



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 353 508**

② Número de solicitud: 200802597

⑤ Int. Cl.:

A61B 5/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **11.09.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
25.02.2011

⑦ Solicitante/s: **FUNDACIÓN PROGRESO Y SALUD
Américo Vespucio, 5 - 2 2
Parque Científico Tecnológico Cartuja 93
41092 Sevilla, ES**

⑦ Inventor/es: **León Gómez, Elvira María;
Rivero Valdenebro, Verónica y
Navarro Antolín, Francisco Javier**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Procedimiento de diagnóstico del síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAHS) mediante la cuantificación de la expresión de *PHD2* y/o *PHD3*.**

⑦ Resumen:

Procedimiento de diagnóstico del síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAHS) mediante la cuantificación de la expresión de *PHD2* y/o *PHD3*.

La presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico y la monitorización de respuesta al tratamiento del síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAHS) en humanos mediante la determinación cuantitativa de la expresión del gen prolilhidroxilasa 3 (*PHD3* = *EGLN3* = *HPH2*), caracterizado porque la determinación se realiza en leucocitos de sangre periférica. Un gen alternativo para el mismo fin es el gen de la prolilhidroxilasa 2 (*PHD2* = *EGLN1* = *HPHP1*). En concreto, los genes *PHD3* y *PHD2* codifican dos prolilhidroxilasas implicadas en la degradación de los factores de transcripción inducibles por hipoxia HIF (del inglés, *Hypoxia-Inducible Factor*).

ES 2 353 508 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de diagnóstico del síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAHS) mediante la cuantificación de la expresión de *PHD2* y/o *PHD3*.

La presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico y la monitorización de respuesta al tratamiento del síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAHS) en humanos mediante la determinación cuantitativa de la expresión del gen prolilhidroxilasa 3 (*PHD3* = *EGLN3* = *HPH2*), caracterizado porque la determinación se realiza en leucocitos de sangre periférica. Un gen alternativo para el mismo fin es el gen de la prolilhidroxilasa 2 (*PHD2* = *EGLN1* = *HPH1*). En concreto, los genes *PHD3* y *PHD2* codifican dos prolilhidroxilasas implicadas en la degradación de los factores de transcripción inducibles por hipoxia HIF (del inglés: *Hypoxia-Inducible Factor*).

Estado de la técnica anterior

El síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAHS), o hipoxia intermitente nocturna, es un desorden caracterizado por una interrupción parcial o completa del flujo de aire durante el sueño debido a un colapso de la vía respiratoria superior. Ello conlleva una disminución de la cantidad de oxígeno de la sangre (hipoxemia) y que afecta a un 2-6% de la población adulta (dependiendo de la definición exacta).

Numerosos estudios han puesto en evidencia una relación entre el SAHS no tratado y el deterioro de la calidad de vida, la aparición de hipertensión arterial sistémica, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, accidentes de tráfico, así como un exceso de mortalidad asociado al SAHS. Por ello, se considera que el SAHS constituye un problema de salud pública. Por otra parte, el tratamiento con presión positiva continua de la vía aérea (CPAP) es el tratamiento más eficaz y coste-efectivo.

El organismo ha desarrollado todo un sistema de respuestas moleculares, celulares y fisiológicas para contrarrestar los efectos perjudiciales que desencadena una bajada de tensión de oxígeno (hipoxia) en el mismo. Entre estas respuestas se producen unos cambios de expresión génica mediados, al menos en parte, por la activación de una familia de factores de transcripción denominados factores inducibles por hipoxia (HIF). El complejo heterodimérico que forma HIF está controlado por la disponibilidad de oxígeno. Bajo condiciones normóxicas, las proteínas HIF α son hidroxiladas por una familia de prolilhidroxilasas llamadas EGL-Nine homologos (EGLN) lo que provoca su degradación en el proteosoma. Por el contrario, en situación de hipoxia, debido a que estas enzimas requieren oxígeno molecular para su reacción catalítica, las hidroxilaciones no ocurren de forma eficiente por lo que HIF no se degrada y activa la transcripción de sus genes diana. Los niveles del ARN mensajero (o transcritos) de dos de los tres tipos de *EGLN* descritos hasta la fecha son inducibles por hipoxia (*PHD3* y *PHD2*) y presentan en las secuencias de sus promotores génicos elementos de respuesta a hipoxia (sitios de unión para HIF). (*PHD3*: Pescador N. *et al.*, 2005. *Biochem. J.* 390:189-197; *PHD2*: Metzzen M. *et al.*, 2005. *Biochem. J.* 387:711-717).

Un aumento del nivel de expresión de los transcritos de *PHD3* y *PHD2* en leucocitos humanos clónicos expuestos a hipoxia ha sido demostrado previamente (Del Peso L. *et al.*, 2003. *J. Biol. Chem.* 278: 48690-48695). No obstante se trataba de experimentos *ex vivo* y en una línea de células clónicas (Jurkat) mantenida artificialmente en laboratorios. No existen evidencias del mismo fenómeno en leucocitos de sangre periférica (PBL) humanos expuestos a hipoxia *ex vivo* (es decir, extraídos del torrente circulatorio por venopunción y seguidamente expuestos en un incubador a hipoxia) ni, lo que es más importante, en PBL expuestos a hipoxia *in vivo* en el mismo torrente circulatorio en alguna patología con hipoxemia (como son los PBL directamente obtenidos de pacientes con SAHS, es decir, leucocitos expuestos *in vivo* a hipoxemia).

En la actualidad para hacer un estudio de las posibles modificaciones del nivel de expresión de genes de interés en hipoxia se requiere realizar una biopsia, que es un procedimiento mucho más cruento que una simple venopunción.

Descripción de la invención

La invención se enfrenta, en general, con el problema de encontrar un método de diagnóstico cuantitativo para la determinación y/o detección del grado de exposición a hipoxemia de los pacientes con síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAHS), graduar el potencial de este tipo de hipoxia sobre el control de la expresión génica en humanos, y monitorizar la respuesta al tratamiento con CPAP; y se hace en células cuyo proceso de extracción no sea agresivo para el paciente.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los autores de la presente invención han descubierto que la expresión de los genes *PHD3* (y *PHD2*) o de sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína) son inducibles por la hipoxia en leucocitos de sangre periférica (PBL), con lo que el nivel de expresión de estos genes permite cuantificar el grado de exposición a la hipoxemia, y así evaluar la severidad del SAHS en función de su capacidad de producir modificación del nivel de expresión de genes inducibles por hipoxia en el ser humano.

Por lo tanto, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para el diagnóstico del Síndrome de Apnea-Hipopnea obstructiva del Sueño (SAHS) mediante la detección cuantitativa que comprende los siguientes pasos:

- a. obtención de leucocitos de sangre periférica;

ES 2 353 508 A1

- b. cuantificación de la expresión de los genes *PHD2* y/o *PHD3* en los leucocitos expuestos a condiciones de hipoxia;
- c. Determinación de la desviación del paso (b) con respecto al control y
- d. Análisis de la desviación del paso (c) y atribución de la misma como parte del cuadro clínico del síndrome SAHS.

Por “leucocitos en sangre periférica” tal y como se utiliza en esta invención debe entenderse, en general, los glóbulos blancos que circulan en la sangre. Hay cinco tipos de leucocitos; neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos, que en su mayor parte son del tipo de los neutrófilos y linfocitos. Los leucocitos provienen de una muestra de sangre total obtenida mediante cualquier método tradicional, incluido en el conocimiento general común.

El método proporcionado por esta invención, comprende la detección cuantitativa de los niveles de expresión de gen *PHD3* y/o *PHD2*, donde estos genes codifican proteínas para las enzimas prolil-hidroxilasas de la familia de factores de transcripción inducidos por hipoxia HIF.

Los términos “*PHD3*” y “*PHD2*” (también llamados “*EGLN3*” y “*EGLN1*” o “*HPH2*” y “*HPH1*” respectivamente) son dos genes que codifican proteínas con actividad enzimática del tipo prolil-hidroxilasa, actividad clave en la detección del nivel de oxígeno presente en las células.

Otro aspecto de la presente invención provee un procedimiento para la monitorización de la respuesta al tratamiento del Síndrome de Apnea-Hipopnea obstructiva del Sueño (SAHS) que comprende:

- a. obtención de leucocitos de sangre periférica por medio de tomas de muestras seriales de pacientes que han recibido un tratamiento;
- b. cuantificación de la expresión de los genes *PHD2* y/o *PHD3* en los leucocitos expuestos a condiciones de hipoxia;
- c. Determinación de la desviación del paso (b) con respecto al control y entre las muestras del mismo paciente.
- d. Análisis de la desviación del paso c) y atribución de la misma a la funcionalidad del tratamiento.

El procedimiento de monitorización de la respuesta al tratamiento del síndrome SAHS comprende una serie de pasos que comienzan por la toma de muestras seriales de sangre por venopunción y extracción del ARNm de los leucocitos de la sangre periférica. Se entiende por toma de muestras seriales a la extracción de sangre de pacientes que han sido sometidos a un tratamiento para mitigar los efectos del síndrome. La toma de muestras se realiza a diferentes tiempos desde que se administra el tratamiento, de forma que los niveles de expresión de los genes *PHD2* y/o *PHD3* en cada una de las muestras procedentes del mismo paciente indicarán la eficacia del mismo. Así pues, una disminución de la desviación de los valores de expresión de dichos genes respecto de un control, representado éste último, por ejemplo, por valores de expresión de los genes anteriores en un mismo individuo, previos al tratamiento, supondría que el tratamiento está surtiendo efecto en el sentido de disminuir el nivel de hipoxia en sangre. Este ejemplo no limitaría al método descrito únicamente a este tipo de control. Asimismo, el seguimiento del efecto del tratamiento puede llevarse a cabo comparando los niveles de expresión de los genes *PHD2* y/o *PHD3* a lo largo del tiempo transcurrido después de iniciado el mismo. Con esto último se puede ajustar la dosis y frecuencia en la toma del tratamiento.

En una realización preferida el tratamiento es una terapia de presión positiva continua en las vías respiratorias (PPCVR, o CPAP de las siglas en inglés), que consiste en insuflar una cierta presión en la vía aérea a partir de un generador de flujo por medio de una mascarilla nasal.

Otros posibles tratamientos susceptibles de ser evaluados por el procedimiento descrito en esta invención consisten en la administración de fluticasona, mirtazapina, fisostigmina, el uso de lubricante nasal o de dispositivos de avance mandibular, sin limitarse exclusivamente a los tratamientos citados.

Otro aspecto de la presente invención hace referencia a un procedimiento según cualquiera de los procedimientos anteriores, donde la cuantificación de la expresión de los genes *PHD2* y/o *PHD3* se realiza determinando el nivel de expresión de cualquier fragmento de ARNm correspondiente al transcrito de dichos genes.

El término ARNm hace referencia al ácido ribonucleico mensajero, un ácido nucleico monocatenario, de cadena simple, que contiene la información genética procedente del ácido desoxirribonucleico (ADN) para utilizarse como molde en la síntesis de proteínas. El ARNm experimenta un procesamiento que consiste básicamente en modificaciones de su secuencia y estructura; a) eliminación de fragmentos no codificantes, conocidos como intrones y empalme de los fragmentos codificantes, conocidos como exones (splicing), este proceso sólo se produce en células eucarióticas, b) la adición de otros fragmentos no codificados en el ADN o c) la modificación covalente de ciertas bases nitrogenadas. Con los diferentes métodos de extracción de ARN se suelen obtener todos los tipos de ARN de las células de interés,

ES 2 353 508 A1

es decir, ARN codificantes (ARNm) y ARN no codificantes: ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), ARN nucleolar (ARNsno), otros ARN minoritarios como ARNsn y ARN de la telomerasa, ARN de interferencia y micro ARN. La extracción de ARNm puede hacerse también de forma específica mediante sistemas de extracción que seleccionan sólo aquellos ARN con cola poli A.

5 En el sentido utilizado en esta descripción, “determinar el nivel de expresión de cualquier fragmento de ARNm correspondiente al transcrito de los genes *PHD2* y/o *PHD3*, incluye cualquier método que permita medir o estimar cualitativa o cuantitativamente el nivel de ARNm que se puede traducir en la proteína *PHD2* y/o en la proteína *PHD3* respectivamente en leucocitos de sangre periférica. En este caso, el nivel de ARNm de *PHD2* y/o de ARNm de *PHD3*,
10 proporciona información relativa al grado de repercusión sobre la expresión génica de la hipoxemia de enfermedades respiratorias como es el SAHS.

En una realización preferida del procedimiento descrito en los tres párrafos anteriores, la determinación del nivel de ARNm de *PHD2* y/o ARNm de *PHD3* se realiza mediante Northern blot, mapeo con la nucleasa S1, reacción en
15 cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), hibridación o microarrays sin excluir por ello cualquier otra técnica analítica que permita la detección y/o cuantificación del ARNm.

En una realización más preferida, el procedimiento de determinación del ARNm de *PHD2* y/o del ARNm de *PHD3*
20 se realiza mediante RT-PCR cuantitativa y comprende:

- a. diseño de pares de cebadores usando las secuencias de los genes *PHD2* y/o *PHD3*;
- b. diseño de pares de cebadores usando la secuencia de un gen considerado “housekeeping”;
- 25 c. obtención del ARNm de leucocitos de sangre periférica;
- d. obtención del ADN codificante de simple cadena mediante retrotranscripción utilizando como molde el ARNm obtenido según (c) y los cebadores correspondientes de los apartados (a) y (b);
- 30 e. obtención de fragmentos de ADN de doble cadena amplificados mediante PCR utilizando como molde el ADN codificante de (d) y los pares de cebadores de (a) y (b). En este paso se marca el ADN de doble cadena por medio de la unión de un fluoróforo con afinidad por este tipo de ADN;
- 35 f. lectura de la fluorescencia en tiempo real emitida durante la amplificación descrita en (e);
- g. normalización de los valores obtenidos en (f) correspondientes a las RT-PCR cuantitativas de los genes *PHD2* y/o *PHD3* utilizando como referencia los valores correspondientes a la RT-PCR cuantitativa llevada a cabo con los cebadores del gen “housekeeping”.
- 40

Un cebador o “primer” es un oligonucleótido corto que se puede sintetizar *in vitro* para ser utilizado en diversas técnicas moleculares. Se diseñan como secuencias complementarias de una región de ADN diana que se desea detectar. Para obtener un fragmento, son necesarios dos cebadores, uno de ellos se unirá a la hebra molde (que será el molde para la síntesis de ARNm) y el otro a la hebra complementaria (cebador reverso), en una posición que permita obtener,
45 mediante sucesivas amplificaciones con una enzima ADN polimerasa termorresistente, un fragmento que pueda ser detectado y/o cuantificado.

Para el diseño de cebadores es necesario hacer una serie de predicciones, como la temperatura de fusión (T_m) o la posibilidad de formación de horquillas que puedan reducir, por competencia, la efectividad de la hibridación con la
50 secuencia de ADN diana.

Las variables a tener en cuenta en el diseño de los cebadores son fundamentalmente:

- 55 - Tamaño del oligonucleótido
- Temperatura de fusión (T_m)
- Especificidad con el ADN de los genes *PHD2*, *PHD3* y/o gen “housekeeping” que pretendemos amplificar
- 60 - Secuencias complementarias
- Contenido en G/C y fragmentos de polipirimidinas (T, C) o polipurinas (A,G)
- Secuencia 3' terminal.
- 65 - Secuencia 5' terminal y regiones centrales.

ES 2 353 508 A1

Por tanto, en la presente invención se pretenden proteger aquellos pares de cebadores que den lugar a la amplificación de cualquier parte del ARNm de los genes *PHD2*, *PHD3* y/o gen “housekeeping” ya que con cualquiera de ellos se podría cuantificar su nivel de expresión.

5 El término “gen housekeeping” se entiende por un gen cuyo nivel de expresión (en este caso el nivel de su ARNm) no varía de forma significativa para una misma persona a pesar de estar sometida a diferentes condiciones experimentales.

10 La obtención del ARNm de una muestra se ha descrito anteriormente y forma parte del conocimiento general común.

15 La síntesis de ADN codificante del paso (d) se realiza por medio de cualquier enzima (retrotranscriptasa; RT o transcriptasa reversa) que utiliza el ARNm aislado de los leucocitos de sangre periférica como molde y el cebador conocido como reverso de cada uno de los pares descritos anteriormente, que hará de iniciador para obtener el ADN de cadena simple o monocatenario complementario a la secuencia de ARNm transcrita.

20 El siguiente paso es la obtención de fragmentos de ADN de doble cadena amplificados mediante PCR (de las siglas en inglés *Polimerase Chain Reaction*) utilizando como molde el ADN codificante de (d) y los pares de cebadores para cada uno de los genes de (a) y (b). Además, para la síntesis del ADN es necesaria la presencia de nucleótidos dNTPs, es decir, dATP, dTTP, dCTP y dGTP, ADN polimerasa termoestable, cloruro de magnesio en una concentración determinada así como tampones que creen las condiciones físico-químicas adecuadas para el funcionamiento de todos los componentes y se consiga con ello la amplificación.

25 La PCR se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

Desnaturalización del ADN de doble cadena que se consigue con temperaturas altas (94°C en la mayor parte de los casos), hibridación de los cebadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras (la temperatura es específica para cada par de cebadores) y extensión del cebador por actuación de la ADN polimerasa (el tiempo necesario para la extensión depende de la longitud del fragmento).

30 La cantidad de copias obtenidas tras la amplificación de los fragmentos es proporcional a la cantidad inicial de los mismos, es decir, a la cantidad de ARNm transcrito.

35 La técnica de la RT-PCR cuantitativa o también conocida como RT-PCR en tiempo real permite cuantificar en tiempo real la expresión de los genes de interés. Este método utiliza un fluoróforo que se une de manera no específica a los ADN de cadena doble pero con mayor afinidad que su unión a nucleótidos libres o ADN monocatenario. La emisión de fluorescencia es monitorizada en relación lineal a la obtención del ADN bicatenario, producto de la reacción de la PCR.

40 Para ello, antes de comenzar la reacción PCR, se añaden los fluoróforos a la mezcla de reacción descrita con anterioridad.

45 Para detectar la fluorescencia procedente de cada una de las amplificaciones, sometidas todas ellas a las mismas condiciones de amplificación, el termociclador tiene acoplado un detector que mide la fluorescencia en tiempo real a lo largo del tiempo de duración de los ciclos de amplificación. Para poder conocer la concentración de ADN que se obtiene como producto, es necesario usar patrones de concentración conocida que permitan extrapolar.

50 Para conocer los niveles reales de expresión de los genes *PHD2* y/o *PHD3* es necesaria la normalización de los valores obtenidos mediante la resta de aquellos valores de referencia de expresión basal correspondientes a la RT-PCR cuantitativa llevada a cabo con los cebadores del gen “housekeeping” en las mismas condiciones de ensayo.

Algunos ejemplos de detectores que pueden ser empleados para realizar la PCR cuantitativa son ABI prism 7500, ABI prism 7700, ABI prism 7900HT o Mx3005P.

55 En una realización preferida del procedimiento de determinación del ARNm de *PHD2* y/o del ARNm de *PHD3* realizado mediante RT-PCR cuantitativa, se usan los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para cuantificar el nivel de expresión del gen *PHD3*. En otra realización preferida se usan los cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para cuantificar el nivel de expresión del gen *PHD2*. Por último, en otra realización preferida el gen “housekeeping” es el ADN ribosomal de la subunidad 28S y los cebadores son SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

60 Otro aspecto de la presente invención está basado en un procedimiento donde la cuantificación de la expresión de los genes *PHD2* y/o *PHD3* se realiza determinando el nivel de expresión de las proteínas codificadas por dichos genes.

65 Puesto que el fundamento del procedimiento propuesto en esta invención consiste en la detección del nivel de expresión de los genes *PHD2* y/o *PHD3*, es decir, en su cuantificación, es necesario proteger la cuantificación de la expresión de los productos finales de la expresión de dichos genes; las respectivas proteínas para las que codifican.

Así pues, en una realización preferida del procedimiento anterior, la determinación del nivel de expresión de las proteínas se realiza, en combinación o de forma independiente, mediante el empleo de anticuerpos, técnicas basadas en el diagnóstico por imagen *in vivo*, citometría de flujo, o cualquier otra técnica analítica que permita su detección y/o cuantificación incluyendo a) metodologías de separación de proteínas; inmunodifusión, inmunoelectroforesis, inmunoelectroforesis en cohete, inmunofijación, electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), PAGE en condiciones no desnaturizantes, PAGE en condiciones desnaturizantes, PAGE-SDS, electroforesis bidimensional, isoelectroenfoque, transferencia a membranas (Western blot), cromatografía, b) visualización de las proteínas por medio de métodos de tinción: Coomassie, plata, métodos que emplean fluoróforos, c) identificación, caracterización y cuantificación de proteínas por escisión, digestión, análisis de espectrometría de masas; Huella peptídica (MALDI-TOF), espectrometría de masas en tándem (MS/MS) para secuenciación de péptidos, MALDI-TOF-TOF, SELDI-TOF, proteómica de expresión diferencial en gel (DIGE), proteómica de expresión sin gel; ICAT, iTRAQ, SILAC ICAT, d) identificación y cuantificación mediante chips de proteínas u otras técnicas de proteómica no incluidas en este listado.

Otro aspecto de la presente invención es un kit de diagnóstico de la hipoxia intermitente nocturna, caracterizado porque comprende:

- a. Reactivos para la detección y cuantificación de la expresión de los genes *PHD2* y/o *PHD3*, y/o el gen "housekeeping"
- b. controles positivos y negativos e
- c. instrucciones para la interpretación de los resultados.

Entre las posibles aplicaciones derivadas de la presente invención se incluye un kit de diagnóstico en humanos de riesgo/capacidad de modificaciones del nivel de expresión de los genes *PHD2* y/o *PHD3* sensibles a la hipoxia en leucocitos de sangre periférica. Entre los reactivos para la detección y cuantificación de la expresión de los genes *PHD2* y/o *PHD3*, y/o el gen "housekeeping" se incluyen; fragmentos o sondas complementarias al ARNm de los genes *PHD2* y/o al ARNm de *PHD3*, cebadores basados en la secuencia de los genes *PHD2* y/o *PHD3* así como en la secuencia del gen "housekeeping" o anticuerpos que reconozcan cualquier producto de los genes *PHD2* y/o *PHD3*.

Por controles positivos y negativos se entienden componentes del kit que permitan comprobar la eficacia de los reactivos suministrados en el mismo. La naturaleza de los controles depende de la propia naturaleza de los reactivos, así pues, en una realización preferida, los reactivos incluidos en el kit son los pares de cebadores basados en la secuencia de los genes *PHD2* y/o *PHD3* así como en la secuencia del gen "housekeeping" y, el control positivo es, por ejemplo, una construcción genética que incluya las secuencias de los fragmentos de los genes objeto de estudio en la presente invención, que pueden ser amplificadas por los pares de cebadores descritos anteriormente y, el control negativo es una construcción que carece de los fragmentos que codifican los genes objeto de estudio, presentes en el control positivo.

En las instrucciones o manuales para la interpretación de los resultados, se incluyen datos de expresión de los genes *PHD2* y/o *PHD3* en relación con la concentración de oxígeno presente en muestras de sangre periférica de individuos sanos y afectados así como su relación con el grado de afección del síndrome SAHS.

Como se ha mencionado en los párrafos anteriores, una realización preferida es un kit, según las características de este aspecto de la invención, donde los reactivos contienen los cebadores del gen *PHD3*, SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida los reactivos contienen los cebadores del gen *PHD2*, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. En la última realización preferida, el gen "housekeeping" es el ADN ribosomal de la subunidad 28S y los reactivos contienen los cebadores SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

Otro aspecto de la presente invención comprende el uso de los leucocitos de sangre periférica humana para evaluar el efecto de la hipoxia sobre la expresión de los genes sensibles al oxígeno con interés en patología humana. El tipo de genes evaluados en el leucocito son traducidos a proteínas que funcionan como el sensor de oxígeno en las células, que tienen la particularidad de ser modulables por cambios en la concentración de oxígeno, y no propiamente del leucocito. Así, por ejemplo, cambios en moléculas que circulan por la sangre (como es la disminución de moléculas del oxígeno en las arterias) producen cambios en el nivel de expresión de genes en órganos y tejidos, extraíbles por biopsia, que son idénticos al efecto que se produce sobre estos mismos genes en células fácilmente extraíbles y analizables, como son los leucocitos de sangre periférica.

En este sentido, en las líneas siguientes explicaremos la naturaleza y fundamento de la inducción de este tipo de genes.

Las condiciones de baja concentración en sangre provocan la acumulación de factores de transcripción HIF (del inglés *Hypoxia-Inducible Factor*). En condiciones de normoxia en la concentración de oxígeno en sangre, los productos de los genes *PHD2* y *PHD3* hidroxilan los residuos prolin, en una reacción producida después de la proteólisis de la subunidad alfa del complejo HIF. Es decir, en condiciones normóxicas, los complejos HIF son inactivados por los productos de los genes *PHD2* y *PHD3* pero, en condiciones de hipoxia, los complejos HIF no pueden ser inactivados ya que la hidroxilación es dependiente de oxígeno.

La inducción de los genes *PHD2* y *PHD3* se produce en condiciones de hipoxia pero, curiosamente, es dependiente de los factores de transcripción HIF. Una posible explicación de las razones por las que se acumulan los productos de la expresión de los genes *PHD2* y *PHD3* en condiciones de hipoxia es que en la reoxigenación, la degradación de los factores HIF se produce rápidamente.

El aumento de los niveles de HIF en condiciones de hipoxia da lugar a la activación y estimulación de diferentes genes. Entre los genes que se activan por HIF se incluyen aquellos cuyos productos proteicos participan en múltiples funciones celulares dirigidas a favorecer la oxigenación tisular, entre otras, angiogénesis, metabolismo energético, eritropoyesis, proliferación y viabilidad celular, remodelado vascular y apoptosis. La inducción vía HIF-1 afecta a factores de citoprotección, destinados a amortiguar el daño hipóxico y enzimas glucolíticas y de transporte de hexosas, necesarias para la adaptación metabólica inmediata y producción de ATP por vías anaerobias. También se activan genes de mediadores hemodinámicos, destinados a mantener la perfusión tisular, además los HIF inducen genes relacionados con la producción de transportadores de oxígeno, incluyendo hematies.

Por consiguiente, los genes cuya activación da lugar a los procesos mencionados anteriormente son útiles para evaluar el efecto de la hipoxia en relación con su interés en patología humana.

Una realización preferida de la presente invención es el uso de los leucocitos de sangre periférica, para cuantificar la expresión de los genes de interés en patología humana detectados en los diferentes tejidos y órganos.

Otro aspecto de la presente invención constituye el uso de los leucocitos de sangre periférica humana para evaluar el efecto de sustancias con potencial capacidad moduladora sobre el cuadro clínico del síndrome SAHS.

El siguiente aspecto de la presente invención está basado en el uso de los leucocitos de sangre periférica humana para cuantificar la expresión de los genes de interés en hipoxia que se expresan en cualquier tejido y/u órgano del ser humano. En dos realizaciones preferidas se usan leucocitos para cuantificar la expresión de genes, mediante ARNm y/o proteínas, como marcadores pronósticos y también como dianas terapéuticas. En una realización más preferida, los genes son *PHD2* y/o *PHD3*.

Cualquiera que sea el gen o genes que se expresen en condiciones de hipoxia y cualquiera que sea el tejido, podrán detectarse sus productos en los leucocitos presentes en la sangre periférica por tanto, los leucocitos pueden ser utilizados como testigos a distancia de la regulación de genes en cualquier tipo de tejido del organismo.

A lo largo de toda la descripción y reivindicaciones de la especificación, la palabra “comprende” y las variaciones de la misma, no pretenden excluir otros aspectos de la presente invención, que resultarán evidentes para un experto en la materia a la vista de la descripción.

La exposición detallada de los modos de realización y de las figuras que siguen se proporciona a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra la recta de regresión de la amplificación del gen *PHD3* mediante PCR cuantitativa a tiempo real. A partir de esta recta se calcula la cantidad relativa de expresión del gen en cada una de las muestras. Esta recta de regresión (también llamada recta de calibración) se genera con al menos tres puntos por triplicado correspondientes a una cantidad de DNA complementario, su doble y su mitad (esto es, cantidades relativas 1, 2, y 0.5 respectivamente). Se aseguró en cada recta de calibración una eficacia de la reacción de PCR del 100%, con una pendiente de la recta de calibrado de -3.32 y una regresión de $R^2=0.98$. CU es el ciclo umbral (del inglés: threshold cycle), es decir, el ciclo de la PCR cuantitativa a partir del cual empieza a detectarse el gen; y CDNA es la cantidad de DNA complementario que sirve de molde en la reacción de la PCR cuantitativa.

La Fig. 2 muestra la banda de amplificación del gen *PHD3*, señalada como *PHD3*, una vez amplificada por PCR cuantitativa en leucocitos humanos de sangre periférica (PBL) de enfermos con Síndrome de Apnea Obstruktiva del Sueño y en linfocitos humanos de la línea clónica tumoral (Jurkat). En un gel de agarosa al 3% se muestra para cada tipo celular el producto de 40 ciclos de amplificación utilizando los cebadores descritos: una única banda del tamaño esperado (69 bp). Se muestran los marcadores de 50 y 100 pares de bases (bp).

La Fig. 3 muestra la especificidad de la amplificación del gen *PHD3* mediante PCR cuantitativa en leucocitos humanos circulantes. Se muestra la curva de disociación obtenida en una reacción de PCR en la que se ha amplificado el gen *PHD3*, tras retrotranscripción de 250 ng de ARN total de leucocitos humanos de sangre periférica. Cuando se usan los oligonucleótidos reseñados para el gen *PHD3*, se detecta un único amplicón con un pico máximo de temperatura de *melting* de aproximadamente 75.5°C. Como control negativo (control de no amplificación) se incluye un punto de confirmación de no amplificación a partir de una reacción de retrotranscripción similar a la anterior pero en ausencia de ARN (NAC: non amplification control).

La Fig. 4 muestra la correlación biparamétrica entre el nivel de ARN mensajero (mRNA) del gen *PHD3* y la saturación arterial mínima de oxígeno (Sm O₂), medidas en pacientes SAOS justo antes de empezar el tratamiento con CPAP. $R^2=0.67$.

ES 2 353 508 A1

La Fig. 5 muestra el nivel de expresión, medido por PCR cuantitativa, del gen PHD3 en los leucocitos periféricos circulantes (PBL) de pacientes con SAOS antes de iniciar el tratamiento con CPAP (pre-CPAP) y tras 3 meses de tratamiento con CPAP (post-CPAP).

5 Se muestra el resultado de los mismos 7 pacientes de la figura 4. *: $p < 0.01$.

Exposición detallada de la invención

10 A continuación se ilustrará la invención mediante el siguiente ensayo realizado por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad del procedimiento de diagnóstico del síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAHS) mediante la cuantificación de la expresión de *PHD2* y/o *PHD3* y su capacidad de modular la expresión de genes en patología humana.

Ejemplo 1

15 *Detección cuantitativa del ARNm de los genes PHD3 y PHD2 en PBL*

De cada ejemplo estudiado, se extrajeron 8 ml de sangre completa mediante venopunción periférica, tras obtener el consentimiento informado, en pacientes con síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAHS) o síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS) o hipoxia intermitente nocturna.

20 El ARNm de los PBL humanos fue obtenido en la primera hora, tras la extracción de la sangre, mediante el kit comercial QIAamp® ARN Blood Mini kit (Qiagen) y 0,25 µg de ARN total se usó para la reacción de retrotranscripción (RT) en el volumen final de 40 µl, mediante Superscript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

30 La PCR cuantitativa se realizó con Brilliant® SVBR® Green QPCR Master mix (Stratagene) en una mezcla de reacción de 14 µl conteniendo 1 x Brilliant® SYBR® Green QPCR Master mix, 5 µM oligonucleótidos cebadores (para PHD3: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2; para PHD2: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, para 28S: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6) y 0,5 µl del volumen final de RT. Las reacciones de PCR a tiempo real se llevaron a cabo en un aparato Mx3005P (Stratagene) usando las siguientes condiciones de amplificación:

- 10 min a 95°C, y a continuación 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

35 El ciclo de la PCR a tiempo real a partir del cual comienza el aumento de la señal fluorescente (ciclo umbral) correlaciona con la cantidad inicial de ARNm de la muestra. Así, cuanto más precoz es el ciclo umbral, habrá una mayor expresión del gen. La normalización de los valores se realizó mediante la amplificación simultánea en paralelo de un gen considerado “housekeeping”, como es la subunidad 28S del ARN ribosomal.

40 Los productos amplificados por esta PCR se analizaron mediante el propio software del aparato Mx3005P (Stratagene). El análisis de las curvas de disociación para cada gen mostró un único pico con la temperatura de disociación esperada en todas las muestras. La cuantificación se realizó mediante la interpolación, usando una recta de regresión estándar de los valores de ciclo umbral, obtenidos a partir de una cantidad, el doble, su mitad y su cuarta parte del volumen final de la RT (Fig 1).

45

Ejemplo 2

50 *Diseño del kit de diagnóstico para hipoxemia humana*

El kit diagnóstico incluye las parejas de oligonucleótidos cebadores para la amplificación de cada gen mediante PCR cuantitativa en tiempo real, se diseñaron con el programa Primer Express 2.0 de Applied Biosystems, y son:

55 *Human PHD3*: NM_022073

Secuencia 1040-1061; SEQ ID NO: 1

Secuencia 1081-2008; SEQ ID NO: 2

60

Human PHD2: NM_022051

Secuencia 4033-4049; SEQ ID NO: 3

65

Secuencia 4085-4111; SEQ ID NO: 4

ES 2 353 508 A1

Human ribosomal 28S: M11167: Gen “housekeeping”.

Secuencia 4451-4476; SEQ ID NO: 5

5 Secuencia 4549-4572; SEQ ID NO: 6

Ejemplo 3

10 *Regulación de la expresión de PHD3 por la tensión de O₂ en leucocitos humanos de sangre periférica y test PHD3 en pacientes con SAHS*

El síndrome SAHS es un modelo humano bien caracterizado de hipoxemia intermitente crónica. Hemos investigado en un grupo de enfermos con SAHS la correlación entre el nivel de expresión de la prolilhidroxilasa *PHD3* y la
15 severidad de la enfermedad evaluada como grado de hipoxemia. Dado que los leucocitos están en contacto directo con la tensión de oxígeno vascular y se obtienen sin complicaciones de sangre periférica, usamos los PBL para determinar la expresión y regulación por hipoxia de estas prolilhidroxilasas.

Tanto en PBL como en linfocitos de la línea clónica denominada Jurkat se amplificó el ARNm de *PHD3* con un tamaño de banda adecuado (Fig 2) y un único amplicón (Fig 3) identificado por RT-PCR, que luego se confirmó mediante secuenciación de los fragmentos de la PCR.

Hemos determinado sistemáticamente el nivel de ARNm de *PHD3* en PBL de 7 pacientes con SAHS no tratado. Los pacientes fueron varones, con una media de edad de 46.6±2.9 años y con un índice de masa corporal de 30.7±1.2
25 kg/m². Los índices de apnea-hipopnea y de desaturación fueron de 62.0±7.4 y 59.1±7.2, respectivamente.

Los niveles de ARNm de *PHD3* en PBL (Fig 4, r=0.67, p<0.05) se correlacionaron, aunque en sentido opuesto, con el nivel mínimo de la saturación de O₂ arterial nocturna (SatO₂ mín). Tras un promedio de 3 meses con tratamiento con CPAP el nivel de ARNm de *PHD3* leucocitario (Fig 5) disminuyó significativamente.

30 Estos datos sugieren que la hipoxemia intermitente crónica induce un aumento de la expresión de *PHD3* en leucocitos circulantes humanos (PBL).

La invención pone de manifiesto no sólo que un parámetro molecular (nivel de expresión de *PHD3*) se correlaciona con un factor etiopatogénico (como es la hipoxia), sino que implica que cambios cuantitativos en el nivel de expresión de *PHD3* reflejarían la capacidad en cada paciente de que la hipoxia produzca cambios en la expresión de sus genes.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para el diagnóstico del Síndrome de Apnea-Hipopnea obstructiva del Sueño (SAHS) que comprende:
- 10 a. obtención de leucocitos de sangre periférica;
 - b. cuantificación de la expresión de los genes *PHD2* y/o *PHD3* en los leucocitos expuestos a condiciones de hipoxia;
 - 15 c. Determinación de la desviación del paso (b) con respecto al control y
 - d. Análisis de la desviación del paso (c) y atribución de la misma como parte del cuadro clínico del síndrome SAHS.
2. Procedimiento para la monitorización de la respuesta al tratamiento del Síndrome de Apnea-Hipopnea obstructiva del Sueño (SAHS) que comprende:
- 20 a. obtención de leucocitos de sangre periférica por medio de tomas de muestras seriales de pacientes que han recibido un tratamiento;
 - b. cuantificación de la expresión de los genes *PHD2* y/o *PHD3* en los leucocitos expuestos a condiciones de hipoxia;
 - 25 c. Determinación de la desviación del paso (b) con respecto al control y entre las muestras del mismo paciente.
 - d. Análisis de la desviación del paso c) y atribución de la misma a la funcionalidad del tratamiento.
3. Procedimiento según la reivindicación 2 donde el tratamiento es una terapia de presión continua positiva de la vía aérea (CPAP).
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la cuantificación de la expresión de los genes *PHD2* y/o *PHD3* se realiza determinando el nivel de ARNm correspondiente al transcrito de dichos genes.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, donde la determinación del nivel de ARNm de *PHD2* y/o ARNm de *PHD3* se realiza mediante Northern blot, mapeo con la nucleasa S1, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), hibridación o microarrays o cualquier otra técnica analítica que permita su detección y/o cuantificación.
6. Procedimiento según las reivindicaciones 4 y 5, donde la determinación del ARNm de *PHD2* y/o del ARNm de *PHD3* se realiza mediante RT-PCR cuantitativa.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, donde se usan los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para cuantificar el nivel de expresión del gen *PHD3*.
8. Procedimiento según la reivindicación 6, donde se usan los cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para cuantificar el nivel de expresión del gen *PHD2*.
9. Procedimiento según la reivindicación 6, donde el gen “housekeeping” es el ADN ribosomal de la subunidad 28S y los cebadores son SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la cuantificación de la expresión de los genes *PHD2* y/o *PHD3* se realiza determinando el nivel de expresión de las proteínas correspondientes a dichos genes.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, donde la determinación del nivel de expresión de las proteínas se realiza mediante el empleo de anticuerpos, citometría de flujo proteómica o cualquier otra técnica analítica que permita su detección y/o cuantificación.
12. Kit de diagnóstico del Síndrome de Apnea-Hipopnea obstructiva del Sueño (SAHS), **caracterizado** porque comprende:
- 65 a. Reactivos para la detección y cuantificación de la expresión de los genes:
 - i. *PHD2* y/o *PHD3*; o

ES 2 353 508 A1

ii. *PHD2* y/o *PHD3* y el gen “housekeeping”.

b. controles positivos y negativos e

5 c. instrucciones para la interpretación de los resultados.

13. Kit según la reivindicación 12 (a) donde los reactivos contienen los cebadores del gen *PHD3*, SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

10 14. Kit según la reivindicación 12 (a) donde los reactivos contienen los cebadores del gen *PHD2*, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

15 15. Kit según la reivindicación 12 (a) donde el gen “housekeeping” es el ADN ribosomal de la subunidad 28S y los reactivos contienen los cebadores SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

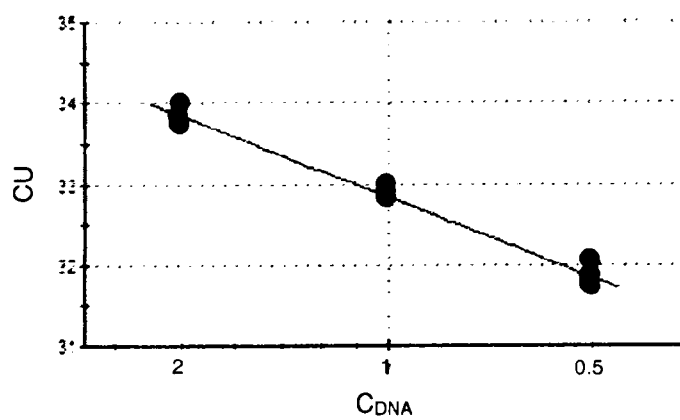


FIG. 2

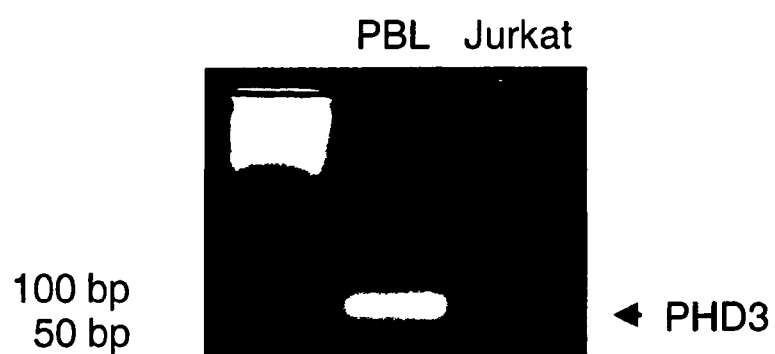


FIG. 3

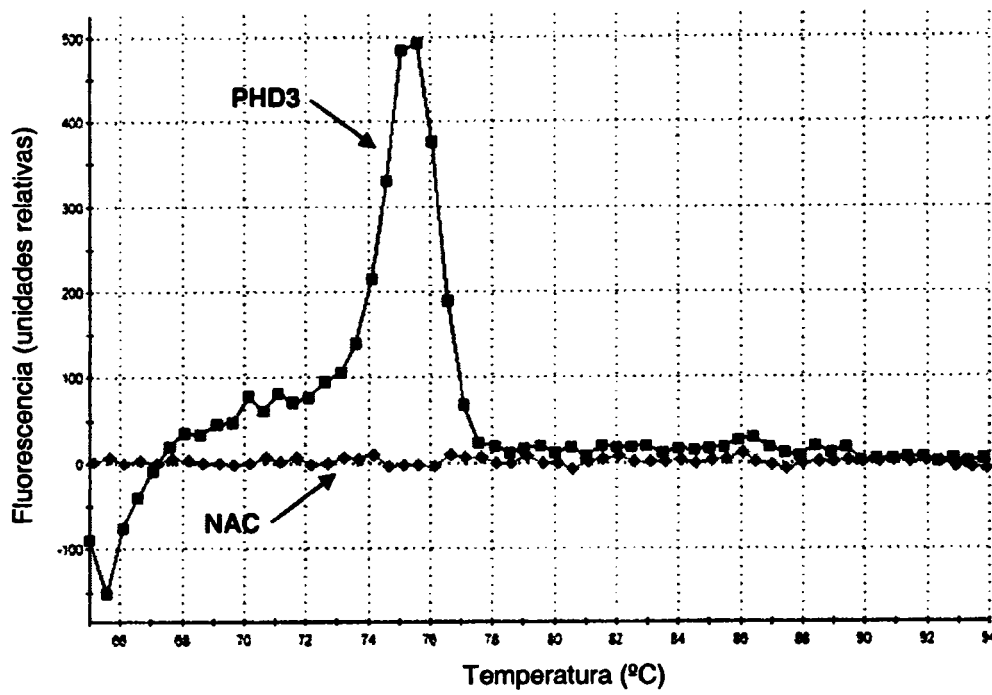


FIG. 4

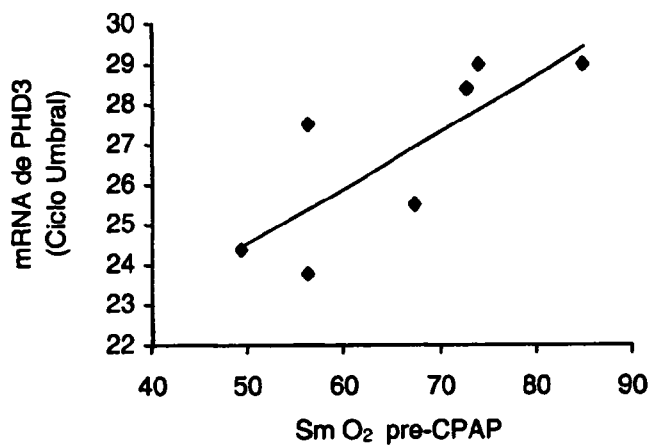
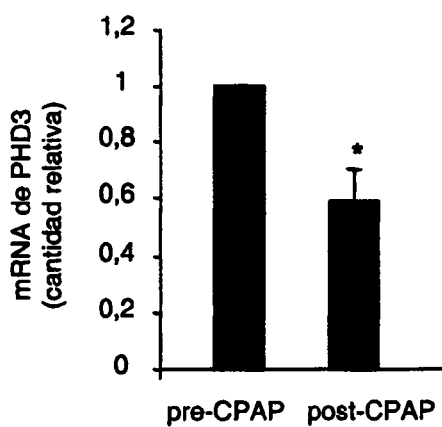


FIG. 5



ES 2 353 508 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Fundación Progreso y Salud

5 <120> Procedimiento de diagnóstico del síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAHS) mediante la cuantificación de la expresión de PHD2 y/o PHD3

<130> 1985.1

10

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

25 **gaagactgac cgtgctctga aa**
22

<210> 2

30

<211> 28

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

35

<400> 2

40 **ttaagagaa ttcaggaacc gttactaa**
28

<210> 3

<211> 17

45

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

50

aatggccgga cgaaagc
17

55

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

60 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

65 **catttgatt atcaacatga cgtacat**
27

ES 2 353 508 A1

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

10 **gttggattgt tcaccacta atagg**
25

<210> 6

15 <211> 23

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 6

25 **taccatggca acaacacatc atc**
23

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200802597

②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.09.2008

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DEL PESO, LUIS et al. "The von Hippel Lindau/Hypoxia inducible Factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-Proline Hydroxylase genes in response to low oxygen" The Journal of Biological Chemistry (5 diciembre 2003); vol. 278; nº 49; páginas 48690-48695. DOI 10.1074/jbc.M308862200. Todo el documento.	1-15
A	JIANHE HUANG et al. "Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1 α for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2 and PHD3" The Journal of Biological Chemistry (18 octubre 2002); vol. 277; nº 42; páginas 39792-39800; DOI 10.1074/jbc.M206955200. Todo el documento.	1-15
A	EDURNE BERRA et al. "HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia" The EMBO Journal (2003); vol. 22; nº 16; páginas 4082-4090. Todo el documento.	1-15
A	JAN H. MARXSEN et al. "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- α -prolyl-4hydroxylases" Biochemical Journal (23 abril 2004) vol. 381; páginas 761-767; DOI 10.1042/BJ20040620. Todo el documento.	1-15
A	ERIC METZEN et al. "Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element" Biochemical Journal (2005) vol. 387; páginas 711-717; DOI 10.1042/BJ20041736. Todo el documento.	1-15
A	NURIA PESCADOR et al. "Identification of a functional hipoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene" Biochemical Journal (12 abril 2005) vol. 390; páginas 189-197; DOI 10.1042/BJ20042121. Todo el documento.	1-15
A	THOMAS G. SMITH et al. "The human side of hypoxia-inducible factor" British Journal of Haematology (mayo 2008); vol. 141; nº 3; páginas 325-334; DOI 10.1111/j.1365-2141.2008.07029.x. Todo el documento.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 14.02.2011	Examinador M. García Coca	Página 1/4
---	-------------------------------------	----------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61B5/00 (01.01.2006)

G01N33/53 (01.01.2006)

C12Q1/68 (01.01.2006)

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

A61B, G01N, C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.02.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-15	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DEL PESO, LUIS et al.	5 diciembre 2003
D02	JIANHE HUANG et al.	18 octubre 2002
D03	EDURNE BERRA et al.	2003
D04	JAN H. MARXSEN et al.	23 abril 2004
D05	ERIC METZEN et al.	2005
D06	NURIA PESCADOR et al.	12 abril 2005
D07	THOMAS G. SMITH et al.	Mayo 2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, según se recoge en las reivindicaciones 1-11, es un procedimiento para el diagnóstico y para la monitorización de la respuesta al tratamiento del Síndrome de la Apnea-Hipopnea del Sueño (SAHS). Estos procedimientos se basan en la cuantificación de la expresión de los genes PHD2 (EGLN1) y/o PHD3 (EGLN3) en leucocitos de sangre periférica expuestos a condiciones de hipoxia. Es también objeto de la invención, según se recoge en las reivindicaciones 12-15, un kit de diagnóstico de dicha enfermedad.

Novedad (art. 6.1 Ley 11/1986) y Actividad Inventiva (art. 8.1 Ley 11/1986)

El documento D01 divulga que la expresión de los genes EGLN1 y EGLN3 se induce tras situaciones de hipoxia a través de la ruta EGLN/VHL/HIF. Los autores realizan los estudios de expresión de dichos genes en respuesta a condiciones de baja concentración de oxígeno en la línea celular Jurkat, que es una línea celular de leucocitos humanos clónicos.

Es conocido en el estado de la técnica la relación entre la inducción de la expresión de los genes PHD2 y PHD3 y las situaciones de hipoxia (ver docs. D01-D07), ya que actúan como sensores de la concentración de oxígeno. Además, se ha visto que esta cascada de activaciones y degradaciones está presente en una gran variedad de tipos celulares (ver docs. D01-D07) y no parece que haya una especial dificultad en detectar la expresión de los genes PHD en un tipo celular determinado.

Es por esto, que a la vista del documento D01 y teniendo en cuenta el estado de la técnica, se considera que un experto en la materia intentaría obtener un procedimiento de diagnóstico y para la monitorización de la respuesta al tratamiento del SAHS determinando los niveles de expresión de los genes PHD2 y PHD3 en leucocitos de sangre periférica y tener una expectativa razonable de éxito. De igual forma, sería obvio para el experto en la materia, elaborar un kit de diagnóstico de SAHS con los reactivos necesarios para la detección y cuantificación de la expresión de los genes PHD2 y/o PHD3. Por lo tanto, la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-15, aunque nueva según el art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes, no implica actividad inventiva según el art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.