad y estabilidad química. Dichos materiales son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético, y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez restos), por ejemplo, poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácidos glutámico, ácido aspártico, o arginina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo celulosa o sus derivados,

glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos, poloxámeros, o PEG.

GH se formula típicamente de manera individual en dichos vehículos a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, preferiblemente 1-10 mg/ml, a un pH de aproximadamente 4,5 a 8. GH preferiblemente está a pH de 7,4-7,8. Se entenderá que el uso de ciertos de los excipientes, vehículos, o estabilizadores anteriores darán como resultado la formación de sales de GH.

Aunque GH puede formularse por cualquier procedimiento apropiado, las formulaciones preferidas para GH son las siguientes: para un hGH preferido (GENOTROPIN™), una jeringa de dosis única contiene 0,2 mg, 0,4 mg, 0,6 mg, 0,8 mg, 1,0 mg, 1,2 mg, 1,4 mg, 1,6 mg, 1,8 mg ó 2,0 mg de somatropina recombinante. Dicha jeringa de GENOTROPIN™ también contiene 0,21 mg de glicina, 12,5 mg de manitol, 0,045 mg de monoatriofosfato, 0,025 mg de fosfato disódico y agua hasta 0,25 ml.

Para met-GH (PROTROPIN™), la solución a granel pre-liofilizada contiene 0,2 mg/ml de met-GH, 16,0 mg/ml de manitol, 0,14 mg/ml de fosfato sódico, y 1,6 mg/ml de fosfato sódico (monobásico monohidrato), pH 7,8. El vial de 5 mg de met-GH contiene 5 mg de met-GH, 40 mg de manitol, y 1,7 mg de fosfato sódico total (peso seco) (dibásico anhidro), pH 7,8. El vial de 10 mg contiene 10 mg de met-GH, 80 mg de manitol, y 3,4 mg de fosfato sódico total

(peso seco) (dibásico anhidro), pH 7,8.

Para GH sin met (NUTROPIN™), la solución a granel pre-liofilizada contiene 2,0 mg/ml de GH, 18,0 mg/ml de manitol, 0,68 mg/ml de glicina, 0,45 mg/ml de fosfato sódico, y 1,3 mg/ml de fosfato sódico (monobásico monohidrato), pH 7,4. El vial de 5 mg contiene 5 mg de GH, 45 mg de manitol, 1,7 mg de glicina, y 1,7 mg de fosfato sódico total (peso seco) (dibásico anhidro) pH 7,4. El vial de 10 mg contiene 10 mg de GH, 90 mg de manitol, 3,4 mg de glicina, y 3,4 mg de fosfato sódico total (peso seco) (dibásico anhidro).

Como alternativa, puede usarse una formulación líquida para hGH NUTROPIN™, por ejemplo: 5,0 +- 0,5 mg/ml de rhGH; 8,8+- 0,9 mg/ml de cloruro sódico; 2,0 +- 0,2 mg/ml de Polisorbato 20; 2,5 +- 0,3 mg/ml de fenol; 2,68 +- 0,3 mg/ml de citrato sódico dihidrato, y 0,17 +- 0,02 mg/ml de ácido cítrico anhidro (citrato sódico anhidro total/ácido cítrico es 2,5 mg/ml, o 10 mM); pH 6,0 +- 0,3. Esta formulación se pone apropiadamente en un vial de 10 mg, que se carga con 2,0 ml de la formulación anterior en un vial de vidrio 3-cc. Como alternativa, un cartucho de 10 mg (2,0 ml) que contiene la formulación anterior puede colocarse en una pluma de inyección para inyección de GH líquida al sujeto.

Las composiciones de GH a usar para administración terapéutica son preferiblemente estériles. La esterilidad se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles (por ejemplo, membranas de 0,2 micrómetros). Las composiciones de GH terapéuticas generalmente se colocan

en un recipiente que tiene una vía de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

La GH habitualmente se almacenará en recipientes de una dosis o
5 multidosis, por ejemplo, ampollas o viales sellados, como solución acuosa, o como una formulación liofilizada para reconstitución. Como ejemplo de una formulación liofilizada, los viales se cargan con soluciones de GH acuosas filtradas estériles (p/v), y la mezcla resultante se liofiliza. La solución de infusión se prepara por reconstitución de la GH liofilizada usando agua para inyección
10 bacteriostática.

La invención se entenderá más completamente como referencia a los siguientes ejemplos. No deben entenderse, sin embargo, como limitantes del alcance de la invención. Toda la bibliografía y citaciones de patentes se incorporan expresamente en este documento como referencia.

15

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Genotipificación para GHRd3 y GHRf1

El ADN genómico de pacientes se obtuvo de sangre periférica siguiendo el procedimiento descrito por Lahiri y Numberger (Nucl Ac Res 1991; 19: 5444).
20 La amplificación de un segmento de 3248 pb que contiene los polimorfismos GHRf1-GHRd3 informados por Stalling-Mann y col (Proc Nat Acad Sci USA 1996; 93: 12394-12399) para el exón 3 alrededor de la región del gen de GHR

182
185

se realizó para investigar la posible respuesta de hormona del crecimiento dependiente de GHR en pacientes SGA. El ADN se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando una estrategia multiplex descrita por Pantel y col (J. Biol Chem 2000; 25: 18664-18669) con modificaciones.

5 Brevemente, se añadieron 200 ng de ADN genómico a una mezcla de reacción de 50 µl de MgCl₂ 1,5 mM, 0,5 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada cebador, y 0,5 U de ADN polimerasa Phusion High-Fidelity (Finnzymes, Espoo, Finlandia): Los cebadores G1, G2 y G3 se describen en el número de acceso a GenBankTM AF 155912. Las condiciones de ciclación fueron las siguientes.

10 etapa inicial de desnaturalización de 30 segundos a 98°C, seguido por 40 ciclos constituidos por 98°C, 10 segundos; 60°C, 30 segundos; 72°C, 1 minuto y 30 segundos, seguido por una etapa de extensión final de 7 minutos.

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis (90 v, 15 minutos a temperatura ambiente de 25°C) en un gel de agarosa al 1,2% de 48 pocillos prefabricado que contenía bromuro de etidio (gel de agarosa Ready-to-

15 Run, Amersham Biosciences, San Francisco, CA).

Cuando se detectó un genotipo homocigótico GHRd3/GHRd3, se realizó una nueva amplificación por PCR usando sólo G1 y G3 del ADN, en las mismas condiciones, para revelar un producto de 935 pb si se amplifica

20 ligeramente en la reacción de multiplex.

Cebadores (5'-3')	Producto de PCR
G1: TGTGCTGGTCTGTTGGTCTG	f1/f1: 935 pb

183
186

SEC ID Nº 5	
G2: AGTCGTTCTGGGACAGAGA	f1/d3: 935, y 532 pb
SEC ID Nº 6	
G3: CCTGGATTAACACTTTGCAGACTC	d3/d3: 532 pb
SEC ID Nº 7	

Comentarios

Se verificó por secuenciación automática la identidad de los dos productos de PCR seleccionados de ADN homocigótico para cada variante.

La ADN polimerasa Phusion High-Fidelity (Finnzymes, Espoo, Finlandia) usada en este ensayo permite una fuerte amplificación a un tiempo más corto y temperatura de desnaturalización más alta (98°C).

En la primera serie se realizó una segunda electroforesis en PAGE seguida por tinción con plata para visualizar mejor la banda suave de 935 pb en algunas muestras heterocigóticas dudosas. También se verificó que una segunda amplificación por PCR con cebadores G1 y G3 permitió un resultado definido para las muestras dudosas y, por consiguiente, se recomendó realizar esta segunda PCR para establecer el genotipo GHRd3/GHRd3. Esta verificación es mucho mas precisa, rápida y barata.

Ejemplo 2

15 Detección del alelo GHRd3 asociado con respuesta GH

Se examinaron 71 pacientes SGA que se habían incluido en un ensayo para el tratamiento con GH recombinante para la asociación de la variante del

exón 3 de GHR habitual y la respuesta de velocidad de crecimiento frente al tratamiento con GH. Los pacientes incluidos en este estudio se seleccionaron de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión

- 5 1. Niños o niñas con una historia de IGR evaluada como peso corporal y/o estatura al nacimiento <P10 (Delgado y col. Anal Esp Ped. Medicina Fetal y Neonatológica 1996; 44: 50-59).
2. Una edad gestacional de aproximadamente 35 semanas determinada por ecografía o la fecha del último periodo (DLP), y evaluación clínica del recién
10 nacido.
3. Una edad cronológica de más de 3 años.
4. Estatura actual igual o por debajo del percentil 3 o -1,88 SDS (Hernández, Madrid Editorial Garsi, 1988).
5. Velocidad de crecimiento actual igual o por debajo del percentil 50, en
15 relación con la edad cronológica (Hernández, Madrid. Editorial Garsi, 1988).
6. Un cariotipo normal en niñas.
7. Obtención de consentimiento informado por escrito del paciente/representante legal.

Criterios de exclusión

- 20 1. Encefalopatía del neonato después de isquemia
2. Patología endocrina asociada, excepto hipotiroidismo con terapia de sustitución.

- 3. Tratamiento con esteroides crónico.
- 4. Enfermedad crónica grave (patología sanguínea, enfermedad pulmonar, patología de hígado, mala absorción, alteraciones neurológicas, etc.).
- 5. Neoplasmas.
- 5 6. Una historia de radiación intracraneal.
- 7. Síndromes (displasia ósea, síndrome alcohólico fetal, síndromes de Turner, Seckel y otros síndromes dismórficos) excepto Sylver-Russell.
- 8. Alteraciones cromosómicas.
- 9. Pacientes tratados previamente con hormona del crecimiento.
- 10 Usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, los genotipos para el GHRd3 se determinaron para el grupo de 71 pacientes. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y en la Tabla 2.

Tabla 1: Distribución del genotipo GHRd3 en pacientes SGA

	Pacientes SGA N=71
f1/f1	35
d3/f1	27
d3/d3	9

15 **Tabla 2: Distribución de genotipo GHRd3 en pacientes SGA por género**

Genotipo GHR	f1/f1	f1/d3	d3/d3
N	35	27	9

186
189.

Masculino	21	12	5
Femenino	14	15	4

Los pacientes se trataron con rhGH a una dosis de 1,4 (U.kg.semana).

Las velocidades de crecimiento se siguieron durante un periodo de 1 año durante el tratamiento con rhGH (Tabla 3). Los pacientes que llevaban la variante GHRd3 crecieron a una velocidad más lenta cuando se trataron con rGH. La variación genómica de la secuencia GHR está por tanto asociada con una diferencia marcada en el incremento de la velocidad de crecimiento después de tratamiento con rGH.

Tabla 3: Velocidades de crecimiento en los tres grupos genotípicos

	f1/f1	f1/d3	d3/d3
	35	27	9
Velocidad de crecimiento al comienzo (cm/año):	4.49 ± 0.38	4.95 ± 0.35	5.67 ± 0.50
Año 1	10.13 ± 0.38	9.56 ± 0.27	9.12 ± 0.50
Año 1-0 corregido (cm/año):	5.63 ± 0.49	4.61 ± 0.39	3.44 ± 0.85

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para predecir la respuesta de un sujeto frente a un agente capaz de unirse a una proteína GHR, comprendiendo determinar en el sujeto la presencia o ausencia de un alelo GHRd3 y/o un alelo GHRf1 del gen de GHR, donde el alelo GHRd3 está correlacionado con una probabilidad de tener una respuesta positiva disminuida frente a dicho agente y el alelo GHRf1
10 está correlacionado con una probabilidad de tener una respuesta positiva aumentada frente a dicho agente, identificando de este modo el sujeto que tiene una probabilidad disminuida o aumentada de responder frente al tratamiento con dicho agente.
- 15 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho sujeto tiene baja estatura idiopática (ISS), muy bajo peso al nacer (VLBW), retardo del crecimiento intrauterino (IUGR), o es pequeño para la edad gestacional (SGA).
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho
20 sujeto es SGA.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1

a 3, en el que dicho agente es una agonista de GHR.

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho agonista de GHR es GH, preferiblemente somatropina.

5

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente es un antagonista de GHR.

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho
10 antagonista de GHR es pegvisomant.

8. Un procedimiento para tratar un sujeto que padece de una enfermedad o un trastorno que implica GHR, comprendiendo el procedimiento:

(a) determinar en el sujeto la presencia o ausencia de un alelo GHRd3 y/o
15 un alelo GHRf1 del gen de GHR, donde el alelo GHRd3 está correlacionado con la probabilidad de tener una respuesta positiva disminuida frente a un agente capaz de unirse a una proteína GHR o funcionar mediante la vía GHR y el alelo GHRf1 está correlacionado con la probabilidad de tener una respuesta positiva aumentada frente de dicho agente; y

20 (b) seleccionar o determinar una cantidad eficaz de dicho agente para administrar a dicho sujeto.

182

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho sujeto que tiene baja estatura tiene baja estatura idiopática (ISS), muy bajo peso al nacer (VLBW), retardo del crecimiento intrauterino (IUGR), o es pequeño para la edad gestacional (SGA).
- 5
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho sujeto es SGA.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones
- 10 8 a 10, en el que dicho agente es un agonista de GHR.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho agonista de GHR es GH, preferiblemente somatropina.
- 15 13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho agente es un antagonista de GHR.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho antagonista de GHR es pegvisomant.
- 20
15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, que también comprende (c) administrar dicha cantidad eficaz de dicho

~~190~~
193

agente a dicho sujeto.

PROCEDIMIENTOS PARA PREDECIR LA RESPUESTA TERAPÉUTICA
FRENTE A AGENTES QUE FUNCIONAN SOBRE EL RECEPTOR DE LA
HORMONA DEL CRECIMIENTO

5

RESUMEN

Esta invención se refiere a procedimientos para predecir la magnitud de la respuesta terapéutica de un sujeto frente a agentes que funcionan sobre el receptor de la hormona del crecimiento. Los aspectos preferidos incluyen procedimientos para aumentar la estatura de sujetos humanos que tienen baja

10 estatura, y para tratar la obesidad y acromegalia.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Pharmacia & Upjohn
- <120> PROCEDIMIENTOS PARA PREDECIR LA RESPUESTA
TERAPÉUTICA FRENTE A AGENTES QUE FUNCIONAN SOBRE EL
5 RECEPTOR DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO
- <130> respuesta GH
- <150> 60/586, 380
- <151> 08-07-2004
- 10 <160> 7
- <170> PatentIn versión, 3.1
- <210> 1
- <211> 4414
- 15 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- 20 <222> (44)..(1960)
- <223>
- <400> 1

ccgcgcctctc	tgatcagagg	cgaagctcgg	aggctctaca	ggc	atg	gat	ctc	tgg	55
					Met	Asp	Leu	Trp	
					1				
cag ctg ctg ttg acc ttg gca ctg gca gga tca agt gat gct ttt tct	103								
Gln Leu Leu Leu Thr Leu Ala Leu Ala Gly Ser Ser Asp Ala Phe Ser									
5 10 15 20									
gga agt gag gcc aca gca gct atc ctt agc aga gca ccc tgg agt ctg	151								
Gly Ser Glu Ala Thr Ala Ala Ile Leu Ser Arg Ala Pro Trp Ser Leu									
25 30 35									
cna agt gtt aat cca ggc cta aag aca aat tct tct aag gag cct aca	199								
Gln Ser Val Asn Pro Gly Leu Lys Thr Asn Ser Ser Lys Glu Pro Lys									
40 45 50									
ttc acc aag tgc cgt tca cct gag cga gag act ttt tca tgc cac tgg	247								
Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe Ser Cys His Trp									
55 60 65									
aca gat gag gtt cat cat ggt aca aag aac cta gga ccc ata cag ctg	295								
Thr Asp Glu Val His His Gly Thr Lys Asn Leu Gly Pro Ile Gln Leu									
70 75 80									
ttc tat acc aga agg aac act caa gaa tgg act caa gaa tgg aca gaa	343								
Phe Tyr Thr Arg Arg Asn Thr Gln Glu Trp Thr Gln Glu Trp Lys Glu									
85 90 95 100									

193
197

tgc cct gat tat gtt tct gct ggg gaa aac agc tgt tac ttt aat toa	391
Cys Pro Asp Tyr Val Ser Ala Gly Glu Asn Ser Cys Tyr Phe Asn Ser	
105 110 115	
tcg ttt acc tcc atc tgg ata cct tat tgt atc aag cta act agc aat	439
Ser Phe Thr Ser Ile Trp Ile Pro Tyr Cys Ile Lys Leu Thr Ser Asn	
120 125 130	
ggc ggt aca gtg gat gaa aag tgt ttc tct gtt gat gaa ata gtg caa	487
Gly Gly Thr Val Asp Glu Lys Cys Phe Ser Val Asp Glu Ile Val Gln	
135 140 145	
cca gat cca ccc att gcc ctc aac tgg act tta ctg aac gtc agt tta	535
Pro Asp Pro Pro Ile Ala Leu Asn Trp Thr Leu Leu Asn Val Ser Leu	
150 155 160	
act ggg att cat gca gat atc caa gtg aga tgg gaa gca cca cgc aat	583
Thr Gly Ile His Ala Asp Ile Gln Val Arg Trp Glu Ala Pro Arg Asn	
165 170 175 180	
gca gat att cag aca gga tgg atg gtt ctg gag tat gaa ctt caa tac	631
Ala Asp Ile Gln Lys Gly Trp Met Val Leu Glu Tyr Glu Leu Gln Tyr	
185 190 195	
aaa gaa gta aat gaa act aaa tgg aaa atg atg gac cct ata ttg aca	679
Lys Glu Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met Met Asp Pro Ile Leu Thr	
200 205 210	
aca tca gtt cca gtg tac tca ttg aaa gtg gat aag gaa tat gaa gtg	727
Thr Ser Val Pro Val Tyr Ser Leu Lys Val Asp Lys Glu Tyr Glu Val	
215 220 225	
cgt gtg aga tcc aaa caa cga aac tct gga aat tat ggc gag ttc agt	775
Arg Val Arg Ser Lys Gln Arg Asn Ser Gly Asn Tyr Gly Glu Phe Ser	
230 235 240	
gag gtg ctc tat gta aca ctt cct cag atg agc caa ttt aca tgt gaa	823
Glu Val Leu Tyr Val Thr Leu Pro Gln Met Ser Gln Phe Thr Cys Glu	
245 250 255 260	
gaa gat ttc tac ttt cca tgg ctc tta att att atc ttt gga ata ttt	871
Glu Asp Phe Tyr Phe Pro Trp Leu Leu Ile Ile Ile Phe Gly Ile Phe	
265 270 275	
ggg cta aca gtg atg cta ttt gta ttc tta ttt tct aaa cag caa agg	919
Gly Leu Thr Val Met Leu Phe Val Phe Leu Phe Ser Lys Gln Gln Arg	
280 285 290	
att aaa atg ctg att ctg ccc cca gtt cca gtt cca aag att aaa gga	967
Ile Lys Met Leu Ile Leu Pro Pro Val Pro Val Pro Lys Ile Lys Gly	
295 300 305	
atc gat cca gat ctc ctc aag gaa gga aaa tta gag gag gtg aac aca	1015
Ile Asp Pro Asp Leu Leu Lys Glu Gly Lys Leu Glu Glu Val Asn Thr	

310	315	320	
atc tta gcc att cat gat agc tat aa ₃₂₅ ccc gaa ttc cac agt gat gac Ile Leu Ala Ile His Asp Ser Tyr Lys Pro Glu Phe His Ser Asp Asp 330 335 340			1063
tct tgg gtt gaa ttt att gag cta gat att gat gag cca gat gaa aag Ser Trp Val Glu Phe Ile Glu Leu Asp Ile Asp Glu Pro Asp Glu Lys 345 350 355			1111
act gag gaa tca gac aca gac aga ctt cta agc agt gac cat gag aa ₃₆₀ Thr Glu Glu Ser Asp Thr Asp Arg Leu Leu Ser Ser Asp His Glu Lys 365 370			1159
tca cat agt aac cta ggg gtg aag gat ggc gac tct gga cgt acc agc Ser His Ser Asn Leu Gly Val Lys Asp Gly Asp Ser Gly Arg Thr Ser 375 380 385			1207
tgt tgt gaa cct gac att ctg gag act gat ttc aat gcc aat gac ata Cys Cys Glu Pro Asp Ile Leu Glu Thr Asp Phe Asn Ala Asn Asp Ile 390 395 400			1255
cat gag ggt acc tca gag gtt gct cag cca cag agg tta aa ₄₀₅ ggg gaa His Glu Gly Thr Ser Glu Val Ala Gln Pro Gln Arg Leu Lys Gly Glu 410 415 420			1303
gca gat ctc tta tgc ctt gac cag aag aat caa aat aac tca cct tat Ala Asp Leu Leu Cys Leu Asp Gln Lys Asn Gln Asn Asn Ser Pro Tyr 425 430 435			1351
cat gat gct tgc cct gct act cag cag coc agt gtt atc caa gca gag His Asp Ala Cys Pro Ala Thr Gln Gln Pro Ser Val Ile Gln Ala Glu 440 445 450			1399
aaa aac aa ₄₅₅ cca caa cca ctt cct act gaa gga gct gag tca act cac Lys Asn Lys Pro Gln Pro Leu Pro Thr Glu Gly Ala Glu Ser Thr His 460 465			1447
caa gct gcc cat att cag cta agc aat cca agt tca ctg tca aac atc Gln Ala Ala His Ile Gln Leu Ser Asn Pro Ser Ser Leu Ser Asn Ile 470 475 480			1495
gac ttt tat gcc cag gtg agc gac att aca cca gca ggt agt gtg gtc Asp Phe Tyr Ala Gln Val Ser Asp Ile Thr Pro Ala Gly Ser Val Val 485 490 495 500			1543
ctt tcc ccg ggc caa aag aat aag gca ggg atg tcc caa tgt gac atg Leu Ser Pro Gly Gln Lys Asn Lys Ala Gly Met Ser Gln Cys Asp Met 505 510 515			1591
cac ccg gaa atg gtc tca ctc tgc caa gaa aac ttc ctt atg gac aat His Pro Glu Met Val Ser Leu Cys Gln Glu Asn Phe Leu Met Asp Asn 520 525 530			1639
gcc tac ttc tgt gag gca gat gcc aa ₅₃₅ aag tgc atc cct gtg gct cct			1687

Ala Tyr Phe Cys Glu Ala Asp Ala Lys Lys Cys Ile Pro Val Ala Pro	
535 540 545	
cac atc aag gtt gaa tca cac ata cag cca agc tta aac caa gag gac	1735
His Ile Lys Val Glu Ser His Ile Gln Pro Ser Leu Asn Gln Glu Asp	
550 555 560	
att tac atc acc aca gaa agc ctt acc act gct gct ggg agg cct ggg	1783
Ile Tyr Ile Thr Thr Glu Ser Leu Thr Thr Ala Ala Gly Arg Pro Gly	
565 570 575 580	
aca gga gaa cat gtt cca ggt tct gag atg cct gtc cca gac tat acc	1831
Thr Gly Glu His Val Pro Gly Ser Glu Met Pro Val Pro Asp Tyr Thr	
585 590 595	
tcc att cat ata gta cag tcc cca cag ggc ctc ata ctc aat ggc act	1879
Ser Ile His Ile Val Gln Ser Pro Gln Gly Leu Ile Leu Asn Ala Thr	
600 605 610	
gcc ttg ccc ttg cct gac aaa gag ttt ctc tca tca tgt ggc tat gtg	1927
Ala Leu Pro Leu Pro Asp Lys Glu Phe Leu Ser Ser Cys Gly Tyr Val	
615 620 625	
agc aca gac caa ctg aac aaa atc atg cct tag cctttctttg gtttcccaag	1980
Ser Thr Asp Gln Leu Asn Lys Ile Met Pro	
630 635	
agctacgtat ttaatagcaa agaattgact ggggcaataa cgtttaagcc aaacaatgt	2040
ttaaacccttt ttggggggag tgacaggatg gggatatgat tctaaatgc cttttcccaa	2100
aatgttgaaa tatgatgtta aaaaaataag aagaatgctt aatcagatag atattcctat	2160
tgtgcaatgt aaatatatta aagaattgtg tcagactgtt tagtagcagt gattgtctta	2220
atattgtggg tgtaatttt tgatactaag cattgaatgg ctatgttttt aatgtatagt	2280
aatcacgct tttgaaaaa gcgaaaaaat caggtggctt ttgcggttca ggaaaattga	2340
atgcaaacca tagcacaggc taattttttg ttgtttctta aataagaaac ttttttattt	2400
aaaaaactaa aaactagagg tgagaaattt aaactataag caagaaggca aaantagttt	2460
ggatatgtaa aacattttact ttgacataaa gttgataaag attttttaant aatttagact	2520
tcaagcatgg ctattttata ttacactaca cactgtgtac tgcagttggt atgacccctc	2580
taaggagtgt agcaactaca gtctaaagct ggtttaatgt tttggccaat gcacctaaag	2640
aaaaacaaac tcgtttttta caaagccctt ttatacctcc ccagactcct tcaacaattc	2700
taaaatgatt gtagtaatct gcattattgg aatataattg ttttatctga atttttaaac	2760
aagtatttgt taatttagaa aactttaaag cgtttgcaca gatcaactta ccaggcacca	2820

aaagaagtaa aagcaaaaaa gaaaaccttt cttcaccaaa tcttgggtga tgccaaaaa 2880
 aaatacatgc taagagaagt agaatcata gctgggtcac actgaccaag atacttaagt 2940
 gctgcaattg cagcgggagt gagtttttta gtgcgtgcag atggtgagag ataagatcta 3000
 tagcctctgc agcgggaatct gttcacaccc aacttgggtt tgctacataa ttatccagga 3060
 agggcaataag gtacaagaag cattttgtta gttgaagcaa atcgaaatgaa attaactggg 3120
 taatgaaca aagagttcaa gaataagtt tttgtttcac agcctataac cagacacata 3180
 ctcatTTTTc atgataatga acagaacata gacagaagaa acaaggTTTT cagtccccac 3240
 agataactga aaattattta aaccgctaaa agaaactttc tttctcacta aatcttttat 3300
 aggatttatt taanaatgca aaagaagaag tttcatcatt tttacttcc tctctgagtg 3360
 gactggcctc aaagcaagca ttcagaagaa aaagaagcaa cctcagtaat ttagaantca 3420
 ttttgcatac ccttaatatc cttaacatca ttcatttttg ttgttgttgt tgttgttgag 3480
 acagagtctc gctctgtgc caggctagag tgcggtggcg cgtctctgac tcaactgcaat 3540
 ctccacctcc cacaggttca ggcgattccc gtgcctcagc ctctgagta gctgggacta 3600
 caggcacgca ccaccatgcc aggctaattt ttttgtattt tagcagagac ggggtttcac 3660
 catgttggcc aggatggctc cgaagtctct gacctcgtga tccacccgac tgggcctccc 3720
 aaagtgcctg gattacaggt gtaagccacc gtgccagcc cttaacatca ttcttgagag 3780
 cattgggata tctcctgaaa aggtttatga aaaagaagaa tctcatctca gtgaagaata 3840
 cttctcattt tttaaaaag cttaaaactt tgaagttagc ttaacttaa atagtatttc 3900
 ccatttatcg cagacctttt ttaggaagca agcttaatgg ctgataattt taaattctct 3960
 ctcttgagg agggactatg aaaagctaga attgagtgtt taaagtcca catgttattt 4020
 gtaantagatg tttgatagat tttctgtac tttgctgcta tggttttctc caagagctac 4080
 ataatttagt ttcatataaa gtatcatcag tgtagaacct aattcaattc aaagctgtgt 4140
 gtttgaaga ctatcttact atttcacaac agcctgacaa catttctata gccaaaaata 4200
 gctaaatacc tcaatcagtc tcagaatgtc attttggtao tttggtggcc acataagcca 4260
 ttattcacta gtatgactag ttgtgtctgg cagtttatat ttaactctct ttatgtctgt 4320
 ggattttttc cttcaaagt taataaattt attttcttgg attcctgata atgtgttct 4380
 gttatcaaac accaacataa aatgatcta aacc 4414

197
2d

<211> 638

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 2.

198
202

Met Asp Leu Trp Gln Leu Leu Leu Thr Leu Ala Leu Ala Gly Ser Ser
1 5 10 15

Asp Ala Phe Ser Gly Ser Glu Ala Thr Ala Ala Ile Leu Ser Arg Ala
20 25 30

Pro Trp Ser Leu Gln Ser Val Asn Pro Gly Leu Lys Thr Asn Ser Ser
35 40 45

Lys Glu Pro Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe
50 55 60

Ser Cys His Trp Thr Asp Glu Val His His Gly Thr Lys Asn Leu Gly
65 70 75 80

Pro Ile Gln Leu Phe Tyr Thr Arg Arg Asn Thr Gln Glu Trp Thr Gln
85 90 95

Glu Trp Lys Glu Cys Pro Asp Tyr Val Ser Ala Gly Glu Asn Ser Cys
100 105 110

Tyr Phe Asn Ser Ser Phe Thr Ser Ile Trp Ile Pro Tyr Cys Ile Lys
115 120 125

Leu Thr Ser Asn Gly Gly Thr Val Asp Glu Lys Cys Phe Ser Val Asp
130 135 140

Glu Ile Val Gln Pro Asp Pro Pro Ile Ala Leu Asn Trp Thr Leu Leu
145 150 155 160

Asn Val Ser Leu Thr Gly Ile His Ala Asp Ile Gln Val Arg Trp Glu
165 170 175

Ala Pro Arg Asn Ala Asp Ile Gln Lys Gly Trp Met Val Leu Glu Tyr
180 185 190

Glu Leu Gln Tyr Lys Glu Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met Met Asp
195 200 205

Pro Ile Leu Thr Thr Ser Val Pro Val Tyr Ser Leu Lys Val Asp Lys
210 215 220

Glu Tyr Glu Val Arg Val Arg Ser Lys Gln Arg Asn Ser Gly Asn Tyr
225 230 235 240

Gly Glu Phe Ser Glu Val Leu Tyr Val Thr Leu Pro Gln Met Ser Gln
245 250 255

Phe Thr Cys Glu Glu Asp Phe Tyr Phe Pro Trp Leu Leu Ile Ile Ile
260 265 270

Phe Gly Ile Phe Gly Leu Thr Val Met Leu Phe Val Phe Leu Phe Ser
275 280 285

Lys Gln Gln Arg Ile Lys Met Leu Ile Leu Pro Pro Val Pro Val Pro
290 295 300

Lys Ile Lys Gly Ile Asp Pro Asp Leu Leu Lys Glu Gly Lys Leu Glu
305 310 315 320

Glu Val Asn Thr Ile Leu Ala Ile His Asp Ser Tyr Lys Pro Glu Phe
325 330 335

His Ser Asp Asp Ser Trp Val Glu Phe Ile Glu Leu Asp Ile Asp Glu
340 345 350

Pro Asp Glu Lys Thr Glu Glu Ser Asp Thr Asp Arg Leu Leu Ser Ser
355 360 365

Asp His Glu Lys Ser His Ser Asn Leu Gly Val Lys Asp Gly Asp Ser
370 375 380

Gly Arg Thr Ser Cys Cys Glu Pro Asp Ile Leu Glu Thr Asp Phe Asn
385 390 395 400

Ala Asn Asp Ile His Glu Gly Thr Ser Glu Val Ala Gln Pro Gln Arg
405 410 415

200
204

Leu Lys Gly Glu Ala Asp Leu Leu Cys Leu Asp Gln Lys Asn Gln Asn
420 425 430

Asn Ser Pro Tyr His Asp Ala Cys Pro Ala Thr Gln Gln Pro Ser Val
435 440 445

Ile Gln Ala Glu Lys Asn Lys Pro Gln Pro Leu Pro Thr Glu Gly Ala
450 455 460

Glu Ser Thr His Gln Ala Ala His Ile Gln Leu Ser Asn Pro Ser Ser
465 470 475 480

Leu Ser Asn Ile Asp Phe Tyr Ala Gln Val Ser Asp Ile Thr Pro Ala
485 490 495

Gly Ser Val Val Leu Ser Pro Gly Gln Lys Asn Lys Ala Gly Met Ser
500 505 510

Gln Cys Asp Met His Pro Glu Met Val Ser Leu Cys Gln Glu Asn Phe
515 520 525

Leu Met Asp Asn Ala Tyr Phe Cys Glu Ala Asp Ala Lys Lys Cys Ile
530 535 540

Pro Val Ala Pro His Ile Lys Val Glu Ser His Ile Gln Pro Ser Leu
545 550 555 560

Asn Gln Glu Asp Ile Tyr Ile Thr Thr Glu Ser Leu Thr Thr Ala Ala
565 570 575

Gly Arg Pro Gly Thr Gly Glu His Val Pro Gly Ser Glu Met Pro Val
580 585 590

Pro Asp Tyr Thr Ser Ile His Ile Val Gln Ser Pro Gln Gly Leu Ile
595 600 605

Leu Asn Ala Thr Ala Leu Pro Leu Pro Asp Lys Glu Phe Leu Ser Ser
610 615 620

Cys Gly Tyr Val Ser Thr Asp Gln Leu Asn Lys Ile Met Pro
625 630 635

201
205

<210> 3
<211> 6823
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> n = a g t ó c

10

<220>
<221> misc_feature
<222> (1064)..(1064)
<223> n = a g t ó c

15

<220>
<221> misc_feature
<222> (1447)..(1447)
<223> n = a g t ó c

20

<220>
<221> misc_feature

202
2016

<222> (1450)..(1450)

<223> n = a g t ó c

<400> 3

aacttanagt atcaaagcag caagtagatt tgaaggaatt gttacaatgc aattttgctt	60
tcccgcact ttaaatcaa ggtgtagtac tttatttact ttaggaaat gtttgctttt	120
tgtcataatt ccttattgca tatgagagta aatgatctat agatgaagat aataataaaa	180
tttagagaga gaataaaaaa gaaacacttt cacagctgaa aggctgcttc ccagttagct	240
aactgggagg agttactgaa aaagtacatt gaaaagcggc tcaggggcag gtgaattgga	300
ctcaccaggc tctgacattc agagagatgg gaatgagtca gctcactgtc cagcacatct	360
ttattttatt tctctttctt gttttatctc agaatagat ttcttggcat tgttactgtg	420
ggtttctatt aaggactgaa caaaagtatt aataatctga gagtatgtaa aaaaaattc	480
attttctcct actatactct cataacacag aatatttttg tgaccagaga tcaccaaant	540
gtgtgtggtg tcaacgaaaa gagtcaaact ctctaaata tttgaagaga ttttttctga	600
gccaaatgtg agtgaacatg gcctgtgaca tagccctcag gaggtcctga gaacatgtgc	660
ccaaggtggt cagggtagag cttgggtttt atatatttta gggaggcata agacatcaat	720

caaatacatt taagaataac gttgatttgg ttcagaaagg caggacaact caaatgggga	780
gcttccaggg tataggtaaa tttasacatt ttctgggtga caattagttg agtttgtctg	840
aagacctggg attaatggaa aggactattc aggttaagat atgtttctta ttggacctaa	900
aactgtgcct ggctcttagt tgattactgc ctggatctgg gaaggaagga aggaatacaa	960
agggggaagg ggattctcta tagaatgtgg atttttccca taagagactt tgtagggcaa	1020
tttcaaggca tggcaaggaa atatactttg gggctaatat tttncccttg ctcataatgt	1080
tatgccagag tcatattgaa aagcaagtca caatatacaa ggtcaataaa aaccatctga	1140
tgagaacca tggtttgtag ggcctgactc cccagaacct ttaggttaga atttgggcaa	1200
gataaaaaat cggaaacttag tctcggcggg gaatctctcc ccacacaaat tctccaacag	1260
attcttcagt gggacacca ctgggtggtt ctcaaatcca attcaattct gaccaatcta	1320
cctatctacc tggaaatagc atcagataac cacagggtta cggctcattc caacantact	1380
gtccccact tcagatgcca actgcaagta ataggttggt acctatactt ctagccagtc	1440
agctgtnaan tgggtgtccc acaacctccc cctccgggtt gataatttga gacagcttgc	1500
ttacatgtac cagcttatta gaaaggatat tacaaaggac acagatgaag agatggatag	1560
ggttaaggat gtgggttggg gttgcagagt ttccatgacc tctctgagtg cagcatcttc	1620
atgtgttcag ctatccagaa tctctcggt taagacattg gccactggtg atcaaatcaa	1680
ccttgagtc ctctccctt cctgaggttg gagagtgggg ctgaagtgtc tcaacctcta	1740
atcaactctt ggtctttcct gtgacctgc cccatcctga ggtctccag gagccccag	1800
gcatcagtc actcattagc atcgaaga cacttatcac tacagagatt cgaaggattt	1860
taggaactgt gtcaagaaac ggagacaagg tcaaatatgt atttcacaa atcaccagta	1920
gtttcactgg gaggtaaaac tcagtgttta ctgtgggcct gagccatgct gaacctctaa	1980
gaataactta gaggtaacgt gatcagatgt ggggaattct ggagaacac ctttcaccac	2040
caagcccaga caagagatgc atacttttct agctgggatg cttacaaagc aacctactct	2100
aatacttcaa ggtagagtga cactacattc atcatttttc attttttccct gtttttatg	2160
ccatctacta ctactgtcaa tcaaatcag actgtgttta tagtggatga attatggacc	2220
atttcacacc ataaagtctt gtttctctca tgttgagctt ttcacctccc ttcattccct	2280
ccctacttec aggatcattc acatgtttat ttctaaaaat aaactttttt tactgaactt	2340

204
208

tttttcatac tgtttaaaaa gaattttatat ttctcttcat tcttacagat aagattcaag 2400
tttaaaactca aataatgtag gaaatctttt tttaaaaaat tgttccctac tgtgtctagg 2460
cgtgagaccc aaaagtaatt aagaccaggt tttcatttgc tgtgatttgt gtgagttctt 2520
tttagagggtt aggtgcaatt ttaattttta aaagggggat tattatgaga ggagaaatca 2580
tactttatca tttagaaatg atgccataac aggtgttagc agaaaaatca aactgtaaaa 2640
tattttaaag agatttattc tgagccaata taagtgactg tggccccatt gaaatgagcg 2700
agttccctga tccctctcac agagcttgcg acagggatgt ggctcacctg ttcagttgcc 2760
ccaccgctca aacccttagg gggagaatac agacggtcag gtgcaaaaggc tggggcaagt 2820
gccttggccc cttggccct tagccccgag gtagtgtcta ggggtgggtt gcctgcaacc 2880
ccagtgttac aaagtctttt cagctttgca gtccacggac agcttgagtg ttaatcagct 2940
caatggaccc tctgccttat agcaaaggca gaggggcagt gtgacagctt tctgtatccc 3000
aagctcttgc ccagtgtcct agaaaaaaca gatcatacag gggctcgaag gatgagtgc 3060
aggttttatt gagttagtga ggtggctctc agcaagatgg atggggagtg ggaagtgggg 3120
atggagtggg aaggtgaact tctctgaag tggggcagcc cagtggctgg actcttctcc 3180
aacctcccc aggcaagctc ctctcagcgt ccagatgttc ctcttccctc tctctctctg 3240
ccgcattcatt tcaccatctg tctgtgtgtc agctggcttg ctggtgtgtt ggtctgttgg 3300
tctgtgtgtc tgcctctgga acctcaggtt cagagtttat atgagtgcac gataggggggt 3360
gttttgggccc aaaaggtagc tttttggaca tgaaaacgga aatgcctgtt cccatttagg 3420
gctgcaggtc ttcaggcttg aggtggggc ctttgcccag gaactaccct cttctaccca 3480
gtgtttccct gtctctgtc catatcacca gtattcacag tctcaaggag tcttgagaaa 3540
gtgtgcccac ggcctcaga ttcagtttgg ttctgtatgt ttcaggaggg caggaaattac 3600
aggcaaagac ataaatcagt acatggaagg tatacattgg ttcactctga aaaggcagga 3660
tgtcttgaag tggggacttg caggtcatag tttggttcag agattcttta atctgcagtt 3720
ggttaaagga acaaaactgt acagaagctt cgagtttagc aaaagaata tttaattaa 3780
gataaggatg ctatgtcaga gtcagccaca aaatgacctg tttagcaaga ttaattggcct 3840
ataggtgtga cttaaccctt gccttgcagt gcctaaggte ttgtttataa tttagtatct 3900
tattgcccaa agagtctatt tagtcagtct tatgatctct actttaacat taatgctgg 3960
cacttgtgcc taaactccaa aggggaggta tatccaaect gccttcccat tgtggccagg 4020

aaccctttctc	tggagtcoc	ttggccaaga	aggggtccat	tgggttggtt	tgggaagctg	4080
aggattttgt	ttttagttta	cacagggta	tatcagattg	ttttgatggg	gatgactaat	4140
ggtttttctc	tctttctgtt	tcagccacag	cagctatcct	tagcagagca	ccctggagtc	4200
tgcaagtggt	taatccaggc	ctaaagacaa	gtaagaattt	cagtcctttt	tcttcttcca	4260
atgatatttt	ccatgtttta	gtgtaattaa	gctactatcc	tttctctatt	ttattttggg	4320
tggtagtaac	tggaaatag	actgagttga	aattttatag	gcaagcaaaa	cattttttta	4380
ggattttatt	tttaacttct	gatatagttt	ggatgtttgt	cccttccaaa	tctcatgtaa	4440
tccccaatgt	tggaaagtga	gactgggagg	agatgttttg	gtcatgtggg	cagattcttc	4500
atgaatgggt	tagcaccttc	ctctttgtgc	tgtcttcacc	atgagtgagt	tctcatgaga	4560
tctggttggt	taaaagtgtg	tggcacctcc	cccttcaatc	tcttgctccc	actctcgccc	4620
tgtgagacac	ctgctccgct	tcaccatgat	tataggcttc	ctgaggcttt	caccagaagc	4680
agatgctaat	acagcctgca	gaactgtgag	ccatttaaat	cattttttct	tataaatcac	4740
ccagcctcag	gtactttttt	atagcaatga	aagcaacta	atacaacttc	tgtgcaaggc	4800
tgcctttttt	tctatttttt	gcttgtgctt	gaaggttaag	taaggccaaa	ttaatgaagg	4860
aggaaaaaag	aggaaatgat	acatcatgga	tcaacaatta	tttattgaat	ttaggaact	4920
gcctcttttt	atasattctt	tttaaaatta	ttttcattat	tatcttgaag	tatttatcta	4980
aggtttacac	tggtagaaag	ttaaacttgt	ctctccaacc	aaattgcctt	aagcttcaaa	5040
attatgcctt	attgtaagct	ctttcttaac	cttaaaatga	ctttacacat	tccccgctgg	5100
tcctttgaca	atctctctct	caaccacaag	acagaacccc	accatcaact	ctgtggggaa	5160
gcgtctccaa	attctctagt	cctgaacaac	atgctgcctt	ctctgcttcc	atggaacttt	5220
gtcctttaca	acatgatagc	gtttgcctcc	tgacatttta	gtgtgtgtgt	tagccctgca	5280
tatagaactc	accagattgt	gtggtctgca	tgaatgaatt	aattctattg	aactttaagg	5340
caaagcctaa	actttatgct	tcttctaaat	cccttcacac	tcctaaaaaa	attctgatcc	5400
atagtagtag	gtacttggtt	aattaaattt	tagggatgga	tatttttcat	cagtgggaagt	5460
atatgctaga	gtccatatta	tgcaataagg	gaaggggaaga	cagtgtacct	aaatcagtta	5520
agatattgct	attcttggtg	ttattctaaa	tcagttaaga	tattgctatt	cttggtgtta	5580
ttctagagtc	acgaatcat	aatttgaatt	ttatgactaa	attgcagaat	taatttccaa	5640

206
2.10

tgtgagattt taacattatt tccttggagg tgaccaaaaa ggagagctgg tactgttttt 5700
aacaactgtc attcaattgt cagttgtgcc agaccacaaa tcctttatag ccctcctgtt 5760
taagaagcat ctgacatgtt aagctgctcc ctaattaaca cagaggttgt aaaagaagtg 5820
gctgtttggt tctgtttggg tttcccagcc agtatattcc aaagcctttt ttcactcacc 5880
agatgagtta tgtgctttat attctgtaag gaaatgagaa gtaatcagtt gaaaatgtgt 5940
tactaatggt acatgcttca cattgaacc atcctcctga cacaaacata atactttgcc 6000
cttcactgtc ccccaaagtg gcagtaggat ttctctaagt aattttcttt acttatatga 6060
gtgcaggata gggggtgttt tgggccaaaa ggtagctttt tggacatgaa aacggaaatg 6120
cctgttccca tttagggctg caggtcttca ggcttgaggg tggggccttt gcccaggaac 6180
tacctcttc taccagtggt ttcctgtct cctgtccata tcaccagtat tcacagtctc 6240
aaggagtctt gagaagtgt gcccaaggcc gtcagattca gtttggttct gtatgtcaca 6300
gggtctaaga agcgtaaaca ttgtgccttg ttgaaataca gcctctaggt atggaggatg 6360
tgttgaacaa ctctctacca gtcatattggc atatgttgat ttctgtctt catgatacgt 6420
aagacgacta gctaattatc attcatatgt ggttaagtcac atagatactg acttccctta 6480
tctttccage tttttcttat caaaagtcac ctgtctctg toccaggaac gactggctaa 6540
agtaacctat atcagtgtct gtaacagtgg gcacctatca tagtgcacat gcttgaacat 6600
atcattgcct tttatcatca cgagcctcac atccagatgt gacagactca agtgetcaca 6660
tcacctcact ctgtcactgt atacattgtt accgtgtcac aaatatttaa cagtctgctg 6720
tgtactcagt ctttagctgt gtgccctgag ggagacagag taagatactg ccttgacatc 6780
aaggagctcc atagtgcaca tgcttgaaca tatcattgcc ttt 6823

- <210> 4
- <211> 1474
- <212> ADN
- 5 <213> Homo sapiens

<400> 4

207
241

aattctttttt taaaaaattg ttccctactg tgtctaggcg tgagacccaa aagtaattaa	60
gaccagggttt tcatttgctg tgatttgtgt gagttctttt tagagggttag gtgcaatttt	120
aattttttaa agggggatta ttatgagagg agaaatcata ctttatcatt tgaanaatgat	180
gccataacag gtgttagcag aaaaatcaaa ctgtaanaa ttttaagag atttattctg	240
agccaatata agtgactgtg gcccattga aatgagcgag ttccctgatc cctctcacag	300
agcttgcgac agggatgtgg ctacactgtt cagttgcccc accgctcaaa cccctagggg	360
gagaatacag acggtcaggt gcaaggctg gggcaagtgc cttggccctt tggccctta	420
gccccagagt agtgtctagg ggtgggtgc ctgcaacccc agtggtacaa agttctttca	480
gctttgcagt ccacggacag cttgagtgtt aatcagctca atggaccctc tgccttatag	540
caaaggcaga gggccagtgt gacagctttc tgtatcccaa gctcttgccc agtgtcctag	600
aaaaaacaga tcatacaggg gctcgaagg tgagtgaag gttttattga gtagtggagg	660
tggctctcag caagatggat ggggagtggg aagtggggat ggagtggaa ggtgaacttc	720
ctctgaagtc gggcagccca gtggctggac tcttctccaa cctccccag gcaagctcct	780
ctcagcgtcc agatgttctt ctccctctc tctctctgcc gcacatttc accatctgtc	840
tgctggtcag ctggcttgct ggtgtgctgg tctgttggtc tgctggctctg cttctggaac	900
ctcaggttca gatttatat gagtgcagga taggggtgt tttgggcaa aaggtagctt	960
tttggacatg aaaacggaaa tgctgttcc catttagggc tgcaggtctt caggcttgag	1020
ggtggggcct ttgccagga actacctct tctaccagt gtttccctgt ctctgtcca	1080
tatcaccagt attcacagtc tcaaggagtc ttgagaaagt gtgccaagg ccgtcagatt	1140
cagtttggtt ctgtatgtca cagggctcaa gaagcgtaa cattgtgcct tgttgaata	1200
cagcctctag gtatggagga tgtgttgaac aacttctac cagtcatttg gcatatgttg	1260
atttctgtc ttcatgatac gtaagacgac tagctaatta tcattcatat gtggtaagtc	1320
acatagatac tgacttcccc tatctttcca gctttttctt atcaaaagtc acctgtctc	1380
tgtcccagga acgactggct aaagtaacct atatcagtgt ctgtaacagt gggcacctat	1440
catagtgcac atgcttgaa atatacttgc cttt	1474

<210> 5

<211> 20

208
212

	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 5	
5	tgtgctggtc tgttggctctg	20
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 6	
	agtcgttcct gggacagaga	20
	<210> 7	
15	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 7	
20	cctggattaa cactttgcag actc	24

270
209
213

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DEL REPORTE DE EXAMEN
PRELIMINAR INTERNACIONAL DE PATENTABILIDAD
(PCT Regla 71.1)
De: AUTORIDAD DE REVISION PRELIMINAR INTERNACIONAL

Para:
FULLER, Grover, F., Jr.
Pfizer Inc.
201 Tabor Road
Morris Plains, NJ 07950
Estados Unidos de America

Sello de Recibido 12 de Junio de 2005, Departamento de patentes
Pfizer

Fecha de expedición: 08.06.2006
Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC32455
Solicitud Internacional No.: PCT/IB2005/002086
Fecha de presentación internacional: 27.06.2005
Fecha de prioridad: 08.07.2004
Solicitante: PHARMACIA & UPJOHN COMPANY LLC et al.

1. Se notifica al solicitante que la Administración Encargada del Examen Preliminar Internacional ha emitido el informe de examen preliminar internacional para la solicitud internacional y se lo transmite adjunto, acompañado, si procede, de sus anexos.
2. Se transmite una copia del presente informe y, si procede, de sus anexos, a la Oficina Internacional para comunicación a todas las Oficinas elegidas.
3. Si alguna Oficina elegida lo exige, la Oficina Internacional realizará una traducción en inglés del informe (con exclusión de sus anexos) y la transmitirá a las Oficinas interesadas.

4. RECORDATORIO

Para iniciar la fase nacional ante cada Oficina elegida, el solicitante debe cumplir ciertos actos (presentación de la traducción y pago de las tasas nacionales) en el plazo de 30 meses desde la fecha de prioridad (o más tarde por lo que respecta a ciertas oficinas) (Artículo 39 (1)) (véase también el recordatorio enviado por la Oficina Internacional en el formulario PCT/IB/301).

Cuando deba entregarse una traducción de la solicitud internacional o una oficina elegida, se incluirá la traducción de cualquier anexo de

informe de Examen Preliminar Internacional. Corresponde al solicitante preparar la traducción en cuestión y entregarla directamente a cada Oficina elegida interesada

210
214

Para más amplios detalles en lo relativo a los plazos aplicables y las exigencias de las oficinas elegidas, véase el Volumen II de la guía del solicitante PCT.

Se llama la atención del solicitante sobre el Artículo 33(5) que prevé que los criterios de novedad, actividad inventiva y de aplicación industrial definidos en el Artículo 33(2) a (4) sólo servirán a los efectos del examen preliminar internacional, y que "todo Estado contratante puede aplicar criterios adicionales o diferentes al objeto de decidir, en ese Estado, si la invención es patentable o no" (véase también el Artículo 27(5)). Tales criterios adicionales pueden afectar, por ejemplo, a las excepciones de patentabilidad, requisitos específicos relativos a la divulgación, la claridad de las reivindicaciones.

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:

Oficina de Patentes Europea
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - o Tx:523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Funcionario Autorizado: Moreno, R
Tel: +49 89 2399-2658

271
215

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación en materia de Patentes)
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC32455
Solicitud Internacional No.: PCT/IB2005/002086
Fecha de presentación internacional: 27.06.2005
Fecha de prioridad: 08.07.2004
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la vez clasificación nacional e IPC: INV. C12Q1/68 GO1N33/74
Solicitante: PHARMACIA UPJOHN COMPANY LLC et al.

1. El reporte de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Revisión Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y es transmitido al solicitante según el Artículo 36.
2. Este REPORTE consta de un total de 7 hojas, incluida la presente hoja de portada.
3. Este informe también contiene ANEXOS, que comprenden.
 - a. ☐ (remitido al solicitante y a la oficina internacional) un total de 7 hojas, descritas a continuación:
 - ☐ hojas de la descripción, las reivindicaciones y/o los dibujos que han sido modificadas y que sirven de base al presente informe, y/o de hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Administración (véase la Regla 70.16 y la Instrucción Administrativa 607 del PCT).
 - ☐ hojas que reemplazan a otras hojas anteriores, pero que esta Administración considera que contienen modificaciones que se extienden más allá de la divulgación de la invención tal como fue originalmente presentada, según se indica en el punto 4 del Reglamento I y en el Recuadro Suplementario.
 - b. ☐ (remitido únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y soporte(s) electrónico(s)) , que contienen una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s), solo en formato legible por ordenador, como se indica en el Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias (ver Instrucción Administrativa 802).

212
216

4. El presente informe contiene indicaciones relativas a los siguientes puntos:

- | | | |
|-------------------------------------|---------------|--|
| ☒ | Recuadro I | Base de este informe |
| ☐ | Recuadro II | Prioridad |
| ☒ | Recuadro III | Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial |
| ☐ | Recuadro IV | Falta de unidad de Invención |
| ☒ | Recuadro V | Declaración motivada según el Artículo 35(2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial, citas y explicaciones en apoyo de esta declaración |
| ☒ | Recuadro VI | Ciertos documentos citados |
| ☐ | Recuadro VII | Defectos en la Solicitud Internacional |
| ☐ | Recuadro VIII | Observaciones relativas a la solicitud internacional |

Fecha de radicación de la demanda: 20.02.2006
Fecha de elaboración de este reporte: 08.06.2006

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:

Oficina de Patentes Europea
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - o Tx:523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Funcionario Autorizado: Knudsen, H
Tel: +49 89 2399-8696

217

Recuadro I. Base de este informe

1. Por la respuesta al idioma, este informe se ha establecido sobre la base de la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó, salvo indicación en contra señalada a continuación.

- ☐ Este informe está basado en una traducción del idioma original al siguiente idioma , que es el de una traducción proporcionada a los fines de:
- ☐ búsqueda internacional (según Reglas 12.3 y 23.1 (b))
 - ☐ publicación de la solicitud internacional (según Regla 12.4)
 - ☐ examen preliminar internacional (según Reglas 55.2 y/o 55.3)

2. Por lo que respecta a los elementos* de la solicitud internacional, esta opinión se ha establecido sobre la base de *(las hojas de reemplazo que hayan sido enviadas a la Oficina receptora en respuesta a un requerimiento según el Artículo 14 se las denomina en este informe como "inicialmente presentadas" y no se anexan al informe)*:

Descripción, Páginas

1 - 47 tal como se presentaron inicialmente

Reivindicaciones, Números

1 - 15 tal como se presentaron inicialmente

Numero de Hojas

1-15 Tal como se presentaron inicialmente

- ☒ una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s) - ver Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias

3. ☐ Las modificaciones ha ocasionado la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.
- ☐ la lista de secuencias (especificar):
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

4. ☐ El presente informe ha sido establecido como si no se hubiesen presentado (algunas de) las modificaciones anexadas a

218

este informe y listadas abajo, ya que se ha considerado que iban más allá de la divulgación de la invención tal como fue presentada, como se indica en el Recuadro Suplementario (Regla - 0.2(c)).

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.
- ☐ la lista de secuencias (especificar):
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

* Si se utiliza el punto 4, algunas o todas estas páginas pueden llevar el sello de "sustituida".

Recuadro No. III. Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial

1. Las preguntas con respecto a si el invento reivindicado parece ser novedoso, implica una actividad inventiva (no ser evidente), o ser susceptible de aplicación industrial, por lo que respecta.

- ☐ al conjunto de la solicitud internacional,
- ☒ a las reivindicaciones Nos. 8-15 parcialmente

debido a que:

- ☒ la solicitud internacional, o las reivindicaciones Nos. 8-15 con respecto la aplicación industrial, en cuestión se refieren al objeto, respecto del cual no requiere examen preliminar internacional (especifique):

Ver hoja sep/rada

- ☐ a descripción, reivindicaciones, o los dibujos (indíquese cuales a continuación) o tales reivindicaciones Nos. en cuestión no son claras, de manera que no es posible formular una opinión significativa (especifique):
- ☐ las reivindicaciones, o las reivindicaciones Nos. en cuestión no son claras, de manera que no es posible formular una opinión significativa.
- ☒ no se ha emitido informe de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos. 8-15 parcialmente
- ☐ la lista de secuencias nucleótidas y/o de aminoácidos no cumplen la norma estándar prevista en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas por que:

215
219

- La lista en papel ☐ no se presentó
- ☐ no cumple con la norma estándar

- La lista en formato legible por ordenador
- ☐ no se presentó
- ☐ no cumple con la norma estándar

- ☐ las tablas relativas a las listas de secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos, si se han presentado únicamente en formato electrónico, no cumplen con los requisitos técnicos previstos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ ver Recuadro Suplementario para más detalles.

Recuadro No. V Declaración razonada según el Artículo 35 (2) con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial: anterioridades y explicaciones que soportan tal declaración

1. **Declaración**
- | | | |
|----------------------------|-----|-----------------------|
| Novedad (N) | Si: | Reivindicaciones 1-15 |
| | No: | Reivindicaciones |
| Nivel Inventivo (IS) | Si: | Reivindicaciones - |
| | No: | Reivindicaciones 1-15 |
| Aplicación Industrial (IA) | Si: | Reivindicaciones 1-7 |
| | No: | Reivindicaciones |

Ver hoja separada

2. **Citas y explicaciones (Regla 70.7)**
- ver hoja separada.**

Recuadro No. VI. Ciertos documentos citados

1. **Ciertos documentos publicados (Regla 70.10)**
- y/o

226
220

2. Divulgaciones no escritas (Regla 70.9)

ver hoja separada.

Recuadro suplementario relativo a listas de secuencias

Continuación del Recuadro 1, punto 2:

1. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido sobre la base de:

a. tipo de material

- ☒ una lista de secuencias
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias

b. formato del material

- ☒ por escrito
- ☒ en soporte legible por ordenador

c. fecha de presentación/entrega

- ☒ contenido en la solicitud internacional tal y como se presentó
- ☒ presentado junto con la solicitud internacional en formato legible por ordenador
- ☐ presentado posteriormente a esta Administración a los fines de búsqueda y/o examen
- ☐ recibido como modificación, por esta Administración en fecha _____

2. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla(s) relacionada(s) con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.

3. Comentarios adicionales

Ítem III

No formulación de concepto con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial

Las reivindicaciones 8-15 se relacionan con un método el cual comprende dos pasos irreconciliables, a saber, un paso de genotipificación y selección de una cantidad con base en la genotipificación y un paso de tratamiento de un sujeto. No existe relación técnica entre el paso de genotipificación y el paso de tratamiento (es decir, el paso de tratamiento no puede definirse mediante una genotipificación) y las reivindicaciones 8-15 han sido por lo tanto sometidas a búsqueda y evaluadas con respecto a novedad y nivel inventivo solamente con respecto a los pasos a) y b) de las reivindicaciones 8-14, mientras que el paso de tratamiento (es decir la reivindicación 15) no ha sido tomado en cuenta.

Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 8-15 sobre si son industrialmente aplicables, no existen criterios unificados entre los países miembros del PCT.

Ítem V

Declaración razonada con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial; citas y explicaciones sustentando dicha declaración

Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: DOS SANTOS CHRISTINE ET AL: "Un polimorfismo común del receptor de la hormona de crecimiento está asociado con una aumentada capacidad de respuesta a la hormona de crecimiento." NATURE GENETICS. JUL 2004, vol. 36, no. 7, julio de 2004 (2004-07), páginas 720-724, XP002346194 ISSN: 1061-4036

1. El antecedente D1 (publicado electrónicamente el 20.06.2004) es considerado el antecedente más cercano a la materia de la reivindicación 1, y muestra (las referencias en paréntesis aplican a este documento) que la isoforma d3 del polipéptido hGHR está asociada a una respuesta mayor al tratamiento con hormona de crecimiento (GH) (ver las Tablas 2-3). Los hallazgos en D1 aplican tanto para una población de corta edad gestacional (SGA) como para una de baja estatura idiomática (ISS).

La materia de la reivindicación 1 difiere de D1 en que la presencia del alelo d3 está asociada con la posibilidad de tener una disminuida respuesta a la hormona de crecimiento.

La reivindicación 1 por lo tanto es novedosa.

2. Sin embargo, los hallazgos de D1 y la presente solicitud son completamente opuestos con respecto a la respuesta vista en pacientes tratados con hormona de crecimiento (es decir, según D1, la respuesta es la mayor en pacientes que lleven en alelo d3, mientras que es mayor en pacientes que lleven un alelo GHRfl en la presente solicitud). Lo anterior aplica inclusive para el mismo tipo de paciente (es decir SGG) y medicamento (es decir rGH). Por lo tanto, no es claro si el problema técnico de predecir

280
222

una respuesta a un agente de hormona de crecimiento es resuelto por la materia de la reivindicación, y por consiguiente la reivindicación 1 no es considerada inventiva.

Tal como se explica anteriormente, la reivindicación 8 es evaluada como se si relacionara con un método de seleccionar una cantidad para administrar de agente de hormona de crecimiento. Por lo tanto, la reivindicación 8 difiere de la reivindicación 1 en que contiene la característica de seleccionar/determinar una cantidad de dosificación. Sin embargo, esto se sugiere en D1 (ver el penúltimo párrafo en la columna izquierda en la página 723) el cual sugiere que el hallazgo en el mismo es usado en farmacogenómicos. Adicionalmente, la reivindicación 8 no parece resolver el problema técnico por las mismas razones que la reivindicación 1. Por lo tanto, la reivindicación 8 no es inventiva.

Las reivindicaciones 2-7 y 9-14 no contienen características que aseguren que el problema técnico sea resuelto y por lo tanto no son consideradas inventivas.

3. Las reivindicaciones 8-15 se relacionan con materia considerada cubierta por esta Autoridad por las provisiones establecidas en la Regla 67.1(iv) del PCT. De manera que ningún concepto se formulará con respecto a la aplicación industrial de la materia de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) del PCT).

PATENT COOPERATION TREATY

24
23
RECEIVED
JUN 12 2006
PCT

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

FULLER, Grover, F., Jr.
Pfizer Inc.
201 Tabor Road
Morris Plains, NJ 07950
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY (PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year) 08.08.2006

Applicant's or agent's file reference
PC32455

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/IB2005/002086

International filing date (day/month/year)
27.08.2005

Priority date (day/month/year)
08.07.2004

Applicant
PHARMACIA & UPJOHN COMPANY LLC et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority:

 European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Moreno, R
Tel. +49 89 2399-2658



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PC32455	FOR FURTHER ACTION	See Form PCT/PEA/418
International application No. PCT/B2005/002086	International filing date (day/month/year) 27.06.2005	Priority date (day/month/year) 08.07.2004
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C12Q1/68 G01N33/74		
Applicant PHARMACIA & UPJOHN COMPANY LLC et al.		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☒ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 20.02.2006	Date of completion of this report 08.06.2006	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80288 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523858 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Knudsen, H Telephone No. +49 89 2399-3616 	

225 22+

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/IB2005/002086

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
 - ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*.

Description, Pages

1-47 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1-15 as originally filed

Claims, Numbers

1-15 as originally filed

☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing *(specify)*:
 - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing *(specify)*:
 - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

226 222

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
N PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2005/002086

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:
- ☐ the entire international application,
 - ☒ claims Nos. 8-15 (partially)
because:
 - ☒ the said international application, or the said claims Nos. 8-15 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):
see separate sheet
 - ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
 - ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
 - ☒ no international search report has been established for the said claims Nos. 8-15 (partially)
 - ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
 - the written form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - the computer readable form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
 - ☐ See separate sheet for further details

227 223

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2005/002086

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-15
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-15
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-7
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

see separate sheet

228 224

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2005/002086

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, Item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report has been established on the basis of:

a. type of material:

- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material:

- ☒ In written format
- ☒ in computer readable form

c. time of filing/furnishing:

- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in computer readable form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
- ☐ received by this Authority as an amendment on

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional observations, if necessary:

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and Industrial applicability

Claims 8-15 relate to a method which comprise two irreconcilable steps namely a step of genotyping and selecting an amount based on the genotyping and a step of treating the subject. There is no technical link between the genotyping step and the treatment step (ie the treatment step cannot be defined via the genotyping) and claims 8-15 have therefore been searched and examined with respect to novelty and inventive step only insofar as steps a) and b) of claims 8-14 are concerned, whereas the treatment step (ie claim 15) has been disregarded.

For the assessment of the present claims 8-15 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following document/s/:

D1: DOS SANTOS CHRISTINE ET AL: "A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone." NATURE GENETICS. JUL 2004, vol. 36, no. 7, July 2004 (2004-07), pages 720-724, XP002346194 ISSN: 1061-4036

1. The document D1 (published online on 20.06.2004) is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claim 1, and shows (the references in parentheses applying to this document) that the d3 isoform of the hGHR polypeptide is associated with a higher response to treatment with GH (see Tables 2-3). The findings in D1 applied to both a small for gestational age (SGA) and an idiopathic short stature (ISS) population.

The subject-matter of claim 1 differs from D1 in that the presence of the d3 allele is associated with a likelihood of having a decreased response to GH.

Claim 1 is therefore new.

2. However, the findings of D1 and the present application are completely opposite with respect to the response seen in patients treated with GH (ie according to D1 the response is highest in patients carrying the d3 allele, whereas it is higher in patients having a GHRf1 allele in the present application). This applies even for the same patient type (ie SGG) and medicament (ie rGH). Thus, it is not clear whether the technical problem of predicting a response to an growth hormone agent is solved by the subject-matter of claim 1 and claim 1 is therefore not considered inventive.

As explained above, claim 8 is examined as if related to a method of selecting an amount of growth hormone agent to administer. Thus, claim 8 differs from claim 1 in that it contains the feature of selecting/determining a dosage amount. However, this is suggested in D1 (see penultimate paragraph in left column on p.723) which suggests that the finding therein is used in pharmacogenomics. Moreover, claim 8 does not appear to solve the technical problem for the same reasons as claim 1. Thus, claim 8 is not inventive.

Claims 2-7 and 9-14 do not contain any features which ensure that the technical problem is solved and are therefore not considered inventive.

3. Claims 8-15 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☒

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Eduin Navarro

Firma Responsable

Fecha 27-12-2006

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: Info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

232

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 228

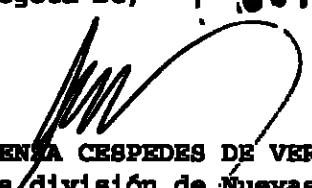
2020
Bogotá D.C.,

Doctor (a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PHARMACIA & UPJOHN COMPANY LLC

REFERENCIA	Radicación No.	06 129575
	Solicitud internacional	PCT/IB2005/002086
	Fecha inicio fase nacional	08/02/2007
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	2540
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC, 18 FEB. 2007


ALIX CARMEN CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpa10