



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 372 506**

② Número de solicitud: 201130348

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **26.04.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2012**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
23.01.2012

⑥ Número de la solicitud inicial: **201030604**

⑦ Solicitante/s: **Fundació Institut de Recerca Hospital
Universitari Vall d'Hebrón, Fundació Privada
Passeig Vall d'Hebrón, 119-129
08035 Barcelona, ES**

⑧ Inventor/es: **Schwartz Navarro, Simón y
Alijotas Reig, Jaume**

⑦ Agente: **Zea Checa, Bernabé**

⑤ Título: **Método de detección de la susceptibilidad a desarrollar efectos secundarios adversos relacionados con bioimplantes.**

⑤ Resumen:

Método de detección de la susceptibilidad a desarrollar efectos secundarios adversos relacionados con bioimplantes.

Método *in vitro* para el análisis de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos relacionados con materiales no metálicos implantados en el cuerpo. El método comprende determinar si en una muestra biológica de un individuo está presente el antígeno HLA-DRB1*3 del complejo mayor de histocompatibilidad. También se describe el uso de un kit para llevar a cabo la determinación y el empleo del antígeno como marcador genético.

ES 2 372 506 A1

DESCRIPCIÓN

Método de detección de la susceptibilidad a desarrollar efectos secundarios adversos relacionados con bioimplantes.

La presente invención está relacionada con la medicina, más concretamente está relacionada con los efectos adversos derivados de los bioimplantes que son aplicados o insertados en el organismo principalmente por razones estéticas (cosméticas o terapéuticas). La invención va dirigida a la preservación de la salud y proporciona herramientas para analizar el riesgo de efectos secundarios severos derivados de la aplicación de dichos bioimplantes.

Estado de la técnica anterior

Existe cada vez un mayor número de personas que buscan soluciones médicas para la piel con apariencia envejecida o bien con finalidades puramente estéticas y cosméticas. Otras personas, debido a situaciones patológicas, optan también por el empleo de bioimplantes. Un bioimplante se define como un material implantado quirúrgicamente en el cuerpo de una persona para reemplazar un tejido dañado. El término bioimplante define una clase de implante que está generalmente asociado a un implante no metálico. Las áreas comunes de aplicación de dichos bioimplantes incluyen la cirugía ortopédica reconstructiva (en particular la maxilofacial), las prótesis para aumento de mamas, las prótesis cardíacas (válvulas cardíacas artificiales como la válvula de corazón Chitra), cutáneas y de la córnea. Una clase de bioimplantes ampliamente utilizados hoy en día son los implantes poliméricos o cerámicos, siendo un ejemplo de los mismos los implantes de relleno o microprótesis dérmicos y sub-dérmicos.

Actualmente, los médicos especialistas pueden utilizar diferentes tipos de implantes de relleno dérmicos y sub-dérmicos, incluyendo los materiales no permanentes, permanentes, reversibles o no reversibles. Los implantes de relleno dérmicos y sub-dérmicos son materiales que se inyectan para corregir las arrugas, líneas de expresión, lipodistrofia y otros rasgos que un individuo puede desear o necesitar corregir, principalmente a nivel facial. Estos compuestos se emplean para rellenar las cavidades o estrías en el tejido dérmico ocasionadas por múltiples diferentes causas. Se han propuesto diversas clasificaciones de implantes de relleno según su origen y longevidad (duración). En la actualidad, la mayoría de implantes de relleno utilizados en todo el mundo son acrilamidas (compuestos de poliácridamida y polialquilimida), compuestos del ácido hialurónico, ácido poliláctico, compuestos de polimetilmetacrilato, hidroxapatita cálcica y aceite de silicona. Aunque los fabricantes y las diferentes publicaciones sostienen que los implantes de relleno no son tóxicos y no son inmunogénicos, y que las complicaciones derivadas de su uso no son muy comunes, en realidad se han detectado efectos secundarios indeseados con todos los compuestos utilizados. Algunos de estos efectos secundarios son efectos de aparición tardía, los cuales en muchos casos son difíciles de correlacionar con el empleo de dichos implantes de relleno o bioimplantes. Los efectos secundarios adversos asociados a la inyección de implantes de relleno dérmicos o sub-dérmicos pueden ser efectos secundarios severos, que derivan hacia manifestaciones locales granulomatosas crónicas y, aunque raramente, a enfermedades autoinmunes. Así, se observa que en la clasificación habitual de los implantes de relleno utilizados, existe todavía la necesidad de definir otros dos conceptos: la seguridad a largo plazo y la reversibilidad de los efectos secundarios derivados de los mismos.

Cuando un material de relleno dérmico es inyectado, tienen lugar las reacciones normales de tipo cuerpo extraño (los llamados "granulomas estables"). Desafortunadamente, en algunas personas dichos granulomas estables se convierten en granulomas nocivos inflamatorios y persistentes, en trastornos granulomatosos o, si bien en raras ocasiones, en enfermedades autoinmunes. Algunas veces los efectos secundarios indeseables derivados del material de relleno aparecen durante un traumatismo menor o después de una infección. Existe la hipótesis que los antecedentes genéticos (propios y específicos de cada individuo) deben jugar un papel importante en el desarrollo de estas reacciones adversas, pero aún se desconoce su origen exacto y no se pueden efectuar predicciones. Este hecho representa un verdadero problema si se considera el número creciente de personas que optan por el empleo de estas clases de bioimplantes.

Entre los pacientes que presentan efectos adversos inmediatos o tardíos relacionados con los implantes de relleno dérmicos, la mayoría de ellos presentan efectos secundarios locales o generales, principalmente relacionados con enfermedades del tejido conectivo. Cabe destacar que varios de los pacientes presentan trastornos inmunomediados sistémicos inflamatorios, tales como esclerodermia o síndrome esclerodermiformes, polimiositis, síndrome de Sjögren, sarcoidosis cutánea, trastornos granulomatosos, pneumonitis y enfermedad por adyuvante humana.

Una manera de detectar previamente si un individuo es susceptible a presentar efectos adversos inmediatos o tardíos (aparición tardía) relacionados con los implantes de relleno dérmicos y sub-dérmicos, consiste en inyectar 0.1 ml del implante de relleno intradérmicamente en la dermis del antebrazo y visualizar si existe reacción. Sin embargo, el tiempo que transcurre hasta la aparición de algunas reacciones es normalmente de 5-8 semanas. Además, en la biopsia (prueba) la dermis se lesiona. Por otra parte, las autoridades sanitarias discrepan de este procedimiento. Así, existe la necesidad de encontrar otras formas para detectar si un paciente reaccionará adversamente al implante de relleno colocado o inyectado.

El sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA) es el nombre del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en humanos. Es un superlocus que contiene un gran número de genes relacionados con la función del sistema inmunológico en humanos. Todos estos genes están agrupados en un segmento de 4 Mb en el brazo corto del

cromosoma 6 en humanos. La región HLA comprende seis loci principales que codifican proteínas estructuralmente homologas, las cuales son clasificadas en la Clase I HLA (HLA-A, B, Cw) y Clase II (HLA-DR, DQ, DP), que presentan antígenos a dos sub-conjuntos diferentes de células.

5 Las moléculas de Clase I consisten en dos cadenas de polipéptidos, α - y β 2-microglobulina. Las dos cadenas están unidas no covalentemente por medio de la interacción de la β 2-microglobulina y el dominio α 3. Solamente la cadena α es polimórfica y codificada por el gen HLA, mientras que la subunidad de la β 2-microglobulina no es polimórfica y es codificada por el gen de la β 2-microglobulina. El dominio α 3 se encuentra en el anclaje de la membrana plasmática e interacciona con el co-receptor transmembrana glucoproteínico CD8 de las células T. Los dominios α 1 y α 2 se pliegan para formar un surco para que los péptidos se unan. Las moléculas de Clase I del MHC se unen a péptidos que tienen una longitud de 8-10 aminoácidos.

En el caso del locus HLA-B, los polimorfismos se encuentran principalmente localizados en los exones 2 y 3. Hasta la fecha, se conocen cientos de variantes alélicas de este locus, lo que significa que este locus es el más polimórfico de los loci HLA. Las variaciones alélicas del locus HLA-B son las más importantes en la selección de un posible trasplante dentro de las moléculas de Clase I. A cada una de las variantes alélicas se le da un número particular (tal como HLA-B8). Los alelos que están íntimamente relacionados se agrupan juntos; por ejemplo, existen por lo menos 54 alelos muy semejantes y que son subtipos de HLA-B8. Estos subtipos están designados como HLA-B*080101 a HLA-B*0854. El gen HLA-B comprende múltiples variaciones normales muy diferentes, lo que permite que el sistema inmunológico de cada persona reaccione a una amplia gama de invasores extraños.

Las moléculas de Clase II son glucoproteínas heterodiméricas que se componen de una cadena alfa no polimórfica y una cadena beta polimórfica. Las moléculas de la Clase II HLA (o MHC) se expresan en la superficie celular de los macrófagos, células B, células T activadas, y otros tipos de células involucradas en la presentación de antígenos a células T que expresan la glucoproteína CD4 en la superficie de la célula. Los genes DP, DQ y DR están localizados en regiones separadas del MHC. En la región DR, un único locus DRA codifica la cadena DRalfa no polimórfica, pero nueve loci DRB diferentes, denominados DRB1 a DRB9, codifican la cadena polimórfica. Por otra parte, el número de alelos DRB identificados va aumentando continuamente.

En el caso del locus HLA-DRB1, diferentes alelos de este locus se denominan DRB1*01, DRB1*02, DRB1*03 etc., y estos alelos en conjunto forman lo que se llama un “grupo alélico” en esta descripción. Por otra parte, varias secuencias genéticas se agrupan bajo un alelo DRB1 específico. Así, el alelo DRB1*03 puede tener diferentes secuencias que se denominan DRB1*0301, DRB1*0302, DRB1*031101, DRB1*031102, etc.

Los genes que codifican el sistema de antígenos de leucocitos humanos (HLA) se encuentran entre los genes más variables en humanos, y cada variante codifica moléculas que se unen a un conjunto diferente de péptidos.

Dichos genes son los mismos en todas las células de un individuo particular, pero difieren de una persona a otra.

Aunque la variabilidad alélica de HLA se ha investigado en profundidad y se han descubierto algunos marcadores genéticos que permiten la realización de pruebas para evitar el rechazo de trasplante de órganos, solo existen datos menores no representativos que correlacionan la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos relacionados con los materiales implantados en el cuerpo humano.

Varios estudios han tratado de vincular muchas enfermedades autoinmunes o granulomatosas sistémicas con diferentes haplotipos de HLA (MHC), especialmente con los antígenos de Clase I y Clase II. Así, en el documento Di Lorenzo *et al.*, “Morphea after Silicone Gel Breast Implantation for Cosmetic Reasons in an HLA-B8, DR3-Positive Woman”, *Int. Arch Allergy Immunol* 1997, vol. 112, pp. 93-95, los autores describen un único paciente HLA-B8, DR3-positivo con morfea localizada después de implantación de mamas de gel de silicona. Los autores sugieren que existe un antecedente genético y que el haplotipo mencionado está implicado en la respuesta autoinmune, la cual podría estar propiciada por el bioimplante de silicona. Por otra parte, los autores consideran que los datos no apoyan una clara relación entre el haplotipo y los efectos observados, y que son necesarios más estudios. De hecho, este caso es uno de los pocos casos en los cuales el implante de silicona podría ser el causante de una reacción autoinmune, y no se puede atribuir significancia estadística al mismo.

La silicona utilizada como implante de relleno es un gel que consiste en siloxanos polimerizados. Aunque se emplea extensamente desde 1960, los efectos secundarios que se derivan de su uso como implante de relleno son más bajos en tipo y número de casos que los observados cuando se utilizan otros implantes de relleno como bioimplantes, tales como los asociados con el empleo de bioimplantes orgánicos, es decir, implantes de colágeno, ácido L-poliláctico, poliacrilamida, polialquilimida, ácido hialurónico, politetrafluoroetileno, metacrilato, así como el implante inorgánico hecho de microesferas de hidroxiapatita cálcica. Todos estos materiales tienen diferentes características estructurales, por lo que es deseable encontrar un patrón de referencia común que permita correlacionar la predisposición genética al rechazo de un implante o a desarrollar efectos secundarios adversos para todos los bioimplantes.

65 Resumen de la invención

Los inventores, sospechando que posiblemente, en un huésped predispuesto, las probabilidades en desarrollar diferentes trastornos de hipersensibilidad o inmunomediados de tipo IV pueden estar relacionados con una exposición

antigénica diversa y repetitiva, estudiaron ampliamente los genotipos de pacientes que presentaban efectos secundarios adversos severos (efectos adversos) después de la implantación de un material, esto es, de un bioimplante, tal como un implante de relleno dérmico o sub-dérmico.

5 La invención proporciona, en un primer aspecto, un método *in vitro* para el análisis de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos relacionados con materiales no metálicos implantados en el cuerpo, que comprende determinar en una muestra biológica de dicho individuo si el antígeno HLA-DRB1*3 del complejo mayor de histocompatibilidad está presente. La presencia de dicho antígeno es un indicativo de predisposición genética a desarrollar dichos efectos adversos relacionados con los biomateriales.

10 El método de la invención representa una solución para los problemas pendientes del estado de la técnica ya que permite al individuo y al médico considerar todos los factores antes de la aplicación en el cuerpo de materiales no metálicos, concretamente bioimplantes, tales como los implantes de relleno dérmicos o sub-dérmicos. Así, el método de la invención es un ensayo útil para detectar previamente, de manera inocua, la probabilidad de un individuo a desarrollar efectos secundarios adversos cuando se aplica un bioimplante a dicho individuo.

20 Un segundo aspecto de la invención es el empleo de un kit que comprende anticuerpos para determinar la presencia del antígeno HLA-DRB1*3 del complejo mayor de histocompatibilidad, para el análisis de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos relacionados con materiales no metálicos implantados en el cuerpo.

25 Otro aspecto de la invención es el empleo de un kit que comprende sondas de oligonucleótidos con secuencia específica (SSOP) para la genotipificación del alelo HLA-DRB1*3, o cualquier alteración en desequilibrio de enlace con el gen que codifica dicho antígeno, para el análisis de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos relacionados con materiales no metálicos implantados en el cuerpo.

30 Además, es también un aspecto de la invención el uso del antígeno HLA-DRB1*3, como marcador para el análisis de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos relacionados con materiales no metálicos implantados en el cuerpo.

Descripción detallada de las realizaciones de la invención

Se facilitan las siguientes definiciones a efectos de comprensión:

35 Los términos “efecto adverso” y “efecto secundario adverso” se utilizan como sinónimos en esta descripción y se refieren a cualquier efecto nocivo y/o indeseable que resulta de una medicación u otro tipo de intervención, tal como la cirugía. Se puede denominar “efecto secundario” a un efecto adverso cuando se considera que es secundario a un efecto principal o terapéutico.

40 Los términos “genotipificación” y “tipificación” se utilizan como sinónimos en esta descripción y se refieren a cualquier ensayo que revele los alelos específicos heredados por un individuo, lo cual es particularmente útil para situaciones en las que más de una combinación genotípica puede estar asociada a una misma sintomatología clínica.

45 En la presente descripción, el término “locus” significa la posición ocupada por cada gen HLA (p.ej., locus B de HLA). “Loci” (plural de locus) para los antígenos DR incluye DRA y DRB1-9.

50 El término “alelo” se refiere a una de las dos o más formas alternativas de un gen, que difiere en la secuencia genética y que da por resultado diferencias observables en el carácter hereditario (fenotipo), y que se encuentran en el mismo lugar en un cromosoma.

“Enlace” describe la tendencia de los genes, alelos, loci o marcadores genéticos a ser heredados conjuntamente por estar localizados en el mismo cromosoma. Se pueden determinar por recombinación porcentual entre los dos genes, alelos, loci o marcadores genéticos que están físicamente enlazados en el mismo cromosoma.

55 En el sentido de esta descripción, “alteración” del gen significa cualquier modificación estructural en la secuencia del nucleótido considerado como de tipo salvaje. Ejemplos de alteraciones pueden incluir polimorfismo de un único nucleótido, una supresión, inserción, sustitución o duplicación de uno o más nucleótidos, y una modificación química sobre un nucleótido (p.ej., metilación).

60 “Desequilibrio de enlace (DE)” o “asociación alélica” significa la asociación preferente de un alelo o marcador genético particular con un alelo o marcador genético específico en una localización cromosómica cercana más frecuentemente que la esperada al azar para cualquier frecuencia de alelo particular en la población. Por ejemplo, si el locus X tiene los alelos a y b, los cuales ocurren igualmente frecuentemente, y el locus unido Y tiene los alelos c y d, los cuales ocurren igualmente frecuentemente, se esperaría que el haplotipo ac ocurriera con una frecuencia de 0.25 en una población de individuos. Si ac ocurre más frecuentemente, entonces se considera que los alelos a y c están en desequilibrio de enlace. El desequilibrio de enlace puede resultar de la selección natural de una cierta combinación de alelos o porque un alelo se ha introducido en una población demasiado recientemente para haber alcanzado equilibrio (asociación aleatoria) entre alelos enlazados.

ES 2 372 506 A1

Un “haplotipo” es una combinación de alelos en múltiples loci que se transmiten conjuntamente en el mismo cromosoma. El haplotipo puede referirse a tan solo un locus o a un cromosoma entero, dependiendo del número de recombinaciones que han ocurrido entre un conjunto dado de loci.

5 El término “análisis de la predisposición genética” incluye la determinación de la probabilidad de un individuo a desarrollar un fenotipo específico debido a su carga genética inherente. En el caso de la invención, el término define la determinación de la probabilidad de desarrollar efectos secundarios adversos relacionados con bioimplantes debido a la dotación genética de cada individuo.

10 Un “marcador genético” o “marcador” es un gen o secuencia de ADN con una localización conocida en un cromosoma que puede ser utilizado para identificar células, individuos o especies. Se puede describir como una variación observable, que puede surgir debido a una mutación o alteración de los loci genómicos. Un marcador genético puede ser una secuencia corta de ADN, tal como una secuencia que conlleva un simple cambio de pares de bases (polimorfismo de nucleótido simple, SNP), o una secuencia larga, como minisatélites, translocaciones, o repeticiones de pares de bases.

15 Los términos “bioimplante” y “material no metálico implantado en el cuerpo” se utilizan como sinónimos en esta descripción. Se puede clasificar un implante como implante metálico (p.ej., fémur de titanio), implante cerámico (p.ej., hidroxiapatita), implante polimérico (p.ej., polialquilimida) o implante biológico (p.ej., toxina botulínica). Cuando en esta descripción se mencionan implantes no metálicos, se pretende que abarquen los implantes cerámicos, los implantes de material polimérico o los implantes biológicos. Los implantes cerámicos se consideran material no metálico inorgánico. Cuando se utiliza “material polimérico”, éste incluye todos los materiales poliméricos naturales o biológicos, tal como el colágeno, así como los materiales poliméricos sintéticos, tales como los implantes de polialquilimida. Los implantes pueden aplicarse en una zona amplia para sustituir o actuar en gran parte de un tejido, tal como el implante mamario de silicona. Otros implantes se aplican a una zona reducida. Cuando se aplican a zonas reducidas, la mayoría de dichos implantes son también referidos como implantes de relleno, conocidos asimismo como implantes de relleno dérmicos o sub-dérmicos. Ejemplos de implantes de relleno son el colágeno, ácido L-poliláctico, poliácridamida, polialquilimida, ácido hialurónico, politetrafluoroetileno y metacrilato. Otro implante de relleno ampliamente empleado es la hidroxiapatita cálcica.

20 Las áreas más comunes de aplicación de los implantes no metálicos (bioimplantes) incluyen las prótesis ortopédicas (especialmente maxilofaciales) reconstructivas, prótesis para aumento de mamas, prótesis cardíacas (válvulas cardíacas artificiales como la válvula de corazón Chitra), cutáneas y de la córnea.

25 Tal como se ha indicado anteriormente, el método de la invención comprende determinar si una muestra biológica de un individuo contiene el antígeno HLA-DRB1*3 del complejo mayor de histocompatibilidad, donde la presencia de al menos uno de los antígenos es indicativo de predisposición genética a desarrollar efectos adversos.

30 La determinación de la presencia del antígeno se puede llevar a cabo mediante varias técnicas. Así, una manera de determinar si el antígeno está presente en una muestra es mediante inmunoensayo con anticuerpos específicos frente a los epítomos del antígeno (proteínas) HLA-DRB1*3. Otras tecnologías, las cuales se describen ampliamente más abajo, se basan en la detección de la codificación de ADN o ARN para dicho antígeno, o sea, en detectar la presencia de los alelos que codifican HLA-DRB1*3, si es que hay alguno de ellos en una muestra de un individuo. La presencia de los alelos de interés se puede llevar a cabo usando ADN genómico o codificador, el cual se amplifica y luego se detecta por medio de sondas específicas. En términos generales, las técnicas incluyen aislar el contenido genómico o transcrito, principalmente del ADN de las células de una muestra, la amplificación posterior del locus o loci de interés, el cual o los cuales es/son detectados además por medio de sondas específicas. El locus o loci son finalmente identificados y correlacionados con un patrón de referencia. Dependiendo de la asociación de los cebadores y las sondas, las metodologías del ADN se clasifican como metodologías de baja resolución o metodologías de alta resolución. Las metodologías de alta resolución dan información con respecto al alelo específico de un grupo de alelos. Es decir, informan sobre la secuencia específica o subtipo de alelo, tal como HLA-DRB1*0322, HLA-DRB1*0323, HLA-B*0838, HLA-B*0839. Las metodologías de baja resolución permiten determinar si en una muestra está o están presentes un alelo de HLA-B*08 y/o el antígeno HLA-DRB1*03.

35 Así, en una realización preferida, el método comprende determinar la presencia del antígeno HLA-DRB1*3 por genotipificación del alelo de HLA-DRB1*3 contenido en la muestra de un individuo; o cualquier alteración en desequilibrio de enlace con los genes que codifican dichos antígenos. La genotipificación del alelo significa determinar la secuencia de ADN específica para el mismo. La detección de un alelo que codifique por el antígeno HLA-DRB1*3 del complejo mayor de histocompatibilidad, es indicativo de predisposición genética a desarrollar efectos adversos relacionados con materiales no metálicos implantados en el cuerpo.

40 En una realización preferida, el método comprende la genotipificación para determinar si una muestra biológica de dicho individuo contiene simultáneamente al menos un alelo del antígeno HLA-B8 y al menos un alelo del antígeno HLA-DRB1*3 del complejo mayor de histocompatibilidad, y que define un haplotipo que está siendo indicativo de predisposición genética a desarrollar efectos adversos relacionados con los materiales no metálicos implantados en el cuerpo.

ES 2 372 506 A1

El individuo es preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un humano. No obstante, el sistema HLA o, en términos generales, el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) en humanos tiene su conjunto equivalente de genes en la mayoría de vertebrados. Por lo tanto, aquellas secuencias genéticas entre especies diferentes que comparten un alto porcentaje de homología, es probable que lleven a los mismos efectos observados.

5 En otra realización preferida, el método comprende determinar la presencia del alelo del antígeno HLA-DRB1*3 seleccionado del grupo que consiste en: HLA-DRB1*03010101 (HLA00671), HLA-DRB1*03010102 (HLA03483), HLA-DRB1*030102 (HLA00672), HLA-DRB1*030103 (HLA00672), HLA-DRB1*030104 (HLA02830), HLA-DRB1*030105 (HLA02955), HLA-DRB1*030106 (HLA03061), HLA-DRB1*030107 (HLA03855), HLA-DRB1*030108 (HLA04577), HLA-DRB1*030109 (HLA04691), HLA-DRB1*030201 (HLA00673), HLA-DRB1*030202 (HLA00674), HLA-DRB1*0303 (HLA00675), HLA-DRB1*0304 (HLA00676), HLA-DRB1*030501 (HLA00677), HLA-DRB1*030502 (HLA01428), HLA-DRB1*030503 (HLA03765), HLA-DRB1*0306 (HLA00678), HLA-DRB1*0307 (HLA00679), HLA-DRB1*0308 (HLA00680), HLA-DRB1*0309 (HLA00681), HLA-DRB1*0310 (HLA00682), HLA-DRB1*031101 (HLA00683), HLA-DRB1*031102 (HLA04406), HLA-DRB1*0312 (HLA00684), HLA-DRB1*031301 (HLA01007), HLA-DRB1*031302 (HLA03684), HLA-DRB1*0314 (HLA01008), HLA-DRB1*0315 (HLA01087), HLA-DRB1*0316 (HLA01152), HLA-DRB1*0317 (HLA01153), HLA-DRB1*0318 (HLA01349), HLA-DRB1*0319 (HLA01432), HLA-DRB1*0320 (HLA01455), HLA-DRB1*0321 (HLA01501), HLA-DRB1*0322 8 HLA01557, HLA-DRB1*0323 (HLA01614), HLA-DRB1*0324 (HLA01687), HLA-DRB1*0325 (HLA01692), HLA-DRB1*0326 (HLA01868), HLA-DRB1*0327 (HLA01930), HLA-DRB1*0328 (HLA01933), HLA-DRB1*0329 (HLA02420), HLA-DRB1*0330 (HLA02603), HLA-DRB1*0331 (HLA02606), HLA-DRB1*0332 (HLA02827), HLA-DRB1*0333 (HLA02870), HLA-DRB1*0334 (HLA02886), HLA-DRB1*0335 (HLA02902), HLA-DRB1*0336 (HLA02996), HLA-DRB1*0337 (HLA03059), HLA-DRB1*0338 (HLA03067), HLA-DRB1*0339 (HLA03075), HLA-DRB1*0340 (HLA03370), HLA-DRB1*0341 (HLA03641), HLA-DRB1*0342 (HLA03749), HLA-DRB1*0343 (HLA03836), HLA-DRB1*0344 (HLA03842), HLA-DRB1*0345 (HLA03843), HLA-DRB1*0346 (HLA03844), HLA-DRB1*0347 (HLA03859), HLA-DRB1*0348 (HLA03869), HLA-DRB1*0349 (HLA04355), HLA-DRB1*0350 (HLA04386), HLA-DRB1*0351 (HLA04411), y HLA-DRB1*0352 (HLA04634).

30 En una realización también preferida, el método comprende determinar la presencia del alelo del antígeno HLA-B8 seleccionado del grupo que consiste en: HLA-B*080101 (HLA00146), HLA-B*080102 (HLA02219), HLA-B*080103 (HLA02400), HLA-B*080104 (HLA02853), HLA-B*080105 (HLA03034), HLA-B*080106 (HLA03449), HLA-B*080107 (HLA03939), HLA-B*080108 (HLA04210), HLA-B*080109 (HLA04221), HLA-B*080110 (HLA04504), HLA-B*0802 (HLA00147), HLA-B*0803 (HLA00148), HLA-B*0804 (HLA00149), HLA-B*0805 (HLA00150), HLA-B*0806 (HLA00151), HLA-B*0807 (HLA00974), HLA-B*0808N (HLA00975), HLA-B*0809 (HLA00976), HLA-B*0810 (HLA01082), HLA-B*0811 (HLA01193), HLA-B*081201 (HLA01230), HLA-B*081202 (HLA03935), HLA-B*081203 (HLA04186), HLA-B*0813 (HLA01352), HLA-B*0814 (HLA01418), HLA-B*0815 (HLA01535), HLA-B*0816 (HLA01641), HLA-B*0817 (HLA01654), HLA-B*0818 (HLA01701), HLA-B*0819N (HLA01717), HLA-B*0820 (HLA01752), HLA-B*0821 (HLA01772), HLA-B*0822 (HLA01917), HLA-B*0823 (HLA02132), HLA-B*0824 (HLA02142), HLA-B*0825 (HLA02252), HLA-B*0826 (HLA02308), HLA-B*0827 (HLA02406), HLA-B*0828 (HLA02490), HLA-B*0829 (HLA02496), HLA-B*0830N (HLA02591), HLA-B*0831 (HLA02762), HLA-B*0832 (HLA02771), HLA-B*0833 (HLA 02849), HLA-B*0834 (HLA03091), HLA-B*0835 (HLA03164), HLA-B*0836 (HLA03265), HLA-B*0837 (HLA03450), HLA-B*0838 (HLA03481), HLA-B*0839 (HLA03663), HLA-B*0840 (HLA03648), HLA-B*0841 (HLA03902), HLA-B*0842 (HLA03941), HLA-B*0843 (HLA04081), HLA-B*0844 (HLA04188), HLA-B*0845 (HLA04230), HLA-B*0846 (HLA04234), HLA-B*0847 (HLA04240), HLA-B*0848 (HLA04438), HLA-B*0849 (HLA04442), HLA-B*0850 (HLA04499), HLA-B*0851 (HLA04507), HLA-B*0852 (HLA04515), HLA-B*0853 (HLA04516), HLA-B*0854 (HLA04520), HLA-B*0855 (HLA04708), HLA-B*0856 (HLA04720), HLA-B*0857 (HLA04722), HLA-B*0858 (HLA04753), HLA-B*0859 (HLA04788), HLA-B*0860 (HLA04816), HLA-B*0861 (HLA04860).

50 Los alelos de los antígenos HLA-B8 y HLA-DRB1*3 identificados anteriormente son las secuencias oficiales (Versión de 1 de abril de 2010) aprobadas por el Comité de Nomenclatura de Factores para el Sistema HLA de la Organización Mundial de la Salud (OMS). La identificación entre paréntesis de cada alelo (HLAxxxxx) se refiere al número de acceso (IMGT/HLA Acc No.) de la secuencia que define cada alelo y registrado en la Base de Datos IMGT/HLA de las bases de datos EMBL/GenBank/DBJ.

55 En una realización preferida, la genotipificación se efectúa por amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR multiplex) con cebadores específicos, seguida de detección.

60 En una realización más preferida, la genotipificación se efectúa por PCR con oligonucleótidos de secuencia específica (PCR-SSO).

65 La genotipificación de HLA por la técnica de PCR se ha convertido en una alternativa a los métodos serológicos, la cual se utiliza extensamente en la práctica clínica. Los métodos de tipificación basados en la PCR más comúnmente usados son la PCR con cebadores de secuencia específica (PCR-SSP) y la PCR con oligonucleótidos de secuencia específica (PCR-SSO). En el método PCR-SSO, se prepara una membrana (en donde se inmoviliza el ADN amplificado por los cebadores específicos del gen HLA), y las sondas de oligonucleótidos específicos para el respectivo tipo de HLA se hibridan para la tipificación. Un ejemplo de la genotipificación de HLA por PCR-SSO es el procedimiento co-

ES 2 372 506 A1

mercial llevado a cabo con los kits de tipificación Lifecodes HLA-SSO para ser utilizados con la tecnología Luminex® (Lifecodes Molecular Diagnostics).

5 La mayoría de tecnologías utilizadas para analizar el contenido genómico de una muestra emplean el ADN de las células del individuo analizadas. No obstante, también se puede utilizar el ARN.

10 Alternativamente y tal como se ha expuesto anteriormente, el método de la invención puede ser realizado detectando la presencia de la proteína codificada por los alelos de interés. Esta clase de detección se efectúa principalmente con anticuerpos específicos. La detección con anticuerpos permite determinar si el antígeno HLA-DRB1*03 está presente en una muestra, lo cual ya resulta útil para el análisis de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos relacionados con los materiales no metálicos implantados en el cuerpo.

15 Aunque el ADN, ARN o proteínas para ser analizadas pueden prepararse utilizando cualquiera de los métodos conocidos a partir de cualquier tipo de muestra biológica, se prefiere una muestra de sangre, ya sea procedente de sangre total o de sangre de cordón umbilical. Otras muestras biológicas adecuadas incluyen tarjetas de papel impregnadas con sangre (stain cards), hisopos (escobillas) bucales, y orina.

20 Un ejemplo del método para la recogida y preparación de la muestra para ser analizada es el método QIAAmp® (Qiagen).

25 El método de la invención permite el análisis de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos relacionados con materiales no metálicos implantados en el cuerpo, siendo preferidos aquéllos que se vienen usando extensamente y que tienen una estructura química orgánica, tal como el colágeno, el ácido L-poliláctico, la poliácridamida, la polialquilimida, el ácido hialurónico, el politetrafluoroetileno y el metacrilato. Todos estos compuestos son implantes de material polimérico. Otro implante de material polimérico es el aceite de silicona (o silicona de grado médico).

30 Otro material para el cual el método también proporciona un análisis adecuado de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos, es el material inorgánico hidroxiapatita, siendo preferida la hidroxiapatita cálcica (usada extensamente en forma de microesferas). La hidroxiapatita cálcica es una clase de implante cerámico.

35 También se puede utilizar una mezcla de al menos dos de los citados materiales no metálicos para ser implantados en el cuerpo. La invención también proporciona un método para analizar la predisposición genética a desarrollar efectos adversos cuando se implantan más de uno de los materiales.

40 Aunque varios efectos secundarios adversos parecen ocurrir cuando se aplica un bioimplante a ciertos individuos, el método de la invención es particularmente útil para evitar (debido a un análisis "realizado con anticipación") los llamados efectos adversos de aparición tardía, los cuales en algunos casos son efectos secundarios severos con una evolución crónica. Por lo tanto, el método de la invención permite detectar con anticipación (antes de la implantación) la susceptibilidad de un individuo a presentar efectos secundarios adversos, lo cual resulta de gran interés. Por otra parte, el método completa un vacío en el estado de la técnica, y al mismo tiempo permite reducir casos putativos que habrían desarrollado, no inmediatamente pero quizás posteriormente y lentamente, condiciones patológicas críticas y severas.

45 Algunos de los efectos adversos relacionados con los materiales no metálicos implantados en el cuerpo se seleccionan del grupo que consiste en rechazo al implante, lipoatrofia, trastornos granulomatosos, inflamación de nódulos, induración, angioedema, sarcoidosis, trastornos inmunomediados sistémicos inflamatorios, sarcoidosis cutánea, pneumonitis, enfermedad por adyuvante humana y más de uno de dichos efectos adversos.

50 Algunos de los efectos adversos relacionados con los materiales no metálicos implantados en el cuerpo se seleccionan preferentemente entre rechazo al implante; lipoatrofia relacionada con terapia antirretroviral de alta intensidad que incluye los fármacos anti-proteasa (tal como la terapia antirretroviral administrada a pacientes de SIDA); reacciones granulomatosas tardías, incluyendo los granulomas derivados de diferentes causas; sarcoidosis; nódulos; induración cutánea; abscesos y pseudo-abscesos; fibrosis; angioedema; hipersensibilidad; pneumonitis; hepatitis; escleroderma; o miopatía idiopática inflamatoria, la mayoría de las mismos encuadrados como trastornos inmunomediados. Todos estos efectos adversos están correlacionados con la determinación en una muestra del alelo del antígeno HLA-DRB1*3.

60 En otra realización preferida, el antígeno HLA-DRB1*3 se emplea como marcador para el análisis de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos relacionados con materiales no metálicos implantados en el cuerpo.

65 Tal como se ha expuesto anteriormente, la determinación del marcador se efectúa preferiblemente por genotipificación y la determinación del haplotipo que queda definido por la presencia de al menos un alelo de HLA-B8 y/o la presencia de al menos un alelo de HLA-DRB1*3.

ES 2 372 506 A1

5 Cuando se proporcionan conjuntamente los medios apropiados para llevar a cabo el método de la invención, se obtiene un kit que es útil para el análisis de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos relacionados con materiales no metálicos implantados en el cuerpo. El kit puede comprender medios para llevar a cabo una PCR con oligonucleótidos de secuencia específica (PCR-SSO), incluyendo así los cebadores para la amplificación específica de alelos que codifican por el HLA-DRB1*3, para obtener los correspondientes amplicones (regiones de ADN amplificadas); sondas para el aislamiento y detección de los amplicones; y medios para interpretar los resultados obtenidos, tal como un patrón de referencia.

10 De la misma manera, el método de la invención se lleva a cabo utilizando cualquier otro kit conocido que comprende medios apropiados para determinar la presencia de un alelo de HLA-DRB1*3. Estos kits comprenden medios para efectuar la genotipificación del alelo de HLA-DRB1*3, o cualquier alteración en desequilibrio de enlace (DE) con el gen que codifica dicho antígeno.

15 Alternativamente, el kit utilizado en el método de la invención puede comprender medios apropiados para determinar la presencia de las proteínas, es decir, del antígeno HLA-DRB1*3. Medios apropiados incluyen cualquier anticuerpo específico para los antígenos y compuestos (anticuerpos secundarios, marcadores fluorescentes o radioisotópicos, etc) que permiten la detección de los complejos anticuerpo-antígeno.

20 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí descritas.

25 Ejemplos

Esta invención se basa en parte en el descubrimiento y caracterización de un nuevo locus de susceptibilidad para la predisposición a desarrollar efectos secundarios adversos después de la implantación de materiales no metálicos. Dicho locus es el de HLA-DRB1*3, o el haplotipo HLA-B8 HLA-DRB1*3, así como las proteínas (serotipos) derivadas de los genes de dichos loci.

Ejemplo A)

35 *Preparación de la muestra y resultados de la población analizada (n=245)*

Se efectuó una genotipificación de baja resolución de los alelos HLA-B y DRB1 de 245 pacientes y controles por métodos de sonda de oligonucleótidos con secuencia específica (SSOP) mediante tecnología de microesferas Luminex (Kits de tipificación Lifecodes HLA-SSO para su uso con Luminex[®], referencia y versión LC775IVD.11 (02/09); Tepnel Lifecodes Molecular Diagnostics - Stamford). Tal como se ilustra en la Tabla 1, algunos individuos manifestaron efectos adversos derivados de la inyección de un bioimplante, tal como un implante de relleno dérmico o sub-dérmico de naturaleza química orgánica o inorgánica.

45 El procedimiento de tipificación LIFECODES HLA-SSO se basa en la hibridación de un amplicón de PCR de cadena sencilla con sondas SSO. Las sondas pueden ser homologas a una secuencia exclusiva de un alelo o grupo de alelos del ADN amplificado. Las sondas hibridan con una región complementaria que puede o no estar presente en el amplicón. Se emplean también sondas de consenso homologas a secuencias presentes en todos los alelos de un locus, las cuales actúan como indicadores de éxito de los pasos de amplificación e hibridación. En la tipificación por el procedimiento LIFECODES HLA-SSO, las sondas se unen a microesferas Luminex[®] adaptadas para utilizarse con el Instrumento Luminex[®]. Se mezclan y se analizan conjuntamente varias poblaciones de microesferas Luminex[®], ya que cada población de microesferas se distingue por su color característico. Esta tecnología es ventajosa porque puede también utilizarse para cuantificar las cantidades relativas de productos de la PCR, lo que conduce a la determinación del fenotipo HLA de cada muestra (individuo).

55 *A.1. Extracción de ADN*

Se extrajo ADN de las muestras de sangre de los pacientes y controles; y se preparó utilizando el método QIAmp[®] (Qiagen, S.A.). El ADN aislado se conservó en TRIS 10 mM, pH 8.0-9.0, en agua libre de nucleasas. La concentración final de ADN estaba comprendida entre 10-200 ng/ μ l.

60 *A.2. Amplificación de ADN (PCR)*

Los componentes y cantidades de reacción para la amplificación de ADN fueron los siguientes:

- 65
- Mezcla de cebadores (LIFECODES Master Mix); 15 μ l
 - ADN genómico; hasta 200 ng

ES 2 372 506 A1

- Taq polimerasa recombinante; 0.5 μ l (2.5 U)
- Agua libre de nucleasas (Tepnel Lifecodes); hasta 50 μ l de volumen final.

5

La mezcla de cebadores incluye el tampón y los dNTP (nucleótidos) para efectuar la amplificación.

Las condiciones del ciclador térmico para la amplificación fueron las siguientes:

10

- 5 minutos a 95°C,

- 1 ciclo con los siguientes pasos: 95°C durante 30 segundos (s); 60°C durante 45 s; 72°C durante 45 s,

15

- 8 ciclos con los siguientes pasos: 95°C durante 30 segundos (s); 63°C durante 45 s; 72°C durante 45 s, y

- 32 ciclos a 72°C durante 15 minutos (min).

20

La amplificación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos del ciclador térmico PCR (Costar[®], No. 6509).

A.3. Hibridación de sondas y análisis de las muestras

25

Se añadió una alícuota de 5 μ l de producto de la PCR de cada locus específico a una placa de 96 pocillos del ciclador térmico (Costar[®], No. 6509), junto con una alícuota de 15 μ l de mezcla de sondas (LIFECODES HLA Probe Mix[®]). La placa se selló con película Microseal[®]. Las muestras se hibridaron de acuerdo con las condiciones de incubación siguientes:

- 97°C durante 5 min; 47°C durante 30 min; 56°C durante 10 min.

30

Una vez concluida la hibridación, se añadieron 170 μ l de una solución de estreptavidina-ficoeritrina (1:200) a cada pocillo. A continuación las muestras fueron transferidas a un Instrumento Luminex[®] que incluye el software necesario para interpretar los resultados, es decir, el patrón diana de sondas de cada muestra se comparó con la tabla diana de sondas suministrada con el kit.

35

40

La Tabla 1 muestra la genotipificación de todas las muestras analizadas tal como se ha expuesto anteriormente, y se correlaciona cada haplotipo con la presencia de efectos adversos relacionados con la aplicación de bioimplantes. La columna "bioimplante" se refiere al bioimplante o mezcla de bioimplantes aplicados a cada muestra. La columna "Observaciones y/o Efectos adversos" se refiere a la manifestación patológica observada y a algunas anotaciones médicas. Las muestras fueron individuos a los cuales se implantó un material no metálico. "S" significa sí; "N" significa no (y actúan como controles); "NI" significa nódulo inflamado; HLA-B* (1) es el alelo de tipo HLA-B heredado del progenitor (1); HLA-B* (2) es el alelo de tipo HLA-B heredado del progenitor (2); HLA-DRB*1 (1) es el alelo de tipo HLA-DRB*1 heredado del progenitor (1); HLA-DRB*1 (2) es el alelo de tipo HLA-DRB*1 heredado del progenitor (2).

45

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

Tabla 1: Correlación de los dos alelos de HLA-B y HLA-DRB1 de cada individuo con la aparición de efectos adversos.

MUESTRA	HLA-B* (1)	HLA-B* (2)	HLA-DRB1* (1)	HLA-DRB1* (2)	Presencia de Efectos adversos	Observaciones y/o Efectos adversos	Bioimplante
197	07	50	03	07	N		Silicona / Restylane® (Acido hialurónico) / Fibras de oro
31	07	35	04	15	N		Silicona
174	07	44	04	07	N		Restylane® (Acido hialurónico)
205	07	52	07	15	N		Silicona
206	07	52	07	15	N		Silicona
146	07	18	11	15	N		Acido hialurónico
109	08	14	01		N		Silicona
57	08	51	03	04	N		Acido hialurónico
147	08	40	03	04	N		Aquamid® (gel de poliacrilamida) / Radiesse® (Hidroxiapatita de calcio)
38	08	15	04	11	N		Silicona/ New Fill® (Acido poliáctico)
172	08	44	07		N		Acido hialurónico
186	08	14	13	16	N		Acido hialurónico
44	13	44	01	13	N		Silicona / Fibras de oro / Happy lift® (Copolimero de Polidioxanona-Poliáctico-Caprolactona-X)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

MUESTRA	HLA-B* (1)	HLA-B* (2)	HLA-DRB1* (1)	HLA-DRB1* (2)	Presencia de Efectos adversos	Observaciones y/o Efectos adversos	Bioimplante
170	15	35	01		N		Silicona
204	15		01	13	N		Goretex® (PTFE-politetrafluoroetileno) / Silicona /Aquamid® (gel de poliácridamida) / Acido hialurónico
226	15	44	03	04	N		Aquamid® (gel de poliácridamida)
62	15	40	04	13	N		Restylane® (Acido hialurónico)
21	15	45	04	12	N		Silicona
33	15	49	11	13	N		Silicona / Restylane® (Acido hialurónico)
149	18	35	01	11	N		Aquamid® (gel de poliácridamida) / Radiesse® (Hidroxiapatita de calcio)
181	18	53	03	13	N		Bioalcamid® (polialquilmida)
233	18	49	03	11	N		Acido hialurónico
150	18	49	11		N		Colágeno / Dermalive® (Acido hialurónico, Hidrogel acrílico) / Hylaform® (Acido hialurónico) Bioalcamid® (polialquilmida) / Sculptra® Acido poli-L-láctico)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

MUESTRA	HLA-B* (1)	HLA-B* (2)	HLA-DRB1* (1)	HLA-DRB1* (2)	Presencia de Efectos adversos	Observaciones y/o Efectos adversos	Bioimplante
138	27	44	01	15	N		Bioalcamid® (polialquilimida) / Aquamid® (gel de poliacrilamida)
25	35	51	01	12	N		Silicona
202	35	44	03	13	N		Silicona / Restylane® (Acido hialurónico)
3	35	51	03	07	N		Silicona
65	35	58	04	13	N		Silicona
232	35	41	04	13	N		Aquamid® (gel de poliacrilamida)
37	35	44	07	11	N		Silicona / Fibras de oro
143	35	51	07		N		Aquamid® (gel de poliacrilamida)
180	35	44	11		N		Silicona
159	38	45	01	04	N		Silicona
139	38	51	11	13	N		Aquamid® (gel de poliacrilamida)
58	39	41	13	14	N		Bioalcamid® (polialquilimida)
179	40	44	07	11	N		Restylane® (Acido hialurónico)
105	44	56	01	07	N		Achyal® (Acido hialurónico / Silicona / Restylane® (Acido hialurónico))
24	44	50	01	11	N		Silicona
127	44		07	09	N		Restylane® (Acido hialurónico) / Achyal® (Acido hialurónico)
160	44		07		N		Silicona

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

MUESTRA	HLA-B* (1)	HLA-B* (2)	HLA-DRB1* (1)	HLA-DRB1* (2)	Presencia de Efectos adversos	Observaciones y/o Efectos adversos	Bioimplante
196	45		07	15	N		Silicona
79	49	51	04	10	N		Colágeno / Dermalive® (Acido hialurónico, Metacrilato) / New Fill® (Acido poliiláctico) / Acido hialurónico
98	49	50	04	15	N		Restylane® (Acido hialurónico)
141	49	50	13		N		Aquamid® (gel de poliacrilamida)
207	51	67	01	03	N		Radiesse® (Hidroxiapatita de calcio)
194	07	14	01	15	S	granulomas	Acido L-poliiláctico
236	07	53	01	15	S		Silicona
134	07	44	04	11	S	Reactividad baja	Bioalcamid® (polialquilimida)
135	08	37	01	14	S	Nódulo inflamado (NI).	Acido hialurónico
241	08	13	01	03	S	Granulomas	Aquamid® (poliacrilamida gel)
4	08	39	03		S	Vasculitis	Restylane® (Acido hialurónico)
10	08	44	03	15	S	Actividad residual / inflamación nódulo	Dermalive® (Acido hialurónico, Metacrilato)
157	08	57	03	07	S	Nódulo inflamado	Restylane® (Acido hialurónico)
168	08	44	03	15	S	Nódulo inflamado / induración cutánea	Artecoll® (polimetilmetacrilato, colágeno) / Silicona
171	08	44	03	07	S	Granuloma activo	Bioalcamid®

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

MUESTRA	HLA-B* (1)	HLA-B* (2)	HLA-DRB1* (1)	HLA-DRB1* (2)	Presencia de Efectos adversos	Observaciones y/o Efectos adversos	Bioimplante
220	08	14	03		S	Granulomas severos aunque se sigue tratamiento de corticoides	(polialquilimida) Bioalcamid® (polialquilimida)
1	08	14	03	15	S	Síndrome de sequedad /granulomas/angioedema	Bioalcamid® (polialquilimida)
223	08	27	03	08	S	NI/pseudoabscesos	Aquamid® (polialquilimida gel)
240	08	14	03	07	S	NI (luz)	Aquamid® (polialquilimida gel)
238	13	35	04	13	S	Granulomas aunque se sigue tratamiento con corticoides	Bioalcamid® (polialquilimida)
234	13	44	07		S	Induración/angioedema	Silicona
13	13	49	13	16	S	Sin reactividad a silicona 12 años antes	Dermalive® (Acido hialurónico, Hidrogeel acrílico)
11	14	44	07	12	S		Bioalcamid® (polialquilimida)/colágeno
235	15	44	01	09	S		Silicona
239	15	44	04	11	S		Silicona
163	15	51	07	11	S	NI	Silicona
208	15	18	11	15	S	Reacción facial aguda después de segunda implantación	Sculptra® (ácido L-polláctico)
222	15	41	13		S	Granulomas/Induración	Acido hialurónico
101	18		03		S	Granulomas/Induración	Bioalcamid® (polialquilimida)
209	18	40	03	04	S	Requerida extirpación quirúrgica	Dermalive® (Acido hialurónico, Metacrilate)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

MUESTRA	HLA-B* (1)	HLA-B* (2)	HLA-DRB1* (1)	HLA-DRB1* (2)	Presencia de Efectos adversos	Observaciones y/o Efectos adversos	Bioimplante
244	18	51	03	04	S	Requerida extirpación quirúrgica	Bioalcamid® (polialquilimida)
111	18	52	11	13	S		Silicona
68	35	51	01	04	S	Sarcoidosis recurrente (remitente)	Dermalive® (Acido hialurónico, Metacrilato)/ Ac. poliláctico
41	35	39	04		S	Reacción aguda	Silicona
169	35	39	04		S	Actividad fluctuante	Silicona
5	35	44	07		S	Actividad residual	Bioalcamid® (polialquilimida e)
219	35	44	07	09	S	NI	Aquamid® (polialquilimida gel)
162	35	44	13		S	NI	Silicona
2	38	44	11	13	S	Recesivo	Dermalive® (Acido hialurónico, Metacrilato)
158	38	44	11	13	S	NI y pruritis	Silicona
242	38	39	14		S		Silicona
28	39	40	03	16	S	Granuloma recesivo	Dermalive® (Acido hialurónico, Metacrilato)
43	40	44	07	12	S	Granuloma silencioso	Bioalcamid® (polialquilimida)
136	40	44	11	14	S		Outline Ultra® (Acido hialurónico)
137	44		01	07	S		Silicona
100	44	52	03	11	S		Restylane® (Acido hialurónico)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

MUESTRA	HLA-B* (1)	HLA-B* (2)	HLA-DRB1* (1)	HLA-DRB1* (2)	Presencia de Efectos adversos	Observaciones y/o Efectos adversos	Bioimplante
36	44	51	04	07	S	Granuloma	Bioalcamid® (polialquilimida) / Aquamid® (poliacrilamida gel) / Evolence® (Colágeno)
140	44	51	12	14	S	Granuloma posttraumático no activo	Silicona
70	44	52	13	14	S	NI	Dermaive® (Acido hialurónico, Metacrilato)
40	49	55	04		S	Prótesis mamaria 10 años más tarde/ (NI/induración)	Metacrilato
8	51		01	04	S	Recesivo	Silicona
245	51	57	04	15	S	Granulomas	Bioalcamid® (polialquilimida)

ES 2 372 506 A1

De la Tabla 1 se deduce que utilizando el test predictivo o el método de la invención, los efectos adversos de aparición tardía y algunos efectos adversos inmediatos relacionados con los bioimplantes, concretamente, con los implantes de relleno dérmicos y sub-dérmicos, se podrían prevenir en el 30-40% de los individuos que optaron por la implantación de biomateriales. En otras palabras, la probabilidad de desarrollar un efecto adverso es mayor en un individuo que incorpora al menos un alelo del antígeno HLA-DRB1*3.

Más concretamente, la incidencia de un efecto adverso de aparición tardía relacionado con un bioimplante es 600 veces mayor en individuos que incorporan el haplotipo definido por la presencia simultánea de un alelo de HLA-B8 y un alelo de HLA-DRB1*3 (haplotipo HLA-B8/HLA-DRB1*3). El riesgo relativo (rr) que representa ser portador de un alelo de los antígenos descritos frente al riesgo relativo cuando se presenta el haplotipo HLA-B8/HLA-DRB1*3 es de 1 a 5.9 (rr=1 vs. rr=5.9).

Todos los datos de la Tabla 1 fueron analizados estadísticamente por la prueba exacta de Fisher (2 colas) con un intervalo de confianza del 95%. Las muestras que contienen el haplotipo HLA-B8/HLA-DRB1*3 revelaron un valor para el cociente de probabilidades de 5.81 y la prueba exacta de Fisher fue inferior a 0.02.

Entonces, aunque la presencia del haplotipo HLA-B8/HLA-DRB1*3 implica un mayor riesgo de desarrollar efectos adversos relacionados con los bioimplantes, la presencia de al menos un único alelo de HLA-DRB1*3 tiene que ser considerado también como un factor de riesgo, de acuerdo con los datos de la Tabla 1.

De la Tabla 1 también se puede deducir que algunos efectos adversos de aparición tardía pueden ser desarrollados con correlación a un haplotipo diferente del de HLA-B8 y HLA-DRB1*3. Estos casos no pueden ser detectados con el método de la invención y requieren estudios adicionales.

En una forma más detallada, la Tabla 1 muestra los efectos secundarios adversos detectados. Las reacciones granulomatosas tardías se han relacionado con los implantes de colágeno, silicona, ácido L-poliláctico, poliacrilamida, polialquilimida, ácido hialurónico, politetrafluoroetileno (Gore-Tex®) y metacrilato. Se ha descrito el mismo tipo de reacciones adversas con el empleo de combinaciones de metacrilato-colágeno (Artecoll®) o etilmetacrilato-hialurónico (Dermalive®). También se han reportado diferentes reacciones adversas tardías a la polialquilimida. Se han descrito incluso granulomas histológicos diferentes y específicos relacionados con el ácido hialurónico (HA-AH, Dermalive®), el metacrilato-colágeno (Artecoll®), el ácido poliláctico (New-Fill®), la silicona y la poliacrilamida (Aquamid®). La capacidad de los bioimplantes de inducir efectos adversos inmunomediados en humanos puede estar relacionada con las características biológicas del individuo y la composición química de los mismos bioimplantes. Es conocido que todos los bioimplantes pueden, *in vitro*, provocar una reacción de tipo cuerpo extraño inmunomediada primaria, basada en la activación de los macrófagos y la posible inducción de la respuesta de las células T. En teoría y en lo que se refiere al desarrollo de granulomas, el desarrollo gradual de la estructura de las fibras de colágeno alrededor de las partículas de bioimplantes parece coincidir con una disminución de la reacción inflamatoria a los mismos. Sin embargo, los llamados granulomas estables pueden evolucionar a una respuesta granulomatosa anormal progresiva debido a los bioimplantes, como por ejemplo los implantes de relleno dérmicos o sub-dérmicos. Algunas veces y según se ha indicado, los efectos indeseables aparecen durante un traumatismo menor o después de una infección. Existe la hipótesis de que los propios y específicos antecedentes genéticos deben jugar un papel importante en el desarrollo de dichas reacciones adversas.

Ejemplo B)

Caso clínico

Un paciente de 60 años que presentaba antecedentes atópicos y posible hipersensibilidad a fármacos, y que deseaba ser tratado por un cirujano para mejorar las arrugas de la cara, fue sometido en primer lugar a análisis por medio del método de la presente invención. La finalidad fue determinar si el paciente era susceptible al rechazo de implantes (implante de relleno sub-dérmico) o a desarrollar efectos secundarios adversos. El implante de relleno seleccionado sería el ácido hialurónico. Después de efectuar un análisis rutinario (determinación de ANA, CH50, C4, proteínograma) y después del ensayo experimental del haplotipo de HLA-B y HLA-DRB1 (mediante los kits de tipificación Lifecodes HLA-SSO para su uso con Luminex®, LC775IVD. 11(02/09) (Tepnel Lifecodes Molecular Diagnostics - Stamford), se determinó que el paciente presentaba el siguiente haplotipo: HLA-B*08 y HLA-DRB1*03. El cirujano rehusó inyectar el implante de relleno de ácido hialurónico y procedió solamente a efectuar un "lifting" facial.

Ejemplo C)

Otros casos clínicos

C1. Un paciente de 45 años solicitó atención médica debido a la aparición de nódulos faciales, lesiones cutáneas y síndrome seco, 18 meses después de la colocación de implantes faciales (inyección con implante de relleno) de ácido hialurónico y metacrilato. El análisis de sangre reveló hipergammaglobulinemia, elevación de reactantes de fase aguda, así como valores altos de la enzima convertidora de angiotensina. Después del ensayo experimental del haplotipo de HLA-B y HLA-DRB1 procedente de torundas (escobillas) bucales, se determinó que el paciente presentaba el siguiente haplotipo: HLA-B*08 y HLA-DRB1*03 (mediante el kit de tipificación Lifecodes HLA-SSO para su uso con Luminex®, LC775IVD.11(02/09) (Tepnel Lifecodes Molecular Diagnostics - Stamford). El paciente fue debida-

mente informado del alto riesgo de desarrollar efectos adversos en caso de que fueran utilizados nuevos bioimplantes (inyección con implante de relleno).

5 C2. Se sometió a análisis un paciente que fue derivado del especialista dermatólogo con objeto de determinar el posible riesgo de efectos adversos de aparición tardía relacionados con los bioimplantes. El paciente parecía haber desarrollado una reacción adversa previa en el rostro después de la inyección de colágeno y metacrilato. Después de determinarse experimentalmente, tal como se ha efectuado en el Ejemplo B, el haplotipo de HLA-B y HLA-DRB1 a partir de una muestra de de sangre, se determinó que el paciente presentaba el siguiente haplotipo: HLA-B*08 y HLA-DRB1*03. El paciente fue debidamente informado del alto riesgo de desarrollar efectos adversos en el caso de que utilizara de nuevo bioimplantes (implantes de relleno). Asimismo, el cirujano fue informado y desestimó la inyección de cualquier implante de relleno. Sin embargo, el paciente consultó a otro especialista que accedió a inyectar el implante de relleno de ácido hialurónico. Tres meses después de la inyección del implante de relleno, se observó un proceso inflamatorio severo en la primera y segunda zonas del rostro tratadas.

15 Según el leal saber y entender de los inventores, hasta la fecha no se han reportado datos estadísticos significativos que correlacionen la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos relacionados con los materiales implantados en el cuerpo. Ello puede ser debido a que las empresas que comercializan los bioimplantes han guardado silencio sobre el riesgo de efectos secundarios derivados de los implantes, o simplemente porque la mayoría de los efectos secundarios son efectos adversos de aparición tardía, difíciles de ser correlacionados inmediatamente con la colocación de un biomaterial, realizada dicha colocación algunos años atrás.

20 Merece especial énfasis el hecho que en todos los individuos estudiados (pacientes o controles), no se detectaron anticuerpos reactivos al bioimplante. Así, las reacciones inflamatorias y los trastornos inmunológicos observados no son debidos a un patrón de reacción autoinmune. De la misma manera, no se han detectado en las muestras auto-anticuerpos específicos dirigidos a los diferentes bioimplantes, como por ejemplo implantes de relleno. Además, las biopsias observadas en el caso de los efectos secundarios adversos relacionados con los bioimplantes son bastante diferentes de las observadas en las derivadas de enfermedades autoinmunes. Normalmente, el patrón histopatológico observado en estas biopsias procedentes de individuos con efectos secundarios adversos es característico de la reacción de hipersensibilidad tipo IV (Clasificación de Gell y Coombs). Así, se demuestra la implicación de las células T más que de las células B. No obstante, la evolución de la inflamación a un estado crónico podría producir el desarrollo o “despertar” de trastornos autoinmunes, tal como vasculitis, polimiositis, síndrome de Sjögren, etc. Se pueden evitar estos trastornos severos cuando se efectúa el método de la invención para un individuo a quién se ha sugerido recibir un bioimplante (implante de material no metálico).

35 El método de la invención resulta del primer ensayo significativamente estadístico que correlaciona un haplotipo o la presencia de unos alelos del sistema HLA, o la presencia de las proteínas (antígenos) codificadas por los alelos, con el riesgo de desarrollar efectos adversos después de la implantación de un biomaterial. Aunque y, afortunadamente, la prevalencia de los efectos adversos relacionados con los bioimplantes es baja, la aparición de dichos efectos adversos puede ser realmente severa. Así, el método de la invención es importante porque permite la discriminación de un tratamiento quirúrgico o cosmético que podría conducir al desarrollo de efectos adversos severos, contrario a la propia finalidad del tratamiento.

45 Por tanto, la presente invención proporciona por primera vez datos estadísticos significativos que asocian un haplotipo específico con la susceptibilidad o predisposición de un individuo a desarrollar efectos adversos (de aparición tardía o inmediatos) derivados de materiales implantados en el cuerpo, principalmente implantes de relleno dérmicos y sub-dérmicos.

Referencias citadas en la solicitud

50 - Di **Lorenzo** *et al.*, “Morphea after Silicone Gel Breast Implantation for Cosmetic Reasons in an HLA-B8, DR3-Positive Woman”, *Int. Arch Allergy Immunol* 1997. vol. 112, pp. 93-95.

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método *in vitro* para el análisis de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos relacionados con materiales no metálicos implantados en el cuerpo, que comprende determinar, en una muestra biológica de dicho individuo, la presencia del antígeno HLA-DRB1*3 del complejo mayor de histocompatibilidad; y donde la presencia de dicho antígeno es indicativa de predisposición genética a desarrollar dichos efectos adversos.

10 2. Método según la reivindicación 1, donde la determinación de la presencia del antígeno HLA-DRB1*3 se lleva a cabo por genotipificación del alelo de HLA-DRB1*3; o cualquier alteración en desequilibrio de enlace con el gen que codifica dicho antígeno.

15 3. Método según la reivindicación 2, donde el alelo del antígeno HLA-DRB1*3 se selecciona del grupo que consiste en: HLA-DRB1*03010101, HLA-DRB1*03010102, HLA-DRB1*030102, HLA-DRB1*030103, HLA-DRB1*030104, HLA-DRB1*030105, HLA-DRB1*030106, HLA-DRB1*030107, HLA-DRB1*030108, HLA-DRB1*030201, HLA-DRB1*030202, HLA-DRB1*0303, HLA-DRB1*0304, HLA-DRB1*030501, HLA-DRB1*030502, HLA-DRB1*030503, HLA-DRB1*0306, HLA-DRB1*0307, HLA-DRB1*0308, HLA-DRB1*0309, HLA-DRB1*0310, HLA-DRB1*031101, HLA-DRB1*031102, HLA-DRB1*0312, HLA-DRB1*031301, HLA-DRB1*031302, HLA-DRB1*0314, HLA-DRB1*0315, HLA-DRB1*0316, HLA-DRB1*0317, HLA-DRB1*0318, HLA-DRB1*0319, HLA-DRB1*0320, HLA-DRB1*0321, HLA-DRB1*0322, HLA-DRB1*0323, HLA-DRB1*0324, HLA-DRB1*0325, HLA-DRB1*0326, HLA-DRB1*0327, HLA-DRB1*0328, HLA-DRB1*0329, HLA-DRB1*0330, HLA-DRB1*0331, HLA-DRB1*0332, HLA-DRB1*0333, HLA-DRB1*0334, HLA-DRB1*0335, HLA-DRB1*0336, HLA-DRB1*0337, HLA-DRB1*0338, HLA-DRB1*0339, HLA-DRB1*0340, HLA-DRB1*0341, HLA-DRB1*0342, HLA-DRB1*0343, HLA-DRB1*0344, HLA-DRB1*0345, HLA-DRB1*0346, HLA-DRB1*0347, HLA-DRB1*0348, HLA-DRB1*0349, HLA-DRB1*0350, HLA-DRB1*0351, y HLA-DRB1*0352.

20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, donde la genotipificación se efectúa por amplificación mediante PCR múltiple seguida de detección.

30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la muestra biológica es una muestra de sangre.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el material no metálico implantado en el cuerpo es un material polimérico.

35 7. Método según la reivindicación 6, donde el material polimérico se selecciona del grupo que consiste en colágeno, ácido L-poliláctico, poliacrilamida, polialquilimida, ácido hialurónico, politetrafluoroetileno, metacrilato, silicona y mezclas de los mismos.

40 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde los efectos adversos relacionados con los materiales no metálicos implantados en el cuerpo se seleccionan del grupo que consiste en rechazo al implante, lipoatrofia, trastornos granulomatosos, inflamación de nódulos, induración, angioedema, sarcoidosis, trastornos del sistema inmune mediado sistémico, sarcoidosis cutánea, pneumonitis, enfermedad por adyuvante humana y más de uno de dichos efectos adversos.

45 9. Uso de un kit que comprende anticuerpos específicos para determinar la presencia del antígeno HLA-DRB1*3 del complejo mayor de histocompatibilidad, para el análisis de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos relacionados con materiales no metálicos implantados en el cuerpo.

50 10. Uso de un kit que comprende sondas de oligonucleótidos con secuencia específica (SSOP) para efectuar la genotipificación del alelo de HLA-DRB1*3, o cualquier alteración en desequilibrio de enlace con el gen que codifica dicho antígeno, para el análisis de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos relacionados con materiales no metálicos implantados en el cuerpo.

55 11. Uso del antígeno HLA-DRB1*3, como marcador para el análisis de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos relacionados con materiales no metálicos implantados en el cuerpo.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130348

②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.04.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	NOJIMA M. et al. Significant Effect of HLA-DRB1 Matching on Acute Rejection of Kidney Transplants Within 3 Months. Transplantations Proceedings. 2001. Volumen 33, páginas 1182-1184, todo el documento.	1-11
A	TORRES MJ. & PEREZ RODRIGUEZ JC. Los nuevos conocimientos sobre las moléculas HLA de clase II y una mejor asignación de los órganos para trasplante. Nefrología. 2002. Volumen 22(1), páginas 4-8, todo el documento.	1-11
A	WO 9738310 A1 (THE TRUSTEES OF COLOMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK) 16.10.1997, resumen; reivindicaciones 1-3.	1-11
A	REINHARD T et al. Improvement of graft prognosis in penetrating normal-riskkeratoplasty by HLA class I and II matching. Eye. 2004. Volumen 18, páginas 269-277, página 269, resumen.	1-11

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
29.12.2011

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

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

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, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE ACADEMICO.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.12.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	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	NOJIMA M. et al. Transplantations Proceedings. 2001. Volumen 33, páginas 1182-1184.	2001
D02	TORRES MJ. & PEREZ RODRIGUEZ JC. Nefrología. 2002. Volumen 22(1), páginas 4-8, todo el documento.	2002
D03	WO 9738310 A1	16.10.1997
D04	REINHARD T et al. Eye. 2004. Volumen 18, páginas 269-277	2004

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

La presente invención divulga un método in vitro para el análisis de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos a materiales no metálicos implantados en su cuerpo, mediante la determinación de la presencia del antígeno HLA-DRB1*3 del MHC en una muestra biológica de dicho individuo (reivindicaciones 1-8). Reivindica también el uso de un kit, que contiene anticuerpos específicos para HLA-DRB1*3, así como su uso como marcador genético (reivindicaciones 9-10).

El documento D01 divulga un estudio sobre el efecto de la variabilidad alélica de la molécula HLA-DRB1 en el riesgo de rechazo agudo durante los 3 meses posteriores a un trasplante de riñón (ver todo el documento).

El documento D02 divulga una actualización sobre las moléculas HLA de clase II y su relación con el rechazo a un órgano trasplantado (ver todo el documento).

El documento D03 divulga un método para monitorización de un rechazo a un injerto alogénico, mediante la incubación, de linfocitos, obtenidos de sangre periférica, con al menos un alo péptido sintético que corresponde a un epítipo inmunogénico del antígeno HLA-DR, para determinar la existencia de células T activadas (ver resumen; reivindicaciones 1-3).

El documento D04 divulga los progresos realizados en el pronóstico de un trasplante perforante de córnea por compatibilidad alélica de antígenos leucocitarios humanos HLA clase I y II, no mostrando rechazo al injerto en un grupo homogéneo de pacientes que presentan un nivel de riesgo normal (ver página 269, resumen).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

El objeto técnico de la presente solicitud es un método in vitro para el análisis de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos a bioimplantes, mediante la determinación de la presencia del antígeno HLA-DRB1*3, en una muestra biológica.

1.1. REIVINDICACIONES 1-11

La relación entre la compatibilidad de las moléculas HLA de clase II y la predisposición a presentar rechazo a un trasplante en humanos es conocida en el estado de la técnica. Los documentos D01-D04 se refieren a ello y, el D01 explícitamente a la molécula HLA-DRB1. Sin embargo, el método de la presente invención difiere de los anteriores, en que solo considera necesario la determinación de la presencia del alelo HLA-DRB1*3, en una muestra biológica, para analizar la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos a bioimplantes, lo que supone una ventaja técnica y una mejora considerablemente respecto a lo divulgado en el estado de la técnica.

En consecuencia, según lo divulgado en los documentos D01-D04, las reivindicaciones 1-11 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986).