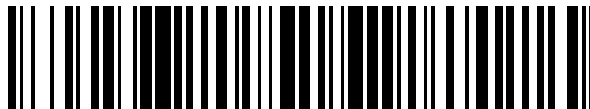


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 288**

21 Número de solicitud: 201530298

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**10.03.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**12.09.2016**

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO  
PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA  
(FIBHUPHM) (70.0%)  
C/ JOAQUIN RODRIGO Nº 2  
28222 MAJADAHONDA (Madrid) ES y  
FUNDACIÓN CENTRO NACIONAL DE  
INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES  
CARLOS III (CNIC) (30.0%)**

72 Inventor/es:

**GARCÍA PAVÍA, Pablo;  
LARA PEZZI, Enrique;  
CUENCA PARRA, Sofía y  
PADRÓN PRÉVERAUD DE VAUMAS, Laura**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **MÉTODO DE DETECCIÓN DE PREDISPOSICIÓN A PADECER CARDIOPATÍA DILATADA**

57 Resumen:

Método de detección de predisposición a padecer cardiopatía dilatada.

La presente invención se refiere a un método para detectar la susceptibilidad a padecer miocardiopatía dilatada en un sujeto o en sus familiares que comprende la detección de la mutación c.77T>C del gen EMD. Además también se refiere a un kit para detectar dicha mutación y al uso del mismo para dicho fin.

**ES 2 582 288 A1**

**Método de detección de predisposición a padecer cardiopatía dilatada**

**DESCRIPCIÓN**

5 La presente invención se refiere a un método para detectar la susceptibilidad a padecer cardiopatía dilatada en un sujeto. Por lo tanto, la presente invención se podría encuadrar en el campo de la biomedicina.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

10

La miocardiopatía dilatada (MCD) es la causa más frecuente de insuficiencia cardíaca en jóvenes y la causa más frecuente de trasplante cardíaco (TxC) en el mundo. Diversos estudios mediante despistaje clínico y ecocardiográfico de familiares de pacientes con MCD han mostrado que hasta un 50% de los casos de MCD son de  
15 origen familiar y, por tanto, tienen una base genética.

15

Hasta la fecha, más de 40 genes distintos se han relacionado con la MCD (García-Pavía P *et al.* 2013 *Biomarkers Med* 7(4):517-533). Sin embargo, cada uno de los genes descritos hasta la fecha sólo es responsable de un pequeño porcentaje de los  
20 casos de MCD. Por tanto, existen otros genes por descubrir relacionados con esta patología. El alto número de genes relacionados con esta enfermedad ha hecho muy difícil el estudio genético de pacientes con MCD así como la búsqueda de nuevos genes implicados. Asimismo, el gran número de genes a analizar ha limitado hasta la fecha la aplicación de estrategias de *screening* genético a nivel clínico.

20

25

Uno de los genes relacionados con la MCD es el gen que codifica para la proteína emerina, el gen *EMD*. Las mutaciones en el gen *EMD* son una causa muy infrecuente de MCD (<1% de los casos) (Arbustini E, Narula N, Dec GW, *et al.* *The MOGE(S) Classification for a Phenotype–Genotype Nomenclature of Cardiomyopathy: Endorsed  
30 by the World Heart Federation.* *J Am Coll Cardiol* 2013;62:2046-72). Las mutaciones en *EMD* también se asocian a defectos en el sistema de conducción cardíaco que pueden dar lugar a muerte súbita y a patología muscular. La emerina es una proteína de la membrana interna del núcleo. El gen *EMD* está compuesto por seis exones y se localiza en el cromosoma Xq28 (Koch AJ, Holaska JM. *Emerin in health and disease.*  
35 *Semin Cell Dev Biol.* 2014 May;29:95-106).

30

35

Se han descrito mutaciones en este gen asociadas a la MCD pero el *screening* de este gen no se hace de manera rutinaria para la detección de la predisposición genética de la MCD (Zhang M *et al.* 2014 BMC Medical Genetics 15:77; Meinke P *et al.* 2014 Neuromuscul Disord doi: 10.1016/j.nmd.2014.09.012).

5

Actualmente existen métodos de diagnóstico que detectan si un individuo es portador de una determinada enfermedad o si presenta predisposición genética a padecerla, como por ejemplo para la fibrosis quística o la hemocromatosis. Sin embargo, hace falta un método de detección de la predisposición genética a padecer la MCD, útil tanto para la detección en el propio individuo posiblemente afectado como para predecir si sus descendientes o familiares también van a ser susceptibles de padecer dicha enfermedad.

10

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15

En la presente invención se demuestra que la mutación en el gen *EMD* c.77T>C produce MCD. La detección de esta mutación es útil tanto en hombres como en mujeres. Se demuestra la utilidad de la detección de la mutación c.77T>C en el gen *EMD* para establecer el estado de portador en un sujeto y, por lo tanto, determinar la susceptibilidad genética a padecer MCD.

20

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para proporcionar datos (datos útiles) para detectar la susceptibilidad genética a padecer miocardiopatía dilatada en un sujeto o en sus familiares que comprende la detección de la mutación c.77T>C del gen *EMD* en una muestra biológica aislada. En adelante nos referiremos a él como al “método primero de la invención”.

25

El término “susceptibilidad genética” se refiere a la predisposición genética a desarrollar un determinado fenotipo debido a su dotación genética, es decir, a la presencia de una alteración (cambio o mutación) genética. En la presente invención, se refiere a la predisposición a padecer miocardiopatía dilatada. Los individuos con dicha susceptibilidad tienen mayor probabilidad de desarrollar esta enfermedad.

30

En la presente invención se entiende por miocardiopatía dilatada (MCD) a la dilatación y disfunción sistólica del ventrículo izquierdo o de ambos ventrículos del corazón en ausencia de cardiopatía isquémica o condiciones hemodinámicas que provoquen

35

sobrecarga del corazón. (Elliott P, *et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases*. Eur Heart J

5 La mutación c.77T>C del gen *EMD* (en la posición 77 del ADN codificante, contando a partir del ATG) (localización cromosómica g.153607921T>C; NC\_000023.10; NM\_000117.2), produce la mutación p.Val26Ala en la proteína (NP\_000108.1). En la presente invención se demuestra que la mutación c.77T>C del gen *EMD* es prevalente entre pacientes aquejados de MCD. En adelante, nos referiremos a la mutación c.77T>C del gen *EMD* como a la “mutación de la invención”.

10

El término “muestra biológica” en la presente invención se refiere a cualquier muestra que permita analizar el gen *EMD* del individuo del que se ha obtenido dicha muestra, e incluye, pero sin limitarnos, fluidos biológicos o tejidos de un individuo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica comprende ácido desoxirribonucleico (ADN), ADN genómico, ADN codificante, ácido ribonucleico (ARN) y/o proteína. La muestra biológica podría ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una muestra de fluido, como sangre, plasma, suero, saliva, orina, líquido sinovial o linfa. También puede ser una muestra de tejido.

15

20 La muestra biológica en la presente invención puede ser fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina. La muestra biológica además se puede provenir de extracciones realizadas de forma rutinaria en análisis que se pueden realizar periódicamente a los pacientes.

25 En la presente invención los términos “sujeto”, “individuo” y “paciente” se usan indistintamente.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para detectar la susceptibilidad genética a padecer miocardiopatía dilatada en un sujeto o en sus familiares que comprende la detección de la mutación c.77T>C del gen *EMD* y donde la detección de la mutación c.77T>C del gen *EMD* es indicativa de la susceptibilidad genética a padecer miocardiopatía dilatada en dicho sujeto o en sus familiares. En adelante nos referiremos a él como al “método segundo de la invención”.

30

El término “*in vitro*” se refiere a que el método de la invención se realiza fuera del cuerpo del sujeto. La detección se hace por lo tanto en una muestra biológica aislada del sujeto.

5 Se entiende por “familiares” en la presente invención a los individuos que presenten cualquier grado de consanguinidad con el sujeto analizado, por ejemplo, descendientes (hijos, nietos, bisnietos, tataranietos), hermanos, padres, etc. Tanto hombres como mujeres. En el caso de los descendientes estos pueden ser nacidos o no nacidos.

10

Los métodos de la invención permiten disponer de información útil para la toma de decisiones terapéuticas, permitiendo seleccionar a los pacientes con mayor probabilidad de necesitar seguimiento y tratamiento de la MCD. El tratamiento de la MCD incluye diversos fármacos como son los inhibidores del enzima convertidor de angiotensina, los antagonistas de los receptores de la angiotensina, los inhibidores de la aldosterona o los beta-bloqueantes. Asimismo en los casos más graves de MCD puede ser necesario realizar un trasplante cardiaco.

15

Conocer quién dentro de una familia es portador de la mutación deriva en un abaratamiento de los costes directos e indirectos de la enfermedad (ya que no es necesario seguir a los sujetos no portadores) y permite tomar decisiones en relación a la actividad laboral, planificación de vida y actitud reproductiva.

20

La presente invención también permite realizar un diagnóstico prenatal e preimplantacional con el fin de evitar la transmisión de la mutación a descendientes en el caso en el que al menos uno de los padres sea portador de la mutación de la invención.

25

Por este motivo la presente invención también se refiere a un método *in vitro* para realizar un seguimiento o diseñar un tratamiento individualizado para un sujeto que comprende detectar si la mutación c.77T>C está presente en una muestra biológica de dicho sujeto; en el que la presencia de la mutación es indicativa de que el sujeto precisa seguimiento y/o tratamiento (en función de si ya ha desarrollado la MCD). El tratamiento de la MCD comprende al menos uno de los tratamientos seleccionados de la lista que consiste en: inhibidor del enzima convertidor de angiotensina, un antagonista de los receptores de la angiotensina, un inhibidor de la aldosterona o los

30

35

beta-bloqueantes o cualquiera de sus combinaciones. Asimismo en los casos más graves de MCD puede ser necesario realizar un trasplante cardiaco. En adelante nos referiremos a éste como al “método tercero de la invención”.

5 Se entiende por “tratamiento” al conjunto de medios que se emplean para curar o aliviar una enfermedad. En la presente invención el tratamiento a administrar son fármacos o realización de intervenciones (trasplante cardiaco) como se ha indicado anteriormente.

10 Tanto en el método primero, como en el segundo, como en el tercero de la invención el sujeto preferiblemente es un humano. Más preferiblemente, el sujeto es un hombre o una mujer.

15 La mutación c.77T>C del gen *EMD* puede ser detectada mediante técnicas generales de biología molecular, como pueden ser la técnica de amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR); o PCR seguida de una reacción de extensión de primer; o por una técnica de secuenciación del fragmento de ADN amplificado por PCR; o por hibridación. También podría detectarse por técnicas de secuenciación masiva de nueva generación.

20 Por este motivo, una realización preferida del primer y segundo aspecto de la invención se refiere al método donde la detección de la mutación c.77T>C del gen *EMD* se realiza mediante PCR, secuenciación, hibridación o cualquiera de sus combinaciones.

25 La detección de la mutación c.77T>C del gen *EMD* puede ser realizada en el ADN codificante, el ADN genómico, en el ARN mensajero o en la proteína emerina (donde se detecta la mutación p.Val26Ala).

30 La detección puede realizarse mediante el empleo de cebadores (preferiblemente los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2), sondas o anticuerpos.

35 El término “cebador” (también denominado “primer”u “oligo”), como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando hibrida con el ácido nucleico molde. Preferiblemente, el cebador es un oligonucleótido de desoxirribosa. Los cebadores pueden prepararse mediante

5 cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Los cebadores pueden diseñarse para hibridar con secuencias específicas de nucleótidos en el ácido nucleico molde (cebadores específicos) o pueden ser sintetizados al azar (cebadores arbitrarios).

10 De acuerdo con la presente invención un “cebador” puede ser marcado o etiquetado mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica. Etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, etiquetas fluorescentes, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas bioluminiscentes o etiquetas enzimáticas.

El término “secuenciación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la determinación de los nucleótidos de un ácido nucleico molde y de su orden.

15 Las condiciones en las cuáles se realiza la secuenciación generalmente incluyen (a) poner en contacto un ácido nucleico molde con una polimerasa en una mezcla que además comprende un cebador, un catión bivalente (por ejemplo,  $Mg^{2+}$ ), y nucleótidos, generalmente, dNTPs y al menos, un ddNTP (dideoxinucleótido trifostato), y (b) someter dicha mezcla a una temperatura suficiente para que la polimerasa inicie la incorporación de los nucleótidos al cebador mediante complementariedad de bases con el ácido nucleico molde, y de lugar a una población de moléculas de ADN complementario de diferente tamaño. La separación de dicha población de moléculas de ADN complementario, generalmente, mediante electroforesis, permite determinar la secuencia de nucleótidos.

25 El término “amplificación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al aumento del número de copias de un ácido nucleico molde.

30 El término “ácido nucleico molde” o “molde”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ácido nucleico de cadena simple o de doble cadena que va a ser amplificada o secuenciada.

35 Las condiciones en las cuáles se realiza la amplificación generalmente incluyen (a) poner en contacto un ácido nucleico molde con una polimerasa en una mezcla que además comprende al menos un cebador (siendo normalmente dos cebadores), un catión bivalente (por ejemplo,  $Mg^{2+}$ ), y nucleótidos, generalmente, dNTPs (b) someter

dicha mezcla a una temperatura suficiente para que la polimerasa inicie la incorporación de los nucleótidos al cebador mediante complementariedad de bases con el ácido nucleico molde, y de lugar a una población de moléculas de ADN complementario generalmente del mismo tamaño.

5

El término “hibridación”, tal y como es conocido por el experto en la materia, se refiere a la unión de dos cadenas de ácidos nucleicos antiparalelas y con secuencias de bases complementarias en una única molécula de doble cadena.

10

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* de la mutación c.77T>C del gen *EMD* como biomarcador para la detección de la susceptibilidad genética a padecer miocardiopatía dilatada en un sujeto o en sus familiares.

15

En la presente invención se entiende como “biomarcador” (marcador genético) a una secuencia de ADN (en este caso la mutación de la invención) que puede ser utilizada para identificar la predisposición a padecer miocardiopatía dilatada en un sujeto o en sus familiares.

20

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende cebadores, sondas o anticuerpos específicos para la detección de la mutación c.77T>C del gen *EMD*.

25

Una realización más preferida del cuarto aspecto de la invención se refiere al kit que comprende los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Preferiblemente el kit consiste en los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

30

El kit también puede incluir al menos uno de los reactivos seleccionado de la lista que consiste en: una transcriptasa, una ARN polimerasa o un fluoróforo, una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), una mezcla de nucleótidos trifosfato (NTP), desoxirribonucleasa inversa (DNasa), inhibidores de la ribonucleasa (RNasa), ditiotreitól (DTT), pirofosfatasa inorgánica (PPI) y tampones.

35

Además, en la presente invención las sondas, cebadores o los anticuerpos se pueden encontrar sobre un soporte sólido, por ejemplo, pero no limitado a: vidrio, plástico, tubos, de múltiples pocillos placas, membranas, soportes de silicio, soportes de



plástico, discos compactos, filtros, capas de gel, soportes metálicos, un dispositivo, cualquier otro soporte conocido, o una mezcla de ellos.

5 La presente invención también se refiere al dispositivo que comprenda las sondas, cebadores, preferiblemente los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, o los anticuerpos específicos para la detección de la mutación c.77T>C del gen *EMD*, así como su uso para dicho fin.

10 La sonda o cebador específico (ADN de origen no natural) utilizado en la presente invención se pueden modificar, por ejemplo, con marcadores adecuados para su detección o modificados químicamente. Tales etiquetas pueden ser todo lo conocido por el experto en el campo, por ejemplo, fluoróforos, isótopos radiactivos, moléculas para la identificación inmunológica o *quenchers*. Los ejemplos no limitantes de marcadores fluorescentes que se pueden utilizar en el contexto de la presente  
15 invención incluyen: FAM™, VIC®, HEX™, TET™, Cy3, CY5.5, JOE™, ROX™, Cascade Blue®, fluoresceína, ficoeritrina, Texas Red®, rodamina, rodamina verde, rodamina roja, rodamina 6G, 6-TAMRA, 5-TMR1A, Alexa Fluor® (por ejemplo, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 594), BODIPY®, etc. Ejemplos de *quenchers* son, sin limitarse a los mismos, rojo de metilo, ElleQuencher, Dabcilo,  
20 DABSYL, TAMRA, etc. En la presente invención, "quencher" se entiende que significa una molécula que acepta energía de un fluoróforo y lo disipa en forma de calor o de fluorescencia. Los isótopos radiactivos pueden ser por ejemplo de fósforo-32 o tritio. Como moléculas para la identificación inmunológica, se puede utilizar cualquier molécula conocida por el experto en el campo, por ejemplo digoxigenina.

25

La longitud de las sondas o cebadores específicos puede ser de cualquier longitud, preferiblemente la longitud es de entre 10 y 50 nucleótidos, preferiblemente entre 15 a 25 nucleótidos, más preferiblemente entre 18 o 22 nucleótidos.

30 Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso del kit del cuarto aspecto de la invención para la detección de la susceptibilidad genética a padecer miocardiopatía dilatada en un sujeto o en sus familiares.

35 Una realización preferida del quinto aspecto de la invención se refiere al uso donde el sujeto es un humano. Más preferiblemente, el sujeto es un hombre o una mujer.

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 y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIG. 1** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio al 6% tras la amplificación por PCR de tres pacientes portadores de la mutación en el nucleótido 77 del *EMD* (líneas 2 a 4) y un sujeto control no portador de la mutación (línea 5). En la línea 1 se muestra el marcador de peso molecular y en la línea 6 el control negativo de PCR (agua en lugar de ADN genómico).

**FIG. 2** Secuenciación de la amplificación del fragmento de ADN que contiene el nucleótido 77 del gen *EMD* en los sujetos afectados (17342, 17363 y 17365) o no (P1) por la mutación. El recuadro negro indica el triplete mutado en los pacientes afectados.

### EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Describimos aquí el método diagnóstico básico que puede ser realizado por medio de una pareja de primers (cebadores) y las condiciones de PCR que permiten la amplificación del fragmento de DNA en el que se localiza la mutación c.77T>C del gen *EMD*.

Se analizó la presencia de la mutación c.77T>C del gen *EMD* en 13 pacientes con MCD y en 40 familiares de estos (tanto hombres como mujeres).

La extracción de ADN de la muestra biológica del sujeto se realizó mediante un kit comercial de extracción de ADN (*Wizard® Genomic DNA Purification* de Promega). La muestra biológica fue sangre periférica.

Posteriormente, se amplificó la región del ADN que contiene el nucleótido 77 del gen *EMD* mediante el empleo de los siguientes cebadores:

Fw CTGCGCCGGTACAACAT (SEQ ID NO: 1)

Rv TCTGGGTCTCGTACTCGAAGA (SEQ ID NO: 2)

5

Para ello se preparó la mezcla de reactivos de la PCR en cantidad suficiente para (c.s.p.) todas las muestras que se iban a analizar, sin incluir el ADN del paciente en la mezcla, de la siguiente manera:

10 Tabla 1:

Reactivo	Concentración madre	Concentración final	Volumen por muestra
<i>MasterMix</i> (contiene la polimerasa Taq)	2,5x	1x	9,8µl
Primer Fw + Rv	150µM (para cada uno)	7,5µM	0,5µl de cada cebador
dH <sub>2</sub> O			c.s.p. 20µl

(dH<sub>2</sub>O: agua destilada) Finalmente se añadieron 80-100ng de ADN genómico del paciente a testar.

15

En presencia de estos cebadores se sometió al ADN del paciente a un proceso de amplificación usando un termociclador estándar.

Las condiciones de amplificación del fragmento fueron las siguientes:

Tabla 2:

Fase	Temperatura	Tiempo	
Activación polimerasa	95°C	10min	
Desnaturalización ADN	95°C	30s	} 37 ciclos
Hibridación cebadores	60°C	30s	
Extensión fragmento ADN	72°C	30s	
Elongación final	72°C	10min <sup>25</sup>	
Mantenimiento	4°C	∞	

El producto amplificado de ADN incluía el fragmento de ADN que contiene el nucleótido 77 del gen *EMD*, contando a partir del codón de iniciación de la traducción

(ATG) (figura 1) en el 100% de las muestras testadas. El fragmento de ADN amplificado tenía un peso de 242pb (pares de bases). Como control positivo utilizamos un paciente no portador de la mutación en el gen *EMD* (P1) y como control negativo, agua. Este fragmento se analizó mediante secuenciación directa (figura 2). La  
5 secuencia de nucleótidos de las muestras de ADN amplificado por PCR se realizó utilizando la técnica de BigDye® Terminator v3.1.

La mutación c.77T>C fue testada en 40 sujetos procedentes de 9 familias de sujetos con MCD y se comprobó que todos los sujetos que padecían MCD eran portadores de  
10 la mutación mientras que ningún sujeto no portador padecía MCD. En base a estos hallazgos y la ausencia de otra mutación causal en otros genes relacionados con MCD en los sujetos índice de cada familia, se considera que la mutación c.77T>C cosegrega con la enfermedad en estas familias y es causal de la cardiopatía en ellas.

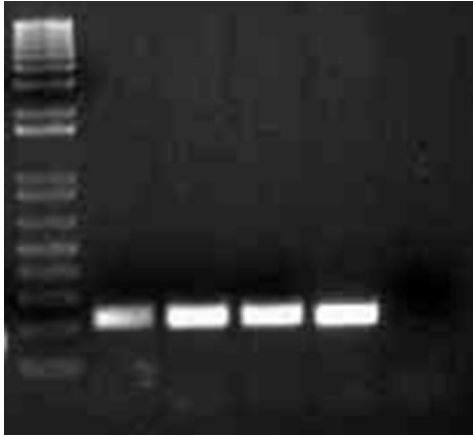
15

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para proporcionar datos para detectar la susceptibilidad genética a padecer miocardiopatía dilatada en un sujeto o en sus familiares que comprende la detección de la mutación c.77T>C del gen *EMD* en una muestra aislada.
2. Método según la reivindicación 1 donde el sujeto es un humano.
- 10 3. Método según la reivindicación 2 donde el sujeto es un hombre o una mujer.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la muestra biológica se selecciona de la lista que consiste en: tejido, sangre, plasma, suero, saliva, orina o linfa.
- 15 5. Método según la reivindicación 4 donde la muestra es fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.
- 20 6. Método *in vitro* para detectar la susceptibilidad genética a padecer miocardiopatía dilatada en un sujeto o en sus familiares que comprende la detección de la mutación c.77T>C del gen *EMD* y donde la detección de la mutación c.77T>C del gen *EMD* es indicativa de la susceptibilidad genética a padecer miocardiopatía dilatada en dicho sujeto o en sus familiares.
- 25 7. Método según la reivindicación 6 donde el sujeto es un humano.
8. Método según la reivindicación 7 donde el sujeto es un hombre o una mujer.
- 30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde la detección de la mutación c.77T>C del gen *EMD* se realiza mediante PCR, secuenciación, hibridación o cualquiera de sus combinaciones.
- 35 10. Uso *in vitro* de la mutación c.77T>C del gen *EMD* como biomarcador para la detección de la susceptibilidad genética a padecer miocardiopatía dilatada en un sujeto o en sus familiares.

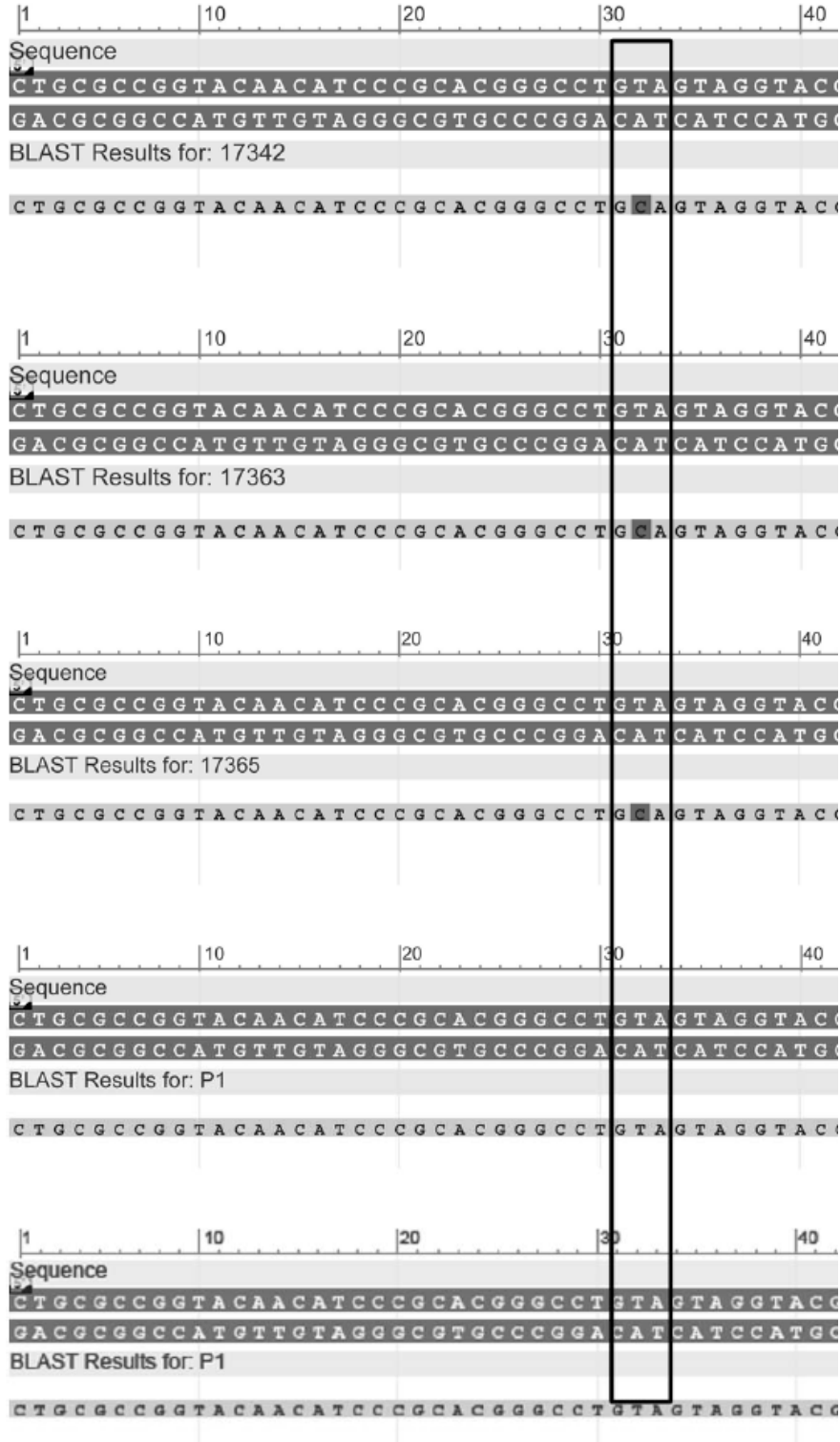
11. Kit o dispositivo que comprende los cebadores, sondas o anticuerpos específicos para la detección de la mutación c.77T>C del gen *EMD*.
- 5 12. Kit o dispositivo según la reivindicación 11 que comprende los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
13. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12 para la detección de la susceptibilidad genética a padecer miocardiopatía dilatada en un sujeto o en sus familiares.
- 10
14. Uso según la reivindicación 13 donde el sujeto es un humano.
15. Uso según la reivindicación 14 donde el sujeto es un hombre o una mujer.
- 15

Fig. 1



1 2 3 4 5 6

Fig. 2





# ES 2 582 288 A1

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundación para la investigación biomédica del Hospital Universitario  
Puerta de Hierro Majadahonda  
Fundación Centro Nacional de Investigaciones  
Cardiovasculares Carlos III

<120> Método de detección de predisposición a padecer cardiopatía  
dilatada

<130> ES3259.1

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador Fw

<400> 1

ctgcgccggt acaacat

17

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador Rv

<400> 2

tctgggtctc gtactcgaag a

21



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201530298  
②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 10.03.2015  
③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ZHANG, M. et al., 'Whole exome sequencing identifies a novel EMD mutation in a Chinese family with dilated cardiomyopathy', BMC MEDICAL GENETICS, 2014 Jul, Vol. 15, Pág 77, ISSN: 1471-2350, doi: 10.1186/1471-2350-15-77, Resultados, Figura 3; Discusión, Conclusión.	1-10, 13-15
Y	MOOK, O.R. et al., 'Targeted sequence capture and GS-FLX Titanium sequencing of 23 hypertrophic and dilated cardiomyopathy genes: implementation into diagnostics', JOURNAL OF MEDICAL GENETIC, 2013 Sep, Vol. 50, No. 9, Págs. 614-626, ISSN: 1468-6244 (Electronic), doi: 10.1136/jmedgenet-2012-101231, Métodos; Resultados, Tabla 2, Tabla 1; Discusión.	1-10, 13-15
A	GOWRISANKAR, S. et al., 'Evaluation of second-generation sequencing of 19 dilated cardiomyopathy genes for clinical applications', JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS, 2010, Vol. 12, No. 6, Págs. 818-827, ISSN: 1525-1578, doi: 10.2353/jmoldx.2010.100014, todo el documento.	1-15

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
18.07.2016

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
1/6



- ① N.º solicitud: 201530298  
 ② Fecha de presentación de la solicitud: 10.03.2015  
 ③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HARAKALOVA, M. et al., 'A systematic analysis of genetic dilated cardiomyopathy reveals numerous ubiquitously expressed and muscle-specific genes', EUROPEAN JOURNAL OF HEART FAILURE, 2015 May, Vol.17, No.5, Pags. 484-493, ISSN: 1879-0844 (Electronic), doi: 10.1002/ejhf.255, Epub: 02-03-2015, todo el documento.	1-15
A	GARCIA-PAVIA, P. et al., 'Genetics in dilated cardiomyopathy', BIOMARKERS IN MEDICINE, 2013, Vol. 7, No. 4, Págs. 517-533, ISSN: 1752-0363(print), ISSN: 1752-0371(electronic), doi: 10.2217/bmm.13.77, todo el documento.	1-15
A	WO 2012168448 A2 (FEBIT HOLDING GMBH) 13-12-2012, todo el documento.	1-15
A	BIONE, S. et al., 'Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy', NATURE GENETICS, 1994, Vol. 8, No. 4, Págs. 323-327, ISSN: 1061-4036 (print), todo el documento.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
18.07.2016

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
2/6

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: 18.07.2016

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 11-12	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-10, 13-15	<b>NO</b>

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	Zhang, M. et al., <i>BMC Med. Genet.</i> , (2014 Jul), <u>15</u> :77.	2014
D02	Mook, O.R. et al., <i>J. Med. Genet.</i> , (2013 Sep), <u>50</u> (9): 614-26.	2013
D03	Gowrisankar, S. et al., <i>J. Mol. Diagn.</i> , (2010), <u>12</u> (6): 818-27.	2010
D04	Harakalova, M. et al., <i>Eur. J. Heart Fail.</i> , (2015 May), <u>17</u> (5): 484-93.	02-03-2015
D05	García-Pavía, P. et al., <i>Biomark. Med.</i> , (2013), <u>7</u> (4): 517-33.	2013
D06	WO 2012168448 A2 (FEBIT HOLDING GMBH)	13.12.2012
D07	Bione, S. et al., <i>Nat. Genet.</i> , (1994), <u>8</u> (4): 323-7.	1994

En D01-D06 se describen diferentes biomarcadores asociados a la miocardiopatía dilatada (MCD).

En D07 se identifica y caracteriza al gen *STA* (*EMD*) y a la proteína codificada.

**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**

Se considera que D01-D02 son los documentos del estado de la técnica más próximo al objeto de la solicitud. Estos documentos afectan a la patentabilidad de las reivindicaciones tal y como se expone a continuación:

**1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).****1.1. Reivindicaciones independientes 1, 6, 10, 11 y 13.**

1.1.1. El objeto de las reivindicaciones 1 y 6 consiste en un método para detectar la susceptibilidad genética a padecer miocardiopatía dilatada (MCD) en un sujeto que comprende la detección de la mutación c.77T>C del gen *EMD* en una muestra aislada. Las reivindicaciones 10, 11 y 13 tratan del uso de la mutación c.77T>C del gen *EMD* como biomarcador para la detección de la susceptibilidad genética a padecer MCD, de un dispositivo (kit) para la detección de mutación mencionada y del uso de dicho kit para detectar la susceptibilidad genética a padecer MCD.

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D01-D07, no se ha divulgado ningún método para detectar la susceptibilidad genética a padecer MCD con las características técnicas referidas, ni el uso de la mutación c.77T>C del gen *EMD* como biomarcador de MCD, ni un dispositivo para la detección de dicha mutación. Por consiguiente, el objeto de las reivindicaciones independientes 1, 6, 10, 11 y 13, y el de las dependientes 2-5, 7-9, 12, 14 y 15 se considera nuevo sobre la base de los documentos D01-D06.

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 1-15, pues es nuevo según el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

**2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).****2.1. Reivindicaciones independientes 1, 6 y 13.**

2.1.1. El objeto de las reivindicaciones 1, 6 y 13 consiste en un método para detectar la susceptibilidad genética a padecer MCD basado en la detección de la mutación c.77T>C del gen *EMD*, y en el uso de un dispositivo (kit) para detectar tal susceptibilidad a padecer MCD.

En el estado de la técnica se han descrito mutaciones de distintos genes asociadas a MCD. Algunas de ellas se localizan en el gen *EMD*. En particular, en el documento D01 se ha descrito la mutación c.26-39del que consiste en una deleción de 14pb en el exón 1 del dicho gen (cf. D01: Resultados, Figura 3; Discusión). En D02 se describe otra mutación del gen *EMD*, en concreto la sustitución c.454C>T, identificada en un paciente con MCD (cf. D02: Resultados, Tabla 2.). Como consecuencia, se ha sugerido en el estado de la técnica el análisis rutinario de las variantes del gen *EMD* para la detección de cardiomiopatías (MCD) (cf. D01: Conclusión. D02: Métodos, Tabla 1; Discusión).

La diferencia entre los métodos y el uso de las reivindicaciones 1, 6 y 13 y los descritos en D01-D02 consiste en la variante patogénica del gen *EMD* detectada en cada caso.

El posible efecto técnico producido por dicha diferencia con relación al objetivo de detectar la susceptibilidad a padecer MCD no ha sido descrito en la solicitud por lo que se consideran los métodos y el uso de las reivindicación 1, 6 y 13 una alternativa no inventiva frente a los divulgados en D01-D02.

Por lo tanto, se estima que las reivindicaciones 1, 6 y 13, y las reivindicaciones dependientes 2-5, 7-9, 14 y 15 carecen de actividad inventiva (Art. 33(3) PCT).

## 2.2. Reivindicación independiente 10.

2.2.1. El objeto de la reivindicación 10 es el uso de la mutación c.77T>C del gen *EMD* como biomarcador para la detección de la susceptibilidad genética a padecer MCD. Por consiguiente, el problema técnico planteado es la provisión de nuevos biomarcadores para la detección de la susceptibilidad genética a padecer MCD.

En D01-D02 se han descrito mutaciones del gen *EMD* asociadas a MCD (cf. D01: Resultados, Figura 3. D02: Resultados, Tabla 2).

En la solicitud no se describe ningún efecto particular e inesperado asociado al uso de la mutación c.77T>C del gen *EMD* como biomarcador para la detección de MCD frente al uso de las mutaciones divulgadas en D01-D02. Por consiguiente, se considera que la solución propuesta en la reivindicación 10 al problema técnico planteado es una alternativa no inventiva a la planteada en el estado de la técnica.

Por lo tanto, se estima que la reivindicación 10 carece de actividad inventiva (Art. 33(3) PCT).

2.3. 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 1-10 y 13-15, pues no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.