

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 052**

21 Número de solicitud: 201530262

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

27.02.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.06.2015

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA FORMACIÓN E
INVESTIGACIÓN SANITARIAS DE LA REGIÓN DE
MURCIA (100.0%)**

**C/ Luis Fontes Pagán, Nº 9, 1ª pl. Edif. Emi,
Hospital Universitario Reina Sofía
30003 Murcia ES**

72 Inventor/es:

**LEGAZ PÉREZ, Isabel;
ÁLVAREZ LÓPEZ, María Del Rocío y
MINGUELA PURAS, Alfredo**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **Procedimiento para la predicción de cirrosis hepática alcohólica no vírica en un sujeto**

57 Resumen:

La presente invención es un procedimiento para la predicción de cirrosis hepática no vírica en un sujeto, que comprende la detección de la presencia del gen KIR2DS5 en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto, la comparación del resultado de la detección anterior con un control y la evaluación de su predisposición genética a desarrollar cirrosis hepática no vírica a partir de la comparación anterior. El método resulta una herramienta muy útil para definir un factor de riesgo que permite predecir si un sujeto que consume alcohol va a tener una respuesta inmunitaria inadecuada para protegerle frente al desarrollo de fibrosis y su deriva hacia cirrosis alcohólica no asociada infección viral.

ES 2 537 052 A1

DESCRIPCIÓN

**PROCEDIMIENTO PARA LA PREDICCIÓN DE CIRROSIS HEPÁTICA
ALCOHÓLICA NO VÍRICA EN UN SUJETO**

5 **SECTOR TÉCNICO**

La invención se encuadra en el campo médico del diagnóstico y pronóstico de cirrosis alcohólica en pacientes humanos con hábito etanólico sin infección viral concomitante, asociado a la prevención de la enfermedad.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los genes de los receptores de células asesinas naturales (NK) semejantes a inmunoglobulina (KIR) han sido recientemente relacionados con la respuesta al trasplante de médula ósea, asignándoles un papel en el efecto anti-leucémico (Babor
15 F, Fischer JC, Uhrberg M. "The role of KIR genes and ligands in leukemia surveillance". Front Immunol. 2013. 7; 4:27). También, con algunos tipos de trasplante de órganos y con la predisposición a padecer infecciones por virus de la hepatitis C o enfermedades autoinmunitarias (Zhou H et al., "Donor selection for killer
20 immunoglobulin-like receptors B haplotype of the centromeric motifs can improve the outcome after HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation". Biol Blood Marrow Transplant. 2014; 20 (1):98-105).

KIR son un grupo de receptores de membrana codificados por una familia de genes polimórficos situados dentro del Complejo de Receptores Leucocitarios (LCR) del
25 cromosoma 19. Estos genes codifican receptores de membrana con función tanto de inhibidores como activadores. Se expresan en la superficie de las células NK y en subpoblaciones de linfocitos T γ y T δ . Los receptores KIR modulan la actividad de las células NK o T a través de la interacción con sus ligandos específicos que son las moléculas de HLA de clase I (Vilches C et al. "Facilitation of KIR genotyping by a PCR-
30 SSP method that amplifies short DNA fragments. Tissue Antigens. 2007; 70 (5):415-22).

El gen activador KIR2DS5 ha sido recientemente relacionado con la susceptibilidad a artritis reumatoide (Chandran V et al. "Killer-cell immunoglobulin-like receptor gene
35 polymorphisms and susceptibility to psoriatic arthritis". Rheumatology (Oxford). 2014;

53 (2) :233-9, en contraposición con la protección frente a la trombocitopenia de origen inmunitario. No existe en la técnica un ligando conocido para los receptores codificados por este gen (Nowak I et al. "Does the KIR2DS5 gene protect from some human diseases?" PLoS One. 2010.26;5 (8). Tampoco se han relacionado los genes
5 KIR con el hábito etanólico que lleva a desarrollar cirrosis alcohólica.

La ingesta mantenida de alcohol en el tiempo tiene como consecuencia la aparición de fibrosis hepática, que precede a una cirrosis. Si en esta etapa fibrótica el paciente deja de tomar alcohol el hígado pone en marcha distintos mecanismos de
10 regeneración, mientras que si el consumo persiste el proceso se cronifica y sólo puede ser tratado mediante trasplante hepático. En definitiva el daño hepático por alcohol sólo se puede revertir con la abstinencia etanólica en las etapas iniciales. En la actualidad, la cirrosis alcohólica se diagnostica por la anamnesis y declaración del paciente sobre consumo habitual de alcohol, exploración física, pruebas bioquímicas
15 (bilirrubina, AST/ALT, GGT, etc.), por pruebas de imagen (Fibroscan) y sobre todo por biopsia hepática como método de referencia para determinar el grado de fibrosis. El gran inconveniente de la biopsia es que es una técnica de carácter invasivo. Todas estas técnicas sirven únicamente para el diagnóstico una vez establecida la cirrosis y ninguna supone un factor precoz de riesgo que pueda ser aprovechado para prevenir
20 la enfermedad.

Por el contrario, el método de la presente invención sí identifica KIR2DS5 como un factor de riesgo para la susceptibilidad a la cirrosis alcohólica no asociada a virus, cuya detección puede ser usada para recomendar la abstinencia etanólica.
25

La hepatitis por virus C puede también conducir a cirrosis, pero en este caso el diagnóstico se realiza por la presencia del virus y la cuantificación de la carga viral mediante inmunoensayo. Este método no es aplicable al diagnóstico de cirrosis alcohólica no infectada por virus. En algunos pacientes la cirrosis por virus C se asocia
30 también al consumo de alcohol pero no con KIR2DS5. Así pues, la presente invención sirve para discriminar ambos tipos de cirrosis precisamente porque KIR2DS5 no reasocia a cirrosis alcohólica producida por infección viral sino que es un factor altamente asociado a la cirrosis puramente alcohólica sin infección viral concomitante, como se muestra en la presente solicitud.

35

El problema de la técnica es encontrar un biomarcador de cirrosis hepática alcohólica no asociada a virus, con valor predictivo fiable y detección no invasiva. La solución propuesta por la presente invención es determinación de la presencia del gen KIR2DS5 en el genoma del paciente.

5

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención es un procedimiento para la predicción de cirrosis hepática alcohólica no vírica en un sujeto, que comprende la detección de la presencia del gen KIR2DS5 en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto, la comparación del resultado de la detección anterior con un control y la evaluación de su predisposición genética a desarrollar la enfermedad a partir de la comparación anterior. En un aspecto más restrictivo, la invención consiste en el procedimiento anterior.

15 La invención es capaz de predecir que KIR2DS5 es un factor de riesgo determinante de la probabilidad de desarrollo de cirrosis alcohólica no vírica, producida sólo por el consumo de alcohol e independiente de la intervención de otros factores patológicos, como por ejemplo su asociación a hepatitis producidas por infecciones virales.

20 En un aspecto preferible del procedimiento de la invención, dicha muestra biológica es una muestra de sangre. En otro aspecto preferible es una muestra de tejido, y en un aspecto preferible más es una muestra de saliva. Otro aspecto muy preferible de la invención es que dicho sujeto sea un sujeto de sexo masculino.

25 Funcionalmente no se conoce aún un ligando específico para KIR2DS5, pero dado el efecto observado en esta patología cabe suponer que este receptor sea dependiente de la existencia de un ligando que pueda ser sobreexpresado en células hepáticas implicadas en la progresión de la fibrosis, y capaz de mediar en el papel protector de las células NK activadas frente a la fibrosis hepática. Este papel sería sólo atribuible a la acción del gen KIR2DS5 entre los genes activadores, cuya acción no se ve tampoco afectada por la presencia concomitante de otros genes KIR inhibidores. Estos genes KIR inhibidores no sólo no se asocian con la predisposición a padecer la enfermedad sino que pueden incluso resultar elementos de protección frente a la misma, como es el caso de KIR2DL2.

35

Se ha realizado un análisis del perfil de genes KIR inhibidores y activadores de individuos sanos y de pacientes dirigido a conocer la frecuencia del gen activador KIR2DS5 en la población enferma.

- 5 En la Tabla 1 se recogen las frecuencias de genes KIR para el total de pacientes varones incluidos en el estudio y para el total de individuos sanos varones usados como grupo control, así como los resultados del análisis univariable de la presencia de los genes estudiados en el genotipo de los pacientes y controles. Se observa que KIR2DS5 es el único gen KIR que resulta asociado a cirrosis alcohólica de origen no
- 10 vírico de forma altamente significativa. Se comporta como un factor de alto riesgo para el padecimiento de dicha enfermedad ya que indica una predisposición a padecerla en sujetos que son portadores del dicho gen. Además de la presencia de este gen y de manera independiente, la única variable que es también capaz de influir positivamente en el desarrollo de la enfermedad es la edad. Por el contrario y en contraste con
- 15 KIR2DS5, la presencia del gen KIR2DL2 se asocia negativamente con la enfermedad.

Tabla 1. Frecuencia de genes KIR en pacientes varones con cirrosis alcohólica no viral y viral, y en controles sanos que no desarrollan la enfermedad.

KIR genes*	P/ A	Controles Sanos N=319 n (%)	Pacientes con cirrosis alcohólica				P2	P3	P4
			Total pacientes N=281		No infección viral N=213				
			n (%)	P1	n (%)	n (%)			
iKIRs									
2DL1 (S1-)	+	197 (61,8)	160 (56,9)	0,244	115 (54,0)	45 (66,2)	0,088	0,581	0,092
	-	122 (38,2)	121 (43,1)		98 (46,0)	23 (33,8)			
2DL2	+	202 (63,3)	149 (53,0)	0,013^a	112 (52,6)	37 (54,4)	0,015^d	0,173	0,889
	-	117 (36,7)	132 (47)		101 (47,4)	31 (45,6)			
2DL3	+	279 (87,5)	249 (88,6)	0,707	190 (89,2)	59 (86,8)	0,586	0,842	0,661
	-	40 (12,5)	32 (11,4)		23 (10,8)	9 (13,2)			
3DL1	+	304 (95,3)	268 (95,4)	1,000	201 (94,4)	67 (98,5)	0,689	0,325	0,200
	-	15 (4,7)	13 (4,6)		12 (5,6)	1 (1,5)			
2DL5	+	170 (53,3)	158 (56,2)	0,511	121 (56,8)	37 (54,4)	0,477	0,894	0,780
	-	149 (46,7)	123 (43,8)		92 (43,2)	31 (45,6)			
aKIRs									
2DS1 (L1+)	+	119 (37,3)	119 (42,3)	0,211	96 (45,1)	23 (33,8)	0,087	0,678	0,121
	-	200 (62,7)	162 (57,7)		117 (54,9)	45 (66,2)			
2DS2 (L2+)	+	201 (63,0)	146 (52)	0,006^b	109 (51,2)	37 (54,4)	0,007^e	0,217	0,677
	-	118 (37,0)	135 (48)		104 (48,8)	31 (45,6)			
2DS3	+	107 (33,5)	93 (33,1)	0,931	65 (30,5)	28 (41,2)	0,508	0,263	0,107
	-	212 (66,5)	188 (66,9)		148 (69,5)	40 (58,8)			
2DS4	+	305 (95,6)	266 (94,7)	0,704	199 (93,4)	67 (98,5)	0,323	0,486	0,128
	-	14 (4,4)	15 (5,3)		14 (6,6)	1 (1,5)			
2DS5	+	86 (27,0)	99 (35,2)	0,033^c	85 (39,9)	14 (20,6)	0,002^f	0,360	0,004^g
	-	233 (73,0)	182 (64,8)		128 (60,1)	54 (79,4)			
3DS1	+	129 (40,4)	132 (47,0)	0,117	105 (49,3)	27 (39,7)	0,050	1,000	0,209
	-	190 (59,6)	149 (53,0)		108 (50,7)	41 (60,3)			

P, presencia; A, ausencia; N, número total de sujetos; n, número de sujetos con presencia o ausencia de genes KIR. Las comparaciones han sido hechas por el test exacto de Fisher de dos colas *Genes constitutivos y pseudogenes no se han incluido. P1, valor de P obtenido de la

comparación entre los pacientes con cirrosis alcohólica totales versus total de donantes sanos; P2 y P3; valores P obtenidos de la comparación entre los pacientes con cirrosis alcohólica no viral y pacientes con cirrosis alcohólica viral versus controles sanos, respectivamente; P4, valor P obtenido de la comparación de pacientes con cirrosis alcohólica no viral versus cirrosis alcohólica viral. ^a OR=1,530; 95% CI:1,103-2,120 , P=0,013; ^b OR=1,575; 95% CI: 1,137-2,183, P=0,006; ^c OR=0,679; 95% CI: 0,479-0,961, P=0,033; ^d OR=1,557; 95% CI: 1,095-2,215, P=0,015; ^e OR=1,625; 95% CI: 1,143-2,311, P=0,007; ^f OR=0,556; 95% CI:0,384-0,804, P=0,002; ^g OR=2,561; 95% CI:1,339-4,900 , P=0,004.

10

Se ha realizado también un análisis complementario al de la Tabla 1, dirigido a evaluar el total de genes teloméricos en relación a la predisposición a padecer la enfermedad (Figura 1). En este caso, únicamente se observa un aumento en la frecuencia de cirrosis no viral cuando KIR2DS5 es portado por el paciente ya sea solo o acompañado de cualquiera de los otros dos genes activadores (KIR2DS1 y KIR3DS1), o de ambos. Esto sugiere que estos dos genes no son en si factores de riesgo sino que presentan un desequilibrio de unión con KIR2DS5. El efecto prevalente es el de KIR2DS5 ya que supera el observado para los otros dos genes en las cirrosis no virales. En definitiva, el resultado confirma que sólo el gen KIR2DS5 se asocia independientemente con cirrosis alcohólica no viral como factor responsable.

20

En la Tabla 2 se complementan los datos representados en la Figura 1. Esta tabla muestra la frecuencia combinada de todos los genes KIR en la población de pacientes varones con cirrosis alcohólica (n=281) y los desequilibrios de unión del gen KIR2DS5 con el resto de genes KIR activadores e inhibidores localizados en regiones centroméricas y teloméricas del cromosoma 19.

25

30

Tabla 2. Análisis del desequilibrio de unión entre los distintos genes KIR en la población de pacientes varones con cirrosis alcohólica.

Parte Centromérica										
3DL3	52	89	53	56	33	98	98	100		
	2DS2	41	99	70	72	50	50	52		
		2DL3	42	47	28	91	92	89		
			2DL2	71	71	51	51	53		
				2DL5	77	56	56	56		
					2DS3	36	36	33		
						2DL1	100	98		
							2DP1	98		
								3DP1		

Parte Telomérica									
100	95	47	35	42	95	0			
52	50	59	57	58	49	52			
88	86	48	40	43	85	89			
53	51	60	56	58	50	53			
56	52	87	77	84	51	56			
33	34	64	56	64	34	33			
98	95	47	36	42	93	98			
97	96	47	35	42	94	98			
100	95	47	35	42	95	100			
2DL4	95	47	35	42	94	100			
	3DL1	42	31	38	100	95			
		3DS1	87	94	42	47			
			2DS5	89	30	35			
				2DS1	37	42			
					2DS4	95			
						3DL2			

En la Tabla 3 se recoge el resultado del análisis de regresión logística multivariable aplicado para confirmar las asociaciones descritas en el análisis univariable realizado en controles sanos y pacientes con cirrosis alcohólica. En concordancia con todo lo anterior, las únicas variables estadísticamente significativas asociadas con cirrosis no vírica son la presencia del gen KIR2DS5 como predisponente al desarrollo de la enfermedad y la de KIR2DL2, que contrasta con el gen anterior por ser un factor asociado a la ausencia de enfermedad. El valor de la variable edad es el único que no se confirma con el análisis multivariable, lo que refuerza el papel de KIR2DS5 como factor de riesgo.

10

Tabla 3. Análisis multivariante de las principales variables contempladas en el estudio.

Variables	OR (95% CI)	P
Edad	1,010 (0,998-1,022)	0,098
KIR2DS5	1,519 (1,066-2,164)	0,021
KIR2DL2	0,612 (0,432-0,666)	0,006
KIR2DL3	0,648 (0,560-1,437)	0,539

En todos los casos, las comparaciones fueron realizadas entre el grupo de pacientes y el grupo control como grupo de referencia.

15

El procedimiento de la presente invención permite predecir la susceptibilidad de un sujeto a padecer la enfermedad, o por otro lado su resistencia innata frente a los efectos nocivos inducidos por el consumo de alcohol. Por tanto, el resultado de su aplicación sirve para orientar sobre la necesidad o no de hacer un seguimiento continuado de individuos con un posible desequilibrio por consumo de alcohol, que es la causa primordial de la enfermedad. El objetivo es servir de guía para la prevención y asesoramiento acerca de hábitos saludables y dietas exentas de alcohol en el paciente susceptible de desarrollar la enfermedad.

20

25

El procedimiento de la invención se configura como una herramienta muy útil para definir un factor de riesgo que permite predecir si un sujeto que consuma alcohol va a tener una respuesta inmunitaria inadecuada para protegerle frente al desarrollo de fibrosis, y de su deriva hacia el estadio más avanzado de daño hepático que representa la cirrosis alcohólica no asociada a infección viral.

- La invención ofrece además orientación sobre las características genéticas individuales que propician la existencia de una resistencia innata o natural a padecer esta enfermedad. La ausencia de predisposición de un sujeto a padecer cirrosis
- 5 alcoholica podría venir asociada a una mejor capacidad de producir una respuesta inmunitaria idónea para mantener el equilibrio homeostático y el estado de salud del organismo. Así, incluso después de cualquier desequilibrio inmunitario ocasional podría conseguir recuperar más fácilmente su estado de salud.
- 10 Es posible que la o las moléculas proteicas codificadas por el gen KIR2DS5 modulen la activación de células NK y T citotóxicas. Este mecanismo parece esencial para favorecer la fibrosis y/o cirrosis hepática porque puede mediar evitando la activación de las células estrelladas y su transformación fibrótica.
- 15 El método de análisis molecular empleado en la PCR de la presente invención ofrece predicción precoz de la susceptibilidad individual al consumo de alcohol y por consiguiente la predisposición a padecer cirrosis alcoholica en sujetos portadores del gen KIR2DS5. El procedimiento es un sistema rápido y sencillo y no invasivo (Tabla 4) que puede realizarse con muestras biológicas de extracción no quirúrgica en las
- 20 poblaciones más expuestas al daño por alcohol.

En un aspecto preferible del procedimiento de la invención, la detección del gen KIR2DS5 en la muestra biológica del paciente comprende una reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los cebadores desarrollados en la presente invención (Tabla 4) se

25 sitúan en el exón 4 que codifica para el dominio extracelular D1 del gen KIR2DS5 (Figura 2), y son capaces de amplificar de forma específica cualquiera de los alelos identificados hasta la fecha para este gen, tal como se muestra en la Tabla 5. El producto de la reacción consta de 106 pares de bases.

30

Tabla 4.

Nombre	Tamaño	Secuencia 5´- 3´
KIR2DS5-sentido	19pb	SEQ ID NO:1
KIR2DS5-antisentido	23pb	SEQ ID NO:2

Tabla 5. Total de alelos de KIR2DS5 detectados que pueden ser identificados por el ensayo de la presente invención

5	2DS5*001	2DS5*00502
	2DS5*0020101	2DS5*006
	2DS5*0020102	2DS5*007
	2DS5*0020103	2DS5*00801
	2DS5*0020104	2DS5*00802
	2DS5*00202	2DS5*009
10	2DS5*003	2DS5*010
	2DS5*004	2DS5*011
	2DS5*00501	2DS5*012

15 De forma que un aspecto muy preferible de la invención es un oligonucleótido identificado por una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada entre SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, y sus secuencias complementarias. Otro aspecto preferible es un oligonucleótido con una identidad de secuencia de al menos un 95%, 91%, 89% u 87% con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Otro aspecto más preferible es su uso como
 20 cebador para la secuencia del genoma humano, y otro aspecto más preferible aún es su uso, o el de sus variables funcionales, para la detección del gen KIR2DS5 por la reacción en cadena de la polimerasa.

En el ámbito de la presente invención, se define como variable funcional de un
 25 cebador aquella secuencia de ácidos nucleicos capaz de hibridar de forma específica con una secuencia diana de DNA adyacente o contenida en el gen KIR3DS5 humano.

La posición de los cebadores diseñados *de novo* en la presente invención es específica para el gen KIR2DS5 (Figura 2) y son capaces de amplificar la región
 30 correspondiente del exón 4, que codifica parte del dominio extracelular D1 de la proteína KIR2DS5. No se han detectado extra reacciones para ningún otro gen KIR.

El aspecto más preferible de la presente invención es un kit para la realización del procedimiento de la invención, que comprende reactivos específicos para la detección
 35 del gen KIR2DS5 en una muestra biológica de un sujeto, instrucciones para el uso de

dichos reactivos y un dispositivo para determinar si el resultado de dicha detección es indicativo de la predisposición genética de dicho sujeto a desarrollar cirrosis hepática no vírica a partir de la comparación con un control. Otro aspecto muy preferible es un kit para la determinación de la predisposición a desarrollar una cirrosis alcohólica no vírica en un sujeto, que comprende al menos uno de los cebadores identificados como SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, o sus secuencias complementarias o sus variables funcionales.

10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1: Muestra las comparaciones de frecuencias de los genes activadores KIR2DS1, KIR3DS1 y KIR2DS5 observadas en paciente cirróticos sin infección viral (barras rayadas), con infección viral (barras moteadas) y en controles sanos (barras blancas). Una frecuencia aumentada de estos genes se observó en pacientes con cirrosis alcohólica no viral.

Figura 2: Representación esquemática del mapa genético del gen KIR2DS5 mostrando la posición génica de los diferentes motivos estructurales proteicos que codifica. No está dibujado a escala, las zonas intrónicas han sido reducidas para una mejor representación. DO, D1 y D2 representan los diferentes dominios extracelulares desde posiciones más distales a más proximales de la membrana plasmática, respectivamente. Cyt corresponde al dominio intracitoplasmático. Las flechas negras marcan la localización de los cebadores sentido y antisentido de la invención en el exón 4 correspondiente al dominio extracelular (D1).

Figura 3: Fotografía del resultado de una electroforesis en gel de agarosa al 3% mostrando el resultado del genotipaje del gen KIR2DS5. Para su visualización se añadieron 5 microlitros de muestra por pocillo, con una distancia de migración de aproximada de 3 cm, y teñidos con RedSafe (Intron biotechnology). La banda de 106 pares de bases corresponde a la amplificación del gen KIR2DS5+ en aquellos pacientes que lo presentan (P1-4). M; Marcador de peso molecular (Φ X174 DNA-Hae III Digest (New England Biolabs)). P1-4, pacientes KIR2DS5+ con cirrosis alcohólica no virales. C5-6, controles sanos KIR2DS5+ y p7-8 pacientes enfermos KIR2DS5-.

35

EJEMPLOS

Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

5 **Ejemplo 1: Perfil de genes KIR de una población sana o de pacientes.**

Para determinar la prevalencia de los genes KIR se utilizaron muestras de ADN extraídas de sangre periférica anticoagulada, disponibles en el Servicio de Inmunología del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia. En las comparaciones se utilizaron datos de la población masculina enferma acompañada o no de infección viral, así como de población sana. La presencia de genes KIR conocidos en el total de muestras (Tabla 1) se analizó inicialmente por técnicas de PCR-SSO (“Sequence Specific Oligonucleotide”) con tecnología Luminex (Tepnel Lifecodes) y PCR-SSP (“Single Specific Primer”) tal como descrito por Vilches (Vilches C et al. “Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments”. Tissue Antigen. 2007; 70(5):415-22). La presencia específica del gen KIR2DS5, en el dominio D1, se detectó con el siguiente protocolo de amplificación e hibridación. Para cada reacción de amplificación se partió de 100 ng de DNA genómico contenidos en 10 µl de tampón de PCR (67 mM Tris–HCl, pH 8,8, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgCl₂, 0.01% Tween-20, 100 mM dNTPs) conteniendo 0,3U de Taq polimerasa (EcoTaq; Ecogen SRL, Barcelona, Spain). Se sometió a una desnaturalización inicial durante 2 min a 95⁰C seguida por 10 ciclos de 10s a 94⁰C más 40s at 73⁰C, además de 20 ciclos de 20s a 94⁰C, 20s a 68⁰C y 30s a 72⁰C (Termociclador ABI2720, Applied Biosystems, Foster City, CA). Posteriormente, los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 3% con 5 microlitros de muestra por pocillo, con una distancia de migración de aproximada de 3 cm, y teñidos con RedSafe (Intron biotechnology),

20 **Ejemplo 2: Determinación de KIR2DS5 en pacientes con hábitos de consumo de alcohol con sintomatología de cirrosis alcohólica no vírica.**

30 Se consideraron muestras de pacientes varones según el ejemplo anterior, con sintomatología de la enfermedad cirrótica en estadiaje final y con hábitos de consumo de alcohol. Se procedió con la amplificación específica y selectiva del fragmento especificado en la invención de 106 bases del gen KIR2DS5 en cada una de las muestras. El resultado permitió observar una banda, específica e indicativa de la presencia del gen KIR2DS5 (Figura 3).

35

Ejemplo 3: Determinación de KIR2DS5 en el genotipo de un paciente sano con hábitos de alcohol y sin cirrosis.

5 En muestras de pacientes que presentaban hábitos de alcohol pero ninguna sintomatología de cirrosis hepática. Se repitió el procedimiento del ejemplo anterior para evaluar la presencia o ausencia de KIR2DS5, no observándose amplificación genética (Figura 3, ver C5-C6)

10

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la predicción de cirrosis hepática alcohólica no vírica en un sujeto, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
 - 5 - detección de la presencia del gen KIR2DS5 en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto,
 - comparación del resultado de la detección anterior con un control, y
 - evaluación de la predisposición genética de dicho sujeto a desarrollar cirrosis hepática no vírica a partir de la comparación anterior.
- 10 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha muestra biológica es una muestra de sangre.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha muestra biológica es una muestra de tejido.
- 15 4. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha muestra biológica es una muestra de saliva.
5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que dicho sujeto es de sexo masculino.
6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que dicha detección comprende una reacción en cadena de polimerasa.
- 20 7. Oligonucleótido caracterizado por que está identificado por una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada entre SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, y sus secuencias complementarias.
8. Un oligonucleótido según la reivindicación 7, caracterizado por que presenta una
- 25 identidad de secuencia de al menos el 95% con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
9. Un oligonucleótido según la reivindicación 8, caracterizado por que dicha identidad es de al menos el 91%.
10. Un oligonucleótido según la reivindicación 9, caracterizado por que dicha identidad es de al menos el 89%.
- 30 11. Un oligonucleótido según la reivindicación 10, caracterizado por que dicha identidad es de al menos el 87%.
12. Uso de un oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, como cebador para la secuencia del genoma humano.
13. Uso de un cebador según la reivindicación 12, o sus variables funcionales, para la
- 35 detección del gen KIR2DS5 por la reacción en cadena de la polimerasa.

14. Kit para la realización del procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que comprende reactivos específicos para la detección del gen KIR2DS5 en una muestra biológica de un sujeto, instrucciones para el uso de dichos reactivos y un dispositivo para determinar si el resultado de dicha detección es indicativo de la predisposición genética de dicho sujeto a desarrollar cirrosis hepática no vírica a partir de la comparación con un control.
15. Kit para la predicción de cirrosis hepática no vírica de un sujeto, caracterizado por que comprende al menos uno de los cebadores identificados como SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, o sus secuencias complementarias o sus variables funcionales.

10

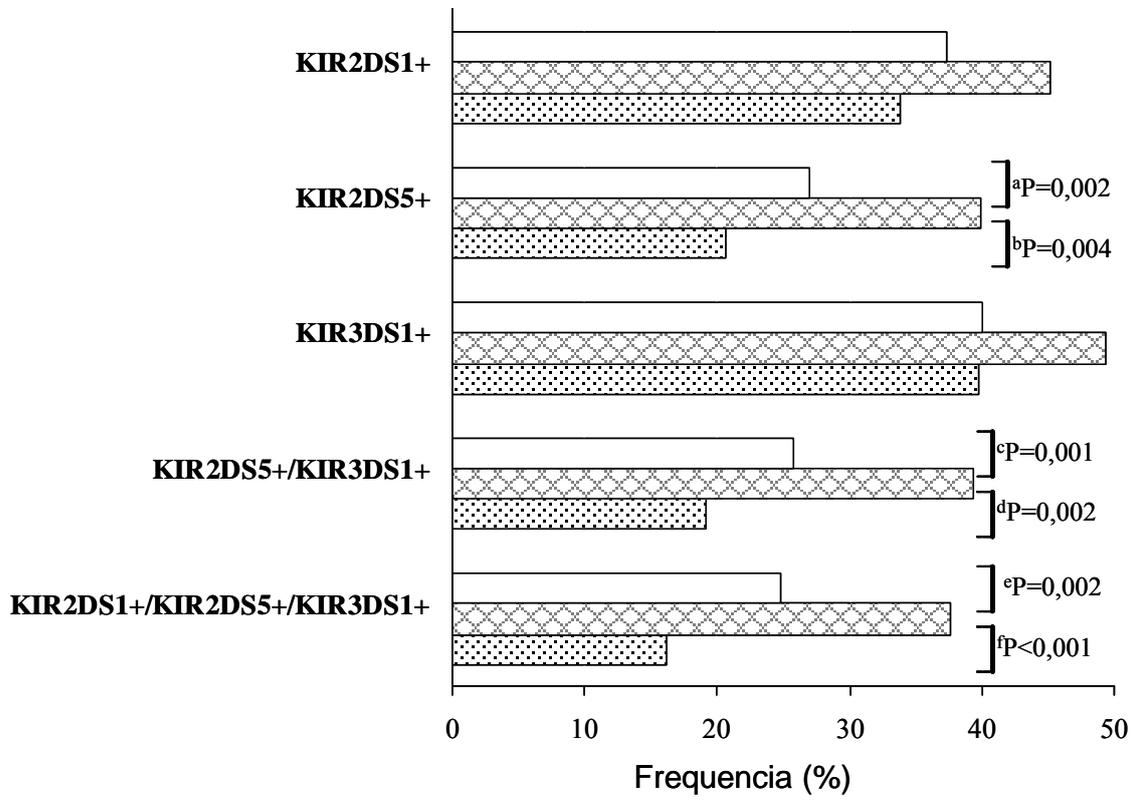


Figura 1

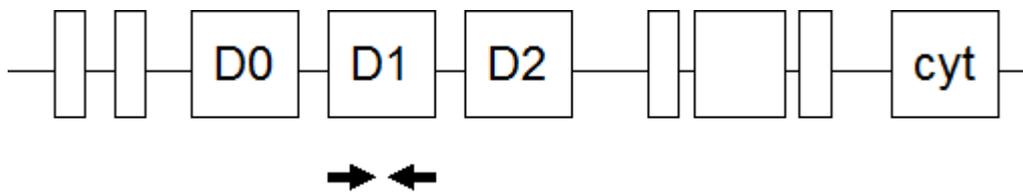


Figura 2

M P1 P2 P3 P4 C5 C6 C7 C8

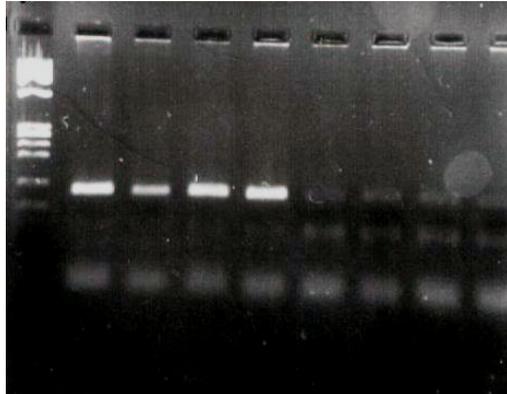


Figura 3

ES 2 537 052 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> HOSPITAL DE LA VIRGEN DE LA ARRIXACA

<120> PROCEDIMIENTO PARA LA PREDICCIÓN DE CIRROSIS HEPÁTICA ALCOHÓLICA
NO VÍRICA EN UN SUJETO

<130> P802/2014

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Sentido

<400> 1
catcggtcgc atgacacaa
19

<210> 2
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Antisentido

<400> 2
cacgatgtcc agagggtcac tgg
23



- ②① N.º solicitud: 201530262
②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.02.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2010053363 A1 (SANQUIN BLOEDVOORZIENING) 14.05.2010, página 59, líneas 1-8; figuras 1C,3A.	7-13
X	DU, Z. et al., 'Receptor-ligand analyses define minimal killer cell Ig-like receptor (KIR) in humans', IMMUNOGENETICS, 2007, Vol. 59, No. 1, Págs 1-15, ISSN: 0093-7711, doi:10.1007/s00251-006-0168-4, Materiales y Métodos, Tabla 1.	7-13
Y	ORDÓÑEZ, D. et al., 'KIR typing by non-sequencing methods: polymerase-chain reaction with sequence-specific primers', METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2012, Vol. 882, Págs 415-430, ISSN: 1940-6029 (Electronic), doi: 10.1007/978-1-61779-842-9_24, Materiales, Tablas 1, 2 y 3.	7-13
Y	LUSZCZEK, W. et al., 'Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris', HUMAN IMMUNOLOGY, 2004, Vol. 65, No. 7, Págs. 758-766, ISSN: 0198-8859, Materiales y Métodos, Tabla 2.	7-13
Y	SUN, J.Y. et al., 'Development of a multiplex PCR-SSP method for Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping', TISSUE ANTIGENS, 2004, Vol. 64, No. 4, Págs 462-468, ISSN: 0001-2815, Materiales y Métodos, Figuras 1 y 2.	7-13
A	SHARMA, S. et al., 'Non-invasive diagnosis of advanced fibrosis and cirrhosis', WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, 2014 Dic, Vol. 20, No. 45, Págs 16820-16830, ISSN: 1007-9327 (print), ISSN: 2219-2840 (electronic), doi: 10.3748/wjg.v20.i45.16820, todo el documento.	1-15
A	TORRUELLAS, C. et al., 'Diagnosis of alcoholic liver disease', WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, 2014 Sep, Vol. 20, No. 33, Págs 11684-11699, ISSN: 1007-9327 (print), ISSN: 2219-2840 (electronic), doi: 10.3748/wjg.v20.i33.11684, todo el documento.	1-15
A	WO 2006062647 A2 (NEUROME INC.) 15.06.2006, todo el documento.	1-15
A	WO 2008105215 A1 (NITTO BOSEKI CO. LTD.) 04.09.2008, resumen.	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
25.05.2015

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/5

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, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.05.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-6, 14, 15	SI
	Reivindicaciones 7-13	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	WO 2010053363 A1 (SANQUIN BLOEDVOORZIENING)	14.05.2010
D02	DU, Z. et al., <i>Immunogenetics</i> , (2007), <u>59</u> (1):1-15.	2007
D03	ORDÓÑEZ, D. et al., <i>Methods Mol. Biol.</i> , (2012), <u>882</u> : 415-30.	2012
D04	ŁUSZCZEK, W. et al., <i>Hum Immunol.</i> , (2004), <u>65</u> (7): 758-66.	2004
D05	SUN, J.Y. et al., <i>Tissue Antigens</i> , (2004), <u>64</u> (4):462-8.	2004
D06	SHARMA, S. et al., <i>World J. Gastroenterol.</i> , (2014 Dec), <u>20</u> (45): 16820-30.	2014
D07	TORRUELLAS, C. et al., <i>World J. Gastroenterol.</i> , (2014 Sep), <u>20</u> (33): 11684-99.	2014
D08	WO 2006062647 A2 (NEUROME INC.)	15.06.2006
D09	WO 2008105215 A1 (NITTO BOSEKI CO. LTD.)	04.09.2008

En D01-D05 se describen diferentes reacciones PCR y cebadores específicos para la detección del gen *KIR2DS5*.

En D06-D09 se divulgan diferentes marcadores genéticos y procedimientos de diagnóstico de cirrosis hepática alcohólica.

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

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1 Reivindicaciones independientes 1 y 14.

1.1.1. El objeto de las reivindicación 1 consiste en un procedimiento para la predicción de cirrosis hepática alcohólica no vírica caracterizado por que comprende la detección del gen *KIR2DS5*. También se reivindica un kit para llevar a cabo el procedimiento de la reivindicación 1 (Reivindicación 14).

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D01-D09, no se ha divulgado ningún procedimiento con las características técnicas referidas. Además, dicho procedimiento no se deduce de una manera obvia del estado de la técnica correspondiente. Por consiguiente, el objeto de las reivindicaciones independientes 1 y 14, y el de las dependientes 2-6 y 15 se considera nuevo e inventivo sobre la base de los documentos D01-D09.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio de patentabilidad establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes en cuanto al objeto definido en las reivindicaciones 1-6, 14 y 15, pues es nuevo y tiene actividad inventiva según los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.

2.1. Reivindicación independiente 7.

2.1.1. El objeto de las reivindicación 7 consiste en un oligonucleótido caracterizado por una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y sus secuencias complementarias. También se reivindican los oligonucleótidos que presentan una identidad de al menos el 95%, 91%, 89% o 87% con SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 (Reivindicaciones 8-11) y el uso de estos oligonucleótidos como cebadores en una reacción PCR para la detección del gen *KIR2DS5* (Reivindicaciones 12 y 13).

El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación 7 y las reivindicaciones dependientes 8-13 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de nuevos oligonucleótidos-cebadores para la detección de *KIR2DS5* mediante una reacción PCR.

En los documentos D01-D05 que constituyen el estado de la técnica más próximo, se describen diferentes oligonucleótidos-cebadores específicos para la amplificación de secuencias del gen *KIR2DS5* (cf. D01: página 59, líneas 1-8; figuras 1C y 3A. D02: Materiales y Métodos, Tabla 1. D03: Materiales, Tablas 1, 2 y 3. D04: Materiales y Métodos, Tabla 2. D05: Materiales y Métodos, Figuras 1 y 2). En particular, secuencias del gen *KIR2DS5* que comprenden a los oligonucleótidos SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 han sido caracterizadas y utilizadas para el diseño de sondas, como la 528C, y cebadores, como 2DS5RD, para la identificación y amplificación específica de *KIR2DS5*. Por consiguiente, se puede estimar que, ante el problema técnico planteado, el experto en la materia combinaría las enseñanzas divulgadas en D01 y D02 llegando como resultado a la solución propuesta en la reivindicación 1 o a una equivalente.

Por otro lado, puesto que en la solicitud no se describe ningún efecto inesperado y/o sorprendente asociado al uso de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 como cebadores para la amplificación específica del gen *KIR2DS5* frente a los cebadores descritos en D01-D05 con el mismo fin, se considera que la solución propuesta en la solicitud es una mera alternativa no inventiva a la planteada en el estado de la técnica.

Por todo ello, se considera que la reivindicación 7, y las reivindicaciones dependientes 8-13 no son inventivas sobre la base de los documentos D01-D05.

- 2.2. La presente invención no satisface el criterio de patentabilidad establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes en cuanto al objeto definido en las reivindicaciones 7-13, pues no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.