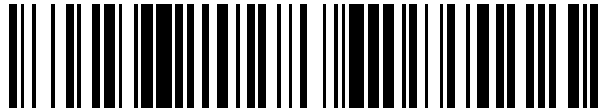


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 759**

21 Número de solicitud: 201531458

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

09.10.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.05.2017

Fecha de la concesión:

20.02.2018

45 Fecha de publicación de la concesión:

27.02.2018

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2016/070716

73 Titular/es:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (90.0%)

Avda. de la Constitucion, 18

41071 Sevilla (Sevilla) ES y

FUNDACION PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD (10.0%)

72 Inventor/es:

LÓPEZ ESCÁMEZ, José Antonio;

CABRERA MARTÍNEZ, Sonia;

ALARCÓN RIQUELME, Marta Eugenia y

REQUENA NAVARRO, María Teresa

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

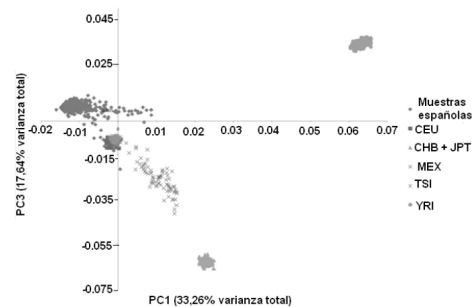
54 Título: **Uso de variantes alélicas (SNPs) en la región 6p21.33 para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la Enfermedad de Ménière.**

57 Resumen:

Uso de variantes alélicas (SNPs) en el cromosoma 6 para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento en la enfermedad de Ménière.

La presente invención describe el uso de un grupo de polimorfismos o variantes de nucleótido simple (SNP) en el cromosoma 6 para la obtención de datos útiles en el pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial, kit o dispositivos y usos.

Fig.1



ES 2 611 759 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

DESCRIPCIÓN

Uso de variantes alélicas (SNPs) en la región 6p21.33 para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la Enfermedad de Ménière.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina y la biotecnología, y se refiere a un método de obtención de datos útiles para el pronóstico y la clasificación de pacientes que sufren hipoacusia neurosensorial, y especialmente de aquellos que presentan la enfermedad de Ménière con afectación bilateral.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La enfermedad de Ménière (EM) es un trastorno crónico que afecta el oído interno caracterizado por episodios recurrentes de vértigo, inestabilidad progresiva, presión auditiva, acúfenos y pérdida de la audición. La EM no es una sola enfermedad sino un síndrome clínico común con varias causas tales con la herencia genética, la respuesta inmune o la respuesta alérgica, entre otras. Así, la EM puede afectar ambos oídos entre el 10-40% de los pacientes, lo que determina un impacto significativo sobre la audición, el desequilibrio crónico y la calidad de vida relacionada con la salud. Por este motivo, la EM bilateral se considera la forma más incapacitante de la EM, y su abordaje terapéutico es diferente, incluyendo el empleo de inmunosupresores, el implante coclear, evitando la neurectomía vestibular. Dado que se observa un incremento en el número de autoanticuerpos y una mejoría clínica con la terapia con esteroides, se ha propuesto una etiología autoinmune para esta enfermedad. Algunas variantes genéticas en genes del sistema inmune como MICA, TLR10 y NFKB1 parecen modificar el curso clínico de la enfermedad, posiblemente como resultado de una respuesta inmune innata alterada.

Las moléculas de clase I y moléculas de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Humano se han descrito como marcadores genéticos de muchas enfermedades autoinmunes. A su vez, la EM ha sido asociada con el HLA-B*27, HLA-B*44, HLA-B*13, HLA-Cw*07, HLA-DBR1*1602 y HLA-DRB1*1101 en diferentes poblaciones, sin embargo

estas asociaciones no se han replicado en otras poblaciones y no tienen utilidad diagnóstica.

Varios estudios muestran una elevada prevalencia de enfermedades autoinmunes como son la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la espondilitis anquilosante o la psoriasis en pacientes con EM, lo que sugiere una posible respuesta autoinmune alterada. Por este motivo, el estudio sistemático mediante un microarray de genotipado (ImmunoChip) de variantes localizadas en 186 loci previamente asociados con 12 enfermedades autoinmunes parece ser una forma de investigar el máximo número de variantes por muestra, lo que mejora el rendimiento diagnóstico.

10 Se han propuesto una gran variedad de tratamientos, tanto médicos como quirúrgicos, para la enfermedad de Ménière. Todos ellos con distintos resultados respecto a la remisión de los síntomas y efectos secundarios.

Dentro de los tratamientos médicos se encuentran la dieta hiposódica, antihistamínicos, diuréticos, histamina subcutánea, drogas antivertiginosas, benzodiazepinas y la terapia trans-timpánica, que ha ganado alguna popularidad en el último tiempo, especialmente en aquel grupo de pacientes que no presentan respuesta a las terapias habituales.

En algunos centros se practica desde hace algún tiempo la inyección intratimpánica de medicamentos ototóxicos, como la gentamicina, en la cavidad del oído medio. El objetivo de este procedimiento sería producir una laberintectomía médica, lo que causaría la disminución o la desaparición de los síntomas. El riesgo de este procedimiento es el deterioro de la capacidad auditiva del paciente, descrito especialmente en aquellos pacientes sometidos a regímenes de tratamiento en plazos cortos de tiempo. Los agentes más utilizados han sido, inicialmente, estreptomina y, actualmente, la gentamicina.

En casos muy graves se ha recurrido a la cirugía, tales como la laberintectomía o la neurectomía vestibular, pero este recurso empeora la calidad de vida del enfermo porque elimina no sólo los síntomas, sino también la información sensorial de los receptores vestibulares y provoca un desequilibrio crónico. Por tanto, los tratamientos actualmente

disponibles para la hipoacusia pueden ser excesivamente agresivos y pueden poner el riesgo la audición del paciente. Sería, por tanto, importante disponer de algún marcador diagnóstico y pronóstico que permitiera evaluar la idoneidad del tratamiento.

5 Sin embargo, hasta el momento no se dispone de un método o marcador biológico que nos permita un diagnóstico precoz o establecer un pronóstico sobre la pérdida de audición a largo plazo, que sea de utilidad para realizar una clasificación de los pacientes y facilite la toma de decisiones sobre el tratamiento y el seguimiento de la evolución de la enfermedad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

10 Los ejemplos de la invención muestran que las variantes de nucleótido simple rs9380217, rs4947296 y/o rs886424 en la región 6p21.33 son marcadores útiles para determinar el pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial, preferiblemente para el pronóstico de la progresión de la enfermedad de Ménière hacia la enfermedad de Ménière con afectación bilateral.

15 Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de las variantes de nucleótido simple rs9380217, rs4947296 y/o rs886424 **para la obtención de datos útiles** en el pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial es la enfermedad de Ménière.

20 Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a **un método de obtención de datos útiles** para el pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial en un individuo afectado por dicha enfermedad, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

25 a) detectar los polimorfismos o variantes de nucleótido simple rs9380217, rs4947296 y/o rs886424, en una muestra biológica aislada del individuo afectado.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende el paso del primer método de la invención, y además comprende:

- 5 b) Incluir al individuo (a) en el grupo de individuos con progresión hacia enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial bilateral cuando presenta el alelo con menor frecuencia en homocigosis para rs9380217, rs4947296 y/o rs886424.

10 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial es la enfermedad de Ménière o la enfermedad autoinmune del oído interno. Más preferiblemente la enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial es la enfermedad de Ménière.

15 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra aislada en (a) es sangre periférica, y aún más preferiblemente es el ADN genómico obtenido de sangre periférica.

En otra realización preferida de la invención, el individuo pertenece a una población de ascendencia europea, y aún más preferiblemente, de ascendencia española.

20 Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a un método, de ahora en adelante tercer método de la invención, para clasificar un individuo que padece o tiene la probabilidad de padecer una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial, preferiblemente la enfermedad de Ménière o la enfermedad autoinmune del oído interno, en uno de dos grupos, en el que el grupo 1 comprende los individuos identificables mediante el procedimiento de acuerdo con el primer método de la invención por presentar el alelo con menor frecuencia en homocigosis para rs9380217, rs4947296 y/o rs886424, y en el
25 que el grupo 2 representa al resto de los individuos.

Una realización particular de este aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende uno o más compuestos moduladores, inhibidores o antagonistas de la vía

TWEAK/Fn14, tal y como un anticuerpo o un fragmento del mismo capaz de unirse al ligando TWEAK (NF-related weak inducer of apoptosis) o bien un anticuerpo o un fragmento del mismo capaz de unirse a Fn-14 (receptor de TWEAK), para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la hipoacusia neurosensorial, preferiblemente en la enfermedad de Ménière, y más preferiblemente en aquellos pacientes pertenecientes o clasificados como grupo 1 de acuerdo al tercer aspecto de la invención. Preferiblemente, dicho anticuerpo es el anticuerpo BIIB023 (Humanized mAb against tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) (<http://www.biocentury.com/products/biib023>). Más preferiblemente, la administración de este fármaco se realiza de forma sistémica o transtimpánica.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo, preferiblemente un microarray de dos canales, un chip de oligonucleótidos de ADN, un GeneChip o un chip de ADN para genotipado, adecuado para llevar a cabo el método descrito en cualquiera de los aspectos anteriores, que comprende una superficie sólida, preferiblemente de vidrio, plástico o silicio, al que se le une o diseña al menos un oligonucleótido complementario a la secuencia SEQ ID NO: 1 o a un fragmento del mismo que comprenda la variante de nucleótido simple para rs9380217 y opcionalmente oligonucleótidos complementarios a las secuencias SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3 o fragmentos de los mismos que comprendan la variante de nucleótido simple para rs4947296 y/o para rs886424.

Preferiblemente, dicho kit es un microarray que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de las secuencias oligonucleotídicas descritas en el párrafo anterior. Más preferiblemente, dicho kit es un chip de ADN para genotipado.

Un aspecto adicional de la presente invención, se refiere al uso de un kit o un dispositivo según el cuarto aspecto de la invención, para el pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial. Preferiblemente, la enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial es la enfermedad de Ménière o la enfermedad autoinmune del oído

interno. Más preferiblemente, la enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial es la enfermedad de Ménière unilateral.

Otro aspecto de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador
5 lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

10 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Diagrama de dispersión que muestra el análisis de componentes principales (PCA) de los marcadores genéticos en nuestras muestras españolas en comparación con las diferentes poblaciones de HapMap. Los valores propios correspondientes a los tres primeros componentes principales explicaron la mayor parte de la subestructura de la
15 población en este análisis (77,5%). Todas las personas que no estaban incluidas con el grupo principal (>3 desviaciones estándar de la agrupación centro) se excluyeron del análisis posterior. Con este método se identificaron un total de 48 individuos atípicos en nuestra cohorte de casos y controles. El eje X representa Componente Principal 1 (PC1) y el eje Y representa Componentes Principales 3 (PC3) en nuestras muestras españolas
20 (diamantes), y las principales poblaciones del HapMap: CEU (cuadrados), CHB + JPB (triángulos), MEX (cruces), TSI (asteriscos) y YRI (círculos).

Fig. 2. Datos de las variantes rs9380217 y rs4947296 que muestran que están en desequilibrio de ligamiento (r^2 y distancia en bases entre SNPs).

Fig. 3. Intensidad normalizada de la señal correspondiente a los genotipos de las variantes
25 rs9380217, rs4947296 y rs886424 mediante el microarray de genotipado empleado en el iSCAN.

Fig. 4. Curvas Característica Operativa del Receptor (ROC) para predecir HNS bilateral con las variantes rs9380217, rs886424 y la historia de enfermedad autoinmune.

Fig. 5. Heat map para la vía TWEAK/Fn14, que representa el perfil de expresión génica (fold change) de los genes implicados para cada individuo.

5 **Fig. 6.** Heat map para la vía de ubiquitinación de proteínas, que representa el perfil de expresión génica (fold change) de los genes implicados para cada individuo.

Fig. 7. Perfil de expresión génica (fold change) de los genes implicados para cada individuo.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método de obtención de datos útiles para el pronóstico de la enfermedad de Ménière, así como para evaluar el riesgo genético de la progresión de la enfermedad de unilateral hacia bilateral permitiendo optimizar el seguimiento, la planificación del tratamiento y el consejo genético. Los autores de la
15 presente invención son los primeros en demostrar la asociación de tres variantes en el cromosoma 6 situadas en coordenadas genómicas específicas, que determinan un riesgo de progresión bilateral en la enfermedad de Ménière. Dichas variantes tienen una frecuencia baja (0,09 para rs9380217 y rs4947296, 0,05 para rs886424) en la población general y en los pacientes tienen una gran utilidad para establecer el pronóstico de
20 progresión de la hipoacusia con una elevada rentabilidad diagnóstica. Por tanto, la presencia de las variantes alélicas determina un riesgo elevado para el desarrollo de hipoacusia bilateral en la enfermedad de Ménière en la población española y en la población de descendencia europea.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso in vitro de las variantes de
25 nucleótido simple rs9380217, rs4947296 y/o rs886424 como indicador o como

biomarcador; en concreto este indicador o biomarcador se utilizará para la obtención de datos útiles en el pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial.

La región donde se encuentran estas variantes corresponde a una zona de unión de los factores de transcripción CTCF y CEBPB, que actúan regulando la expresión de genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial es la enfermedad de Ménière.

En esta memoria se entiende por “hipoacusia neurosensorial” la disminución del nivel de audición por debajo de 30dB en al menos 2 frecuencias consecutivas en 250, 500, 1000, 2000, 4000 o 8000 Hz en la audiometría tonal liminar.

En el estado del arte se conocen varios métodos para medir si existe o no pérdida del nivel de audición, y en qué grado, como por ejemplo, pero sin limitarnos a, la audiometría tonal liminar o los potenciales evocados auditivos de tronco cerebral.

Se determina mediante audiometría con tonos puros. La hipoacusia puede presentarse en uno o ambos oídos y puede ser súbita o brusca, rápidamente progresiva (semanas o meses) o lentamente progresiva (meses o años). La hipoacusia neurosensorial afecta al oído interno y, se produce cuando los elementos neurosensoriales cocleares o el nervio coclear se lesionan de algún modo, por medios físicos o de otra naturaleza.

En esta memoria se entiende por “hipoacusia neurosensorial unilateral” cuando el efecto se produce sólo en un oído e “hipoacusia neurosensorial bilateral” cuando el efecto se produce en ambos oídos.

La cóclea es el órgano fundamental de audición situado en el oído interno, con forma de conducto enrollado en espiral y, que contiene el órgano de Corti, donde se transforman las vibraciones mecánicas en impulsos nerviosos que, a través del nervio auditivo, llegan al cerebro para ser identificados. Cuando las células del órgano de Corti y/o el nervio auditivo se ven afectadas, se interrumpe la transmisión de los sonidos. Cualquiera de

estas delicadas estructuras pueden verse afectadas por diferentes procesos infecciosos, inflamatorios, tóxicos o degenerativos, siendo de todos ellos el ruido intenso y los procesos degenerativos, los responsables de la mayor parte de las sorderas de percepción.

5 Según el órgano afectado pueden clasificarse en:

- *Endococleares*: Cuando está afectado el oído interno.
- *Retrococleares*: Cuando está afectado el nervio auditivo.

10 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la hipoacusia neurosensorial se selecciona de la lista que consiste en: hipoacusia súbita, hipoacusia rápidamente progresiva, hipoacusia lentamente progresiva, hipoacusia neurosensorial con afectación de bajas frecuencias, enfermedad inmuno-mediada del oído interno, o cualquiera de sus combinaciones.

15 En otra realización preferida, la hipoacusia neurosensorial además se asocia a crisis de vértigo recurrente. En otra realización aún más preferida, la enfermedad asociada a la hipoacusia neurosensorial es la enfermedad de Ménière. En otra realización más preferida, las regiones del genoma que contienen las variantes alélicas de susceptibilidad son las que corresponden a las coordenadas genómicas de la Tabla 1.

Tabla 1. Coordenadas genómicas de las variantes que forman el panel diagnóstico de riesgo de la enfermedad de Ménière.

SNP	Cromosoma	Posición Genoma Humano (GRCh38/hg38)	Alelos (1)	Localización
rs9380217	6	31083776	C/T	Intergénica
rs4947296	6	31090401	T/C	Intergénica
rs886424	6	30814225	C/T	Intergénica

20

(1) El primer alelo es el alelo mayor y la referencia en la secuencia de consenso, mientras que el segundo alelo es el alelo menor y la variante de susceptibilidad.

En el contexto de la presente invención, estas variantes se definen también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótidos, que se definen en las siguientes secuencias:

Chr6:31083776, rs9380217 = SEQ ID NO: 1

TCTTCTCTGCTCTGATTCTTCCTAT[C/T]CCTCAGAAACCCAAGGCCTCCTTAG

5 SEQ ID NO 1: TCTTCTCTGCTCTGATTCTTCCTATTCCTCAGAAACCCAAGGCCTCCTTAG

chr6:31090401, rs4947296 = SEQ ID NO: 2

CACACAAGAGCAAAAAAGGACGCAA[T/C]GAAATATGGAACTAGTGAATGGAA

SEQ ID NO 2: CACACAAGAGCAAAAAAGGACGCAACGAAATATGGAACTAGTGAATGGAA

Chr6: 30814225, rs886424 = SEQ ID NO: 3

10 CAACTCCAATGTCACCTGCTCCTCA[C/T]CTGTACCCAGTGGACTTTTTTGGCA

SEQ ID NO 3: CAACTCCAATGTCACCTGCTCCTCATCTGTACCCAGTGGACTTTTTTGGCA

Se hace notar que el polimorfismo rs886424 se encuentra en la hebra complementaria a la hebra de la cual hemos seleccionado la SEQ ID NO 3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs886424>).

15 Secuencias variantes de cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 1 a 3 que contengan el polimorfismo y que se encuentren acortadas o alargadas en algunos nucleótidos se encontrarían dentro del ámbito de la presente invención. En este sentido, preferiblemente las SEQ ID NO 1 a 3 se podría acortar en un máximo de 5 nucleótidos, preferiblemente la SEQ ID NO 1 y 3 se podrían acortar en un máximo de 5 nucleótidos en
20 el lado 3' y la secuencia 2 se podría acortar en un máximo de 5 nucleótidos en el lado 5'.

MÉTODOS DE LA INVENCIÓN

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial en un

individuo que padece dicha enfermedad, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

- 5 a) detectar la presencia o no de los polimorfismos o variantes de nucleótido simple rs9380217, rs4947296 y/o rs886424 en una muestra biológica aislada de dicho individuo.

Es decir, el paso (a) consiste en detectar los polimorfismos o variantes de nucleótido simple que se seleccionan de la lista que consiste en rs9380217, rs4947296 y/o rs886424. La detección de la presencia de los polimorfismos o variantes de nucleótido simple del paso a), puede hacerse por cualquier método conocido en el estado de la técnica, por ejemplo, pero sin limitarse a, mediante secuenciación de ADN, electroforesis capilar, espectrometría de masas, polimorfismo de conformación de cadena simple (del inglés, “single-strand conformation polymorphism o SSCP”), análisis electroquímico, HPLC desnaturizante en gel de electroforesis, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (en inglés, restriction fragment length polymorphism o RFLPs), y análisis de hibridación en microarrays de genotipado.

10
15

Otro aspecto de la invención se refiere a un método, de ahora en adelante segundo método de la invención, de pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial que comprende el paso (a) del primer método de la invención, y además comprende: b) Incluir al individuo (a) en el grupo de individuos con progresión de la enfermedad hacia hipoacusia neurosensorial bilateral cuando presenta el alelo con menor frecuencia en homocigosis para rs9380217, rs4947296 y/o rs886424. Es decir, serían los genotipos TT para rs9380217, CC para rs4947296 y/o TT para rs886424.

20

El paso (a) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección en el paso a) o la comparación computarizada en el paso (b).

25

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial es la enfermedad de Ménière o la enfermedad autoinmune del oído interno.

Una "muestra biológica aislada" incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada es sangre periférica, y/o comprende células mononucleares de sangre periférica (peripheral blood mononuclear cells PBMCs), más preferiblemente mononucleares. Más preferiblemente, la muestra aislada es el ADN genómico, y más preferiblemente obtenido de sangre periférica.

En otra realización preferida de la invención, el individuo pertenece a una población de ascendencia europea, y aún más preferiblemente, de ascendencia española.

10 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la hipoacusia neurosensorial es unilateral.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la hipoacusia neurosensorial se selecciona de la lista que consiste en: hipoacusia súbita, hipoacusia rápidamente progresiva, hipoacusia lentamente progresiva, hipoacusia neurosensorial con afectación de bajas frecuencias, enfermedad inmuno-mediada del oído interno, o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización preferida, la hipoacusia neurosensorial además se asocia a crisis de vértigo recurrente.

El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente humanos. El término "individuo" no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "variante" se refiere a una secuencia sustancialmente homóloga a la secuencia de los genes que contienen las variantes descritas. En general, una variante incluye adiciones, eliminaciones o sustituciones de nucleótidos. Más preferiblemente, las variantes descritas hacen referencia al cambio o sustitución de un nucleótido de la secuencia en el genoma humano de referencia en las posiciones descritas.

El término “polimorfismo” se refiere a una variación en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico donde cada secuencia posible está presente en una proporción igual o superior a un 1% en una población; en un caso particular, cuando dicha variación es la secuencia nucleotídica ocurre en un sólo nucleótido (A, C, T o G) se denomina SNP.

- 5 El término “mutación génica” se refiere a una variación en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico donde cada secuencia posible está presente en una proporción inferior al 1% en una población.

Los términos “variante alélica” o “alelo” se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a un polimorfismo que ocurre en un mismo locus en una misma población.

10

El término “variación génica” o “variante génica”, tal y como se utiliza en la presente descripción, incluye a las mutaciones, polimorfismos y variantes alélicas. Una variación o variante génica se encuentra entre individuos dentro de las poblaciones y entre las poblaciones dentro de las especies.

- 15 El término “pronóstico”, tal y como se utiliza en la presente invención, a la capacidad de discriminar entre individuos que presentan mayor o menor riesgo a padecer hipoacusia neurosensorial bilateral, y más preferiblemente, al mayor o menor riesgo a padecer la enfermedad de Ménière Bilateral o al mayor o menor riesgo a padecer la enfermedad autoinmune del oído interno.

- 20 A su vez, atendiendo al método de la presente invención, se podrían establecer otras subclasificaciones dentro de esta principal, facilitando, por tanto, la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos adecuados. Esta discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor significación P, test de Student o funciones discriminantes de Fisher, medidas no

25

paramétricas de Mann Whitney, correlación de Spearman, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos de 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 5 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la predisposición a la enfermedad o la enfermedad de forma diferencial en al menos el 60%, más preferiblemente en al menos el 70%, mucho más preferiblemente en al menos el 80%, o aún mucho más preferiblemente en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a un método, tercer método de la invención, para clasificar un individuo que padece o tiene la probabilidad de padecer una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial, preferiblemente la enfermedad de Ménière o la enfermedad autoinmune del oído interno, en uno de dos grupos, en el que el grupo 1 comprende los individuos identificables mediante el procedimiento de acuerdo con el 15 primer método de la invención por presentar el alelo con menor frecuencia en homocigosis para rs9380217, rs4947296 y/o rs886424, y en el que el grupo 2 representa al resto de los individuos.

Una realización particular de este aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende uno o más compuestos moduladores, inhibidores o antagonistas de la vía 20 TWEAK/Fn14, tal y como un anticuerpo o un fragmento del mismo capaz de unirse al ligando TWEAK (NF-related weak inducer of apoptosis) o bien un anticuerpo o un fragmento del mismo capaz de unirse a Fn-14 (receptor de TWEAK), para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la hipoacusia neurosensorial, en aquellos pacientes pertenecientes o clasificados como pertenecientes al grupo 1 de acuerdo al 25 tercer aspecto de la invención.

KIT O DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO Y USOS

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de pronóstico de la invención, capaz de detectar el alelo con menor frecuencia

en homocigosis para rs9380217, rs4947296 y/o rs886424. Es decir, capaz de detectar los genotipos TT para rs9380217, CC para rs4947296 y/o TT para rs886424. Preferiblemente dicho kit comprende al menos un oligonucleótido, que incluya la secuencia y/o la complementaria, a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, preferiblemente el kit comprende al menos un oligonucleótido complementario por cada una de las secuencias SEQ. ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3.

Dicho kit o dispositivo puede contener todos aquellos reactivos necesarios para analizar los polimorfismos o variantes de nucleótido simple de la invención por medio de cualquiera de los métodos existentes en el estado de la técnica y/o descritos en este documento. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención.

Es también posible que el(los) oligonucleótido(s) estén inmovilizados en manchas sobre una superficie (preferiblemente sólida). En una de sus realizaciones, el kit comprende una micromatriz, o micromatriz de la invención. Una micromatriz de ARN es una matriz sobre un sustrato sólido (normalmente un porta de vidrio o una celda de una película fina de silicio) que evalúa grandes cantidades de diferentes ARN que son detectables mediante sondas específicas inmovilizadas sobre manchas sobre un sustrato sólido. Cada mancha contiene una secuencia específica de ácido nucleico, normalmente una secuencia de ADN, como sondas (o indicadores). Aunque el número de manchas no está limitado de manera alguna, existe una realización preferida en la que la micromatriz se personaliza para los procedimientos de la invención. En una realización, dicha matriz personalizada comprende cincuenta manchas o menos, tal como treinta manchas o menos, incluyendo veinte manchas o menos. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una micromatriz que comprende oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia conocida de los polimorfismos o variantes de nucleótido simple de la invención. En otra realización aún más preferida, la secuencia conocida de los polimorfismos o variantes de nucleótido

simple de la invención es la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

Otro aspecto de la invención se refiere a un microarray, de ahora en adelante microarray de la invención, que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3.

Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos son construidas en la superficie de un chip mediante el elongamiento secuencial de una cadena en crecimiento con un sólo nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3' mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o virtual.

Así, las sondas oligonucleótidos pueden ser de entre 10 y 100 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 20 y 70 nucleótidos, y aún más preferiblemente, de entre 24 y 30 nucleótidos. Para la cuantificación de la expresión génica, preferiblemente se emplean aproximadamente unos 40 oligonucleótidos por gen.

La síntesis in situ sobre un soporte sólido (por ejemplo, vidrio), podría hacerse mediante tecnología chorro de tinta (ink-jet), lo que requiere sondas más largas. Los soportes podrían ser, pero sin limitarse, filtros o membranas de NC o nylon (cargadas), silicio, o Portas de vidrio para microscopios cubiertos con aminosilanos, polilisina, aldehídos o epoxy. La sonda es cada una de las muestras del chip. El target es la muestra a analizar: RNA mensajero, RNA total, un fragmento de PCR, etc.

Las "condiciones de amplificación" o "condiciones de extensión" se refieren indistintamente a condiciones bajo las cuales una polimerasa puede añadir nucleótidos al extremo 3' de un polinucleótido. Dichas condiciones de amplificación o extensión son muy conocidas en la técnica (Sambrook y Russell, 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, 1987-2007, John Wiley & Sons.)

El término "cebador" tal y como se utiliza en la presente memoria, es conocido por el experto en la materia y se refiere a "compuestos oligoméricos", principalmente "oligonucleótidos" aunque también "oligonucleótidos modificados", que son capaces de "cebar" la síntesis del ADN mediante una ADN polimerasa dependientes de molde, es decir, el extremo 3' del, por ejemplo, oligonucleótido, proporciona un grupo 3'-OH libre en el que pueden unirse "nucleótidos" adicionales por una ADN polimerasa dependiente de molde, estableciendo un enlace 3' a 5' fosfodiéster en el que se utilizan desoxinucleósidos-trifosfato y en el que se libera pirofosfato. Por lo tanto, no existe, excepto para la función pretendida, ninguna diferencia fundamental entre un "cebador", un "oligonucleótido" o una "sonda" según la invención.

Según la invención, un "compuesto oligomérico" es un compuesto que consiste de "unidades monoméricas" que pueden ser "nucleótidos" solos o "compuestos no naturales" (ver posteriormente), más específicamente "nucleótidos modificados" (o "análogos de nucleótidos") o "compuestos no nucleótidos", solos o en combinaciones de los mismos. Los "oligonucleótidos" y "oligonucleótidos modificados" (o "análogos oligonucleótidos") son subgrupos de "compuestos oligoméricos" en el contexto de la invención.

En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleótido" se refiere a "polinucleótidos" formados a partir de una pluralidad de "nucleótidos" a modo de la "unidad monomérica", es decir, un "oligonucleótido" pertenece a un subgrupo específico de un "compuesto oligomérico" o "compuesto polimérico" de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) con "unidades monoméricas". Se hace referencia comúnmente a los grupos fosfato como formadores del esqueleto internucleósido del "oligonucleótido". El enlace normal del esqueleto de ARN o ADN es un enlace 3' a 5' fosfodiéster.

Los "oligonucleótidos" y "oligonucleótidos modificados" según la invención pueden sintetizarse tal como se describe principalmente en la técnica y que resulta conocido para el experto en la materia. Los métodos para preparar compuestos oligoméricos de secuencias específicas son conocidos de la técnica, y entre ellos se incluyen, por ejemplo, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Entre los

métodos de síntesis química pueden incluirse, por ejemplo, el método del fosfotriéster descrito por Narang S.A. et al., 1979, *Methods in Enzymology* 68,90-98, el método del fosfodiéster de Brown E.L. et al., 1979, *Methods in Enzymology* 68, 109-151, el método de la fosforamidita dado a conocer en Beaucage et al., 1981, *Tetrahedron Letters* 22:1859, y
 5 el método del H-fosfonato dado a conocer en Garegg et al., 1985, *Chem. Scr.* 25:280-282, y el método del soporte sólido dado a conocer en la patente US nº 4.458.066.

Tal como se ha indicado anteriormente, un "ácido nucleico", así como el "ácido nucleico diana", es un compuesto polimérico de "nucleótidos", tal como es conocido por el experto en la materia. Se utiliza en la presente memoria para referirse a un "ácido nucleico" en
 10 una muestra que debe analizarse, es decir, la presencia, no presencia o cantidad del cual debe analizarse en una muestra.

La expresión "secuencia (de ácidos nucleicos) complementaria de una secuencia de ácidos nucleicos" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que la secuencia (de ácidos nucleicos) complementaria a la que se hace referencia es exactamente el
 15 complemento (inverso) de la secuencia de ácidos nucleicos.

Una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender las cinco bases que aparecen biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de las cinco que aparecen biológicamente. Estas bases pueden servir para distintos propósitos, por ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para estimular o
 20 inhibir la degradación de la sonda; o como puntos de unión para restos detectables o restos de apantallamiento. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener uno o más restos de bases modificadas, no estándar, derivatizados, incluyendo, pero sin limitarse a, N6- metil-adenina, N6-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina,
 25 xantina, 4-acetilcitosina, 5- (carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5- carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1- metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2- metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5- metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-
 30 manosilqueosina, 5'- metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-

isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo (es decir, timina), éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina, y 5-propinil pirimidina. Otros ejemplos
5 de restos de bases modificados, no estándar, o derivatizados pueden encontrarse en las Patentes de EEUU Nos. 6.001.611; 5.955.589; 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525; y 5.679.785. Además, una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender uno o más restos de azúcares modificados incluyendo, pero sin limitarse a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa.

10 "Temperatura de fusión de la hibridación" o "Tm" se refiere a la temperatura bajo condiciones especificadas a la que un dúplex de polinucleótido está en un 50% en forma de cadena única y 50% en forma de cadena doble. Hay programas informáticos fácilmente disponibles para calcular Tm.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un kit o un dispositivo de la invención, o
15 de un microarray de la invención, para el pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial es la enfermedad de Menière. En otra realización preferida de este aspecto de la invención la hipoacusia neurosensorial es unilateral.

20 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la hipoacusia neurosensorial se selecciona de la lista que consiste en: hipoacusia súbita, hipoacusia rápidamente progresiva, hipoacusia lentamente progresiva, hipoacusia neurosensorial con afectación de bajas frecuencias, enfermedad inmunomediada del oído interno, o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización preferida, la hipoacusia neurosensorial además se
25 asocia a crisis de vértigo recurrente.

Otro aspecto de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención (del primer o del segundo método de la invención).

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medio de almacenamiento legible comprende al menos una secuencia comprendida en las sondas de secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

5 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el medio de almacenamiento legible además comprende los elementos necesarios para detectar las variantes rs9380217, rs4947296 y/o rs886424.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de al menos una secuencia conocida o un ARNm comprendido cualquiera de las sondas de la invención.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos pueden ser construidas en la superficie un chip mediante el elongamiento secuencial de una cadena en crecimiento con
15 un solo nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3' mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o virtual.

La síntesis in situ sobre un soporte sólido (por ejemplo, vidrio), podría hacerse mediante
20 tecnología chorro de tinta (ink-jet), lo que requiere sondas más largas. Los soportes podrían ser, pero sin limitarse, filtros o membranas de NC o nylon (cargadas), silicio, o Portas de vidrio para microscopios cubiertos con aminosilanos, polilisina, aldehídos o epoxy. La sonda es cada una de las muestras del chip. El target es la muestra a analizar: RNA mensajero, RNA total, un fragmento de PCR, etc.

25 Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA). Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y

“proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

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

10

EJEMPLOS DE LA INVENCION

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores.

Materiales y Métodos

15 Sujetos y muestras

El presente estudio incluyó una cohorte inicial de un total de 716 pacientes con la enfermedad de Ménière y 898 controles de España. La segunda cohorte de replicación estaba formada por 218 pacientes con enfermedad de Ménière Bilateral y 898 controles españoles. Las muestras fueron reclutadas entre enero de 2007 y Mayo de 2015.

20 Criterios de inclusión: los pacientes fueron diagnosticados después de la escala de diagnóstico de la Academia Americana de Otorrinolaringología-Cirugía de Cabeza y Cuello (AAO-HNS) (Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Menière’s disease. American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Foundation, Inc. Otolaryngol Head Neck Surg. 1995. 113, 181–185).

25 Se utilizaron controles de calidad sobre las muestras de los individuos para excluir aquellos que no superaron los filtros de calidad (eliminación de muestras duplicadas o familiares, valores extremos en la estructura genética de la población mediante el análisis

de componente principal, valores extremos en análisis de heterocigosidad, valores muy bajos de call rate).

Un examen básico neurotológico incluyendo la audiometría de tonos puros, nistagmo en posición primaria, nistagmo evocado por la mirada, nistagmo de agitación cefálica y prueba calórica estándar se realizó en todos los pacientes.

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki para la investigación con seres humanos. El Comité de Ética de la Investigación Clínica de Almería aprobó el protocolo de investigación. El ADN genómico se aisló de las células mononucleares de sangre periférica mediante el QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen). Todos los pacientes e individuos sanos dieron su consentimiento informado para el estudio.

Ejemplo 1. Genotipado mediante Inmunochip

El ImmunoChip es un microarray de genotipado que contiene 196524 variantes (718 inserciones/deleciones y 195806 SNPs). Estas variantes se concentran en 186 loci distintos que han sido confirmados en estudios de asociación genómica previos ($p < 10^{-8}$) en una o varias enfermedades autoinmunes. Estas regiones contienen variantes comunes y raras (MAF < 1%) e incluyen todas las variantes conocidas en la base de datos dbSNP, el proyecto 1000 Genomas (versión Febrero 2010) y datos adicionales de secuenciación proporcionados por los colaboradores.

Las muestras fueron genotipadas mediante el array de alta densidad descrito de Illumina 200K Infinium siguiendo el protocolo del fabricante en el Centro de Genómica e Investigación Oncológica (Genyo) Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía.

Las muestras se agruparon mediante el algoritmo de la plataforma Genome Studio de Illumina. Los genotipos fueron revisados y validados manualmente y los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) con indicadores de baja calidad (call frequency < 0.98, separación de clusters < 0.4) fueron eliminados. Todos los SNPs con puntuaciones Gencall menores de 0,15 fueron excluidos. Los controles de calidad del genotipado fueron estrictos e incluyeron la eliminación de SNPs con frecuencia alélica (MAF) < 0,05, no ajustados al equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) < 0,0001 o diferencias en call rate entre

casos y controles $p < 10^{-8}$. Después de los controles de calidad, se mantuvieron 96899 SNPs con $MAF > 0,05$.

El análisis genético para identificar las variantes asociadas se realizaron mediante el programa informático PLINK v1.0.7. El análisis del componente principal (PCA) ha permitido definir los grupos de poblaciones dentro de la subestructura de las muestras analizadas. Para esto, hemos empleado los programas STRUCTURE y EIGENSTRAT para definir los grupos principales entre los datos, las proporciones de individuos en cada clúster y los marginales. Todos los individuos que no se agruparon con el clúster ancestral principal europeo (desviación > 3) fueron excluidos del análisis posterior.

10 Para evaluar la inflación de las pruebas estadísticas, después de excluir los marginales, primero comparamos el valor de χ^2 del modelo genético aditivo con su distribución teórica, utilizando un gráfico cuantil-cuantil (Q-Q) para analizar los resultados observados frente a los esperados de la prueba estadística Z bajo la hipótesis nula de ausencia de asociación a lo largo del genoma. Entonces, procedimos con el análisis de datos. El modelo aditivo se utilizó como modelo primario de inferencia, a menos que la prueba de ajuste a este modelo fuese significativa. En este caso, utilizamos el valor de P más bajo para el modelo aditivo, dominante o recesivo.

La aproximación a la corrección por comparaciones múltiples combina métodos estadísticos para reducir la tasa de error tipo I con la replicación. El análisis de regresión logística se realizó para determinar la asociación empleando el PCA de la matriz de genotipos y la proporción de ancestría como covariables, teniendo en cuenta la estructura de la población.

La primera fase de estos análisis se realizó con los datos de genotipado.

Resultados

25 El análisis del componente principal (PCA) mostró que los casos y controles tenían una distribución similar de los dos principales vectores que se eligieron en ambos grupos, lo que indica un fondo genético común en los individuos de este estudio y ausencia de estratificación en la población analizada (Fig. 1).

Ningún marcador alcanzó una significación a nivel genómica ($p < 10^{-8}$) cuando todos los casos y controles fueron comparados. Si bien, dos regiones genómicas mostraron un elevado número de SNP con $p < 10^{-4}$ en el subgrupo de bilaterales. Estas regiones fueron utilizadas como loci candidatos para replicación. Se utilizaron los siguientes criterios para seleccionar los SNPs para la replicación: p-value, odd ratio, e-QTL (expression quantitative trait loci), MAF (frecuencia alélica menor), información de la plataforma Regulome (<http://regulomedb.org/>) y datos de desequilibrio de unión. Para llevar a cabo la replicación se seleccionaron SNPs representativos de cada haplobloque: 3 SNPs (rs4988957, rs11465670 y rs4851589) en el cromosoma 2 y 3 SNPs (rs9380217, rs886424 y rs1150754) en el cromosoma 6. Los resultados de la replicación y del meta-análisis se describen en la tabla 2.

Se replicaron un total de 7 SNPs, de los que solo uno de ellos (rs9380217) presentaba asociación significativa en la cohorte de replicación, para validar este resultado se seleccionó y replicó otro SNP (rs4947296) localizado en el mismo haplobloque, confirmando la asociación con la región 6p21.33 (chr6: 31081878-31090401) de un tamaño aproximado de 10 kb.

El siguiente paso fue elaborar un modelo de regresión logística para predecir el riesgo de desarrollar EM bilateral. Para decidir los posibles factores que deben ser incluidos como covariables en dicho modelo, utilizamos una muestra aleatoria incluyendo el 70% de los individuos para construir el modelo, y el 30 % de los pacientes restantes se utilizaron para su validación.

En primer lugar, se identificaron las variables clínicas asociadas significativamente con HNS bilateral mediante regresión logística univariante seguido de una regresión por pasos para seleccionar las variables que finalmente serían incluidas en el modelo. A continuación, la regresión logística binaria se utilizó para identificar las variables de forma independiente asociadas con HNS bilateral mediante el ajuste de bondad de Hosmer-Lemeshow. El coeficiente de determinación R^2 de Nagelkerke, resume la proporción de la varianza en la variable dependiente asociada con las variables. Se generaron curvas ROC para determinar la capacidad de predecir HNS bilateral en un modelo compuesto por rs9380217 y luego un modelo que incluye adicionalmente rs 886424 y la variable clínica

de presencia de enfermedad autoinmune. Finalmente, calculamos las áreas bajo las curvas para ambos modelos.

El modelo de regresión final presenta las siguientes variables independientes: enfermedad autoinmune, las variantes alélicas rs9380217 y rs886424 (Hosmer–Lemeshow test, p=0.980; Tabla 2). El coeficiente de determinación R² de Nagelkerke, indica que un 3,7 % de la varianza en la variable dependiente está asociada con las variables. La validez del modelo predictivo se probó en el restante 30% de los pacientes. La precisión del modelo fue 59 % en los casos seleccionados para crear el modelo y 61% en los casos empleados para su validación.

10 La capacidad del modelo para predecir la evolución hacia HNS bilateral se evaluó mediante el trazado de curvas ROC utilizando la variables clínicas del modelo con o sin el SNPs rs9380217. El área bajo la curva (AUC) fue de 0,601 (IC 95%, 0,562-0,640) para el modelo que incluye rs9380217, rs886424 y presencia de enfermedad autoinmune.

También se evaluó la relación de los genotipos de cada variante con la variable caso bilateral/ control mediante tablas de contingencia, los resultado se muestran en la tabla 3.

Los resultados muestran que las variantes alélicas rs9380217, rs4947296, rs886424 situadas en la región 6p21.33 y la coexistencia de enfermedad autoinmune permiten predecir el pronóstico auditivo de los pacientes con enfermedad de Ménière unilateral hacia bilateral.

20 Estos hallazgos indican que los pacientes con enfermedad de Ménière e hipoacusia unilateral y bilateral tienen una arquitectura genética diferente y eso explica que los pacientes con hipoacusia neurosensorial bilateral y enfermedad de Ménière presenten más frecuentemente comorbilidad autoinmune.

La autoinmunidad ha sido propuesta como un mecanismo en los pacientes con enfermedad de Ménière bilateral y aunque los estudios de genes candidatos encontraron que la enfermedad bilateral estaba asociada con variantes alélicas de los genes HLA-DRB1, y PTPN22, estos hallazgos no han sido replicados en nuestro estudio que incluye 357

pacientes con enfermedad de Ménière bilateral y es la mayor muestra estudiada hasta la fecha de hoy.

En general, los datos indican que variantes alélicas en algunos genes de la respuesta inmune innata como TLR10 y NFKB1 podrían actuar como genes reguladores capaces de modificar la progresión clínica de la hipoacusia en la enfermedad de Menière.

Tabla 2: Resultados de la replicación y del meta-análisis. Cohorte-IC (genotipado por ImmunoChip): 161 casos/898 controles. Cohorte-TQ (genotipado por Taqman): 218 casos/896 controles. Meta-análisis-IC+TQ: 357 casos/1794 controles.

		CASOS	CONTROLES	P_VALUE	OR (95%)
rs4988957	IC	0,4141	0,3576	5,24E-02	1,27(0,997-1,617)
chr2:102351615	TQ	0,3801	0,3549	1,88E-01	1,071(0,930-1,233)
	IC+TQ	0,4065	0,3503	2,91E-03	1,160(1,049-1,831)
rs11465670	IC	0,1564	0,0928	5,02E-04	1,812(1,291-2,543)
chr2:102417980	TQ	0,0867	0,0831	4,41E-01	1,043(0,731-1,489)
	IC+TQ	0,1203	0,0872	4,52E-03	1,380(1,099-1,734)
rs4851589	IC	0,3374	0,2792	3,35E-02	1,315(1,021-1,693)
chr2:102460685	TQ	0,2474	0,2578	3,61E-01	0,960(0,794-1,160)
	IC+TQ	0,2988	0,2665	4,53E-02	1,121(0,988-1,272)
rs9380217	IC	0,1389	0,0734	9,30E-05	2,034(1,416-2,923)
chr6:31083776	TQ	0,1052	0,0767	3,52E-02	1,371(0,998-1,884)
	IC+TQ	0,1291	0,0732	1,00E-06	1,763(1,411-2,202)
rs4947296	IC	0,1366	0,0716	8,83E-05	2,05(1,423-2,954)
chr6:31090401	TQ	0,1071	0,0792	4,73E-02	1,352(0,976-1,874)
	IC+TQ	0,1288	0,0741	4,00E-06	1,741(1,388-2,185)
rs886424	IC	0,1019	0,0509	3,55E-04	2,111(1,389-3,208)
chr6:30814225	TQ	0,0818	0,0703	2,55E-01	1,143(0,807-1,619)
	IC+TQ	0,0949	0,0673	7,73E-03	1,410(1,086-1,832)
rs1150754	IC	0,1166	0,0607	2,66E-04	2,04(1,381-3,014)
chr6:32082981	TQ	0,0892	0,0671	2,35E-01	1,159(0,813-1,653)
	IC+TQ	0,0963	0,0706	1,34E-02	1,364(1,053-1,765)

Tabla 3: Modelo de regresión que presenta las siguientes variables independientes: enfermedad autoinmune, las variantes alelicas de rs9380217 y rs886424 (Hosmer-Lemeshow test, p=0.980)

	B	S.E.	Wald	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)		p value
					Lower	Upper	
rs9380217	0,765	0,181	17,884	2,149	1,508	3,064	2,30E-05
rs886424	0,584	0,202	8,358	1,793	1,207	2,664	4,00E-03
Historia de enfermedad autoinmune	0,522	0,197	6,996	1,685	1,145	2,48	8,00E-03

5 Tabla 4: Frecuencias genotípicas, odd ratios (OR) con intervalo de confianza (IC) del 95% y tamaño de muestra (N) de las variantes rs9380217, rs4947296 y rs886424.

rs9380217		CONTROL (N=1613)	CASO (N=335)		CONTROL (N=1410)	CASO (N=266)
	CC		0,866 (1397)	0,77 (258)	CC	0,991 (1397)
CT		0,134 (216)	0,23 (77)	TT	0,009 (13)	0,03 (8)
		OR (95% CI)= 1,930 (1,441-2,585)				OR (95% CI)= 3,332(1,397-8,120)
		p-value = 8,00E-06				p-value=5,00E-3

rs4947296		CONTROL (N=1613)	CASO (N=335)		CONTROL (N=1410)	CASO (N=266)
	TT		0,861 (1396)	0,77 (258)	TT	0,991 (1396)
CT		0,134 (217)	0,23 (77)	CC	0,009 (13)	0,03 (8)
		OR (95% CI)= 1,920 (1,434-2,571)				OR (95% CI)=3,332(1,397-8,120)
		p-value = 8,00E-06				p-value=5,00E-3

rs886424		CONTROL (N=1618)	CASO (N=339)		CONTROL (N=1423)	CASO (N=286)
	CC		0,875 (1415)	0,832 (282)	CC	0,994 (1415)
CT		0,125 (203)	0,168 (57)	TT	0,006 (8)	0,014 (4)
		OR (95% CI)= 1,409 (1,023-1,941)				OR (95% CI)=2,509(0,75-8,388)
		p-value = 3,50E-02				p-value=0,122

Ejemplo 2. Perfil de expresión génica en células mononucleares condicionadas por el haplotipo de riesgo/protector.

Se ha comparado el perfil de expresión génica en células mononucleares obtenidas de 5 pacientes y un control en base al haplotipo definido por los SNPs rs9380217 y rs4947296 (ver tabla 5), utilizando el Illumina Gene expression array.

Tabla 5. Individuos seleccionados y sus correspondientes haplotipos, para llevar a cabo el perfil de expresión génica en células mononucleares utilizando el Illumina Gene expression array.

SAMPLE	HAPLOTIPO	
	rs9380217	rs4947296
Control	CC	TT
Caso1	CC	TT
Caso2	CC	TT
Caso3	TT	CC
Caso4	TT	CC
Caso5	TT	CC

10

Posteriormente con los genes que mostraban expresión diferencial en base al haplotipo se realizó un análisis de redes de interacción génica mediante el software bioinformático IPA (Ingenuity Pathway Analysis) y se identificaron varias rutas (Figura 5 y 6). La vía del inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK)/Fn14 fue significativamente asociada, con 11 genes (32% de los genes de la ruta TWEAK/Fn14) que se encuentran sobre o infra-expresados. ($p=3.8 \times 10^{-8}$). También se encuentra asociada la vía de ubiquitinación de proteínas con 30 genes implicados (12% de los genes de la ruta; $p=7.9 \times 10^{-8}$).

Los genes que mostraban expresión diferencial en la vía TWEAK/Fn14 (NFKB1, Fn14, BIRC2, FADD, NFKBIE y FOS) fueron validados por PCR en tiempo real (qPCR) (Tabla 6 y figura 7).

20

Tabla 6. Correlación entre los resultados de expresión génica obtenidos por array y su validación por qPCR.

GEN	qPCR		Expression Array	
	Fold Change	p-value	Fold Change	p-value
NKFB1	2,19	3,53E-04	2,62	2,47E-04
FN14	1,78	2,06E-03	2,75	6,41E-03
BIRC2	1,66	8,56E-03	2,86	1,05E-03
FOS	-2,27	2,57E-02	-2,46	2,17E-03
FADD	1,70	2,57E-02	2,45	2,35E-03
NFKB1E	4,81	3,98E-04	2,30	1,97E-03

5 Niveles elevados de TWEAK y/o Fn14 se han asociado con otras patologías autoinmunes como artritis reumatoide, lupus eritromatoso sistémico y esclerosis múltiple.

En base a estos resultados se propone el uso de una composición farmacéutica que comprende un agente bloqueante de la vía TWEAK/Fn14, tal y como una anticuerpo o un fragmento del mismo capaz de unirse al ligando TWEAK (NF-related weak inducer of apoptosis) o bien un anticuerpo o un fragmento de mismo capaz de unirse a Fn-14 (receptor de TWEAK), para tratar o reducir la gravedad o los efectos de pacientes que sufren hipoacusia neurosensorial, y especialmente de aquellos que presentan la enfermedad de Ménière con afectación bilateral.

10

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso *in vitro* de la presencia de la variante de nucleótido simple rs9380217 del cromosoma 6, cuya posición en el genoma humano (GRCh38/hg38) es la 31083776, en una muestra biológica aislada de un individuo, como indicador para el pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial.
- 5
2. El uso *in vitro* según la reivindicación 1, que adicionalmente utiliza como indicador para el pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial la variante de nucleótido simple rs886424 del cromosoma 6, cuya posición en el genoma humano (GRCh38/hg38) es la 30814225, en una muestra biológica aislada de un individuo.
- 10
3. El uso *in vitro* según la reivindicación 1 o 2, que adicionalmente utiliza como indicador para el pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial la variante de nucleótido simple rs4947296 del cromosoma 6, cuya posición en el genoma humano (GRCh38/hg38) es la 31090401, en una muestra biológica aislada de un individuo.
- 15
- 4.- Método de obtención de datos útiles para el pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial en un individuo afectado por dicha enfermedad, que comprende:
- 20
- a) detectar la presencia *in vitro* de la variante de nucleótido simple rs9380217 del cromosoma 6, cuya posición en el genoma humano (GRCh38/hg38) es la 31083776, en una muestra biológica aislada de dicho individuo.
5. El método según la reivindicación 4, donde adicionalmente se detecta la presencia *in vitro* de cualquiera de los indicadores seleccionados de la lista que comprende:
- 25
- a) la variante de nucleótido simple rs886424 del cromosoma 6, cuya posición en el genoma humano (GRCh38/hg38) es la 30814225, en una muestra biológica aislada de dicho individuo; y/o
- b) la variante de nucleótido simple rs4947296 del cromosoma 6, cuya posición en el genoma humano (GRCh38/hg38) es la 31090401, en una muestra biológica aislada de dicho individuo.
- 30
- 6.- Método pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial unilateral en un individuo afectado por dicha enfermedad, que comprende la detección de la presencia de la variante definida en la reivindicación 4, y que además comprende:
- 35

b) clasificar al individuo en el grupo de individuos con progresión hacia enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial bilateral cuando presenta el alelo con menor frecuencia en homocigosis para rs9380217 de forma que dicho individuo presente el genotipo TT para rs9380217.

5 7.- Método pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial unilateral en un individuo afectado por dicha enfermedad según la reivindicación 6, que además comprende la detección de la presencia de cualquiera de las variantes definidas en la reivindicación 5A y/o 5B, y donde se clasifica al individuo en el grupo de individuos con progresión hacia enfermedad que cursa con hipoacusia
10 neurosensorial bilateral cuando presenta el alelo con menor frecuencia en homocigosis para rs4947296 de forma que dicho individuo presente el genotipo CC para rs4947296 y/o cuando presenta el alelo con menor frecuencia en homocigosis para rs886424 de forma que dicho individuo presente el genotipo TT para rs886424.

15 8.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, donde la enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial es la enfermedad de Ménière o la enfermedad autoinmune del oído interno.

9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, donde la muestra aislada es el ADN genómico obtenido de sangre periférica.

20 10.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-9, donde el individuo pertenece a una población de ascendencia europea, y más preferiblemente de ascendencia española.

11.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, donde la hipoacusia neurosensorial es unilateral.

25 12.- Método para clasificar un individuo que padece o tiene probabilidad de padecer una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial, preferiblemente la enfermedad de Ménière o la enfermedad autoinmune del oído interno, en uno de dos grupos, en el que el grupo 1 comprende los individuos identificables mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7 como individuos con progresión hacia enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial bilateral, y
30 en el que el grupo 2 representa el resto de individuos.

13.- Un kit o dispositivo, preferiblemente un microarray de dos canales, un chip de oligonucleótidos de ADN, un GeneChip o un chip de ADN para genotipado, adecuado para llevar a cabo el método descrito en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12, que comprende una superficie sólida, preferiblemente de vidrio, plástico o silicio, al
35 que se la une o diseña al menos un oligonucleótido complementario a la secuencia SEQ ID NO: 1 o a un fragmento de la misma que comprenda la variante de nucleótido simple para rs9380217 y opcionalmente oligonucleótidos

complementarios a las secuencias SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3 o fragmentos de las mismas que comprendan la variante de nucleótido simple para rs4947296 y/o para rs88642414.

- 5 14. El kit según la reivindicación 13, donde dicho kit es un microarray que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de la secuencia nucleotídica descritas en la reivindicación 13.
15. El kit o dispositivo según la reivindicación 13, donde kit es un chip de ADN para genotipado.
- 10 16.- Uso *in vitro* de un kit o un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, para el pronóstico de una enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial.
- 17.- El uso de un kit o un dispositivo según la reivindicación anterior, donde la enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial es la enfermedad de Ménière o la enfermedad autoinmune del oído interno.
- 15 18.- El uso de un kit o un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, donde la enfermedad que cursa con hipoacusia neurosensorial es la enfermedad de Ménière.
- 19.- El uso de un kit dispositivo según las reivindicaciones 16 a 18, donde la hipoacusia neurosensorial es unilateral.

20

Fig.1

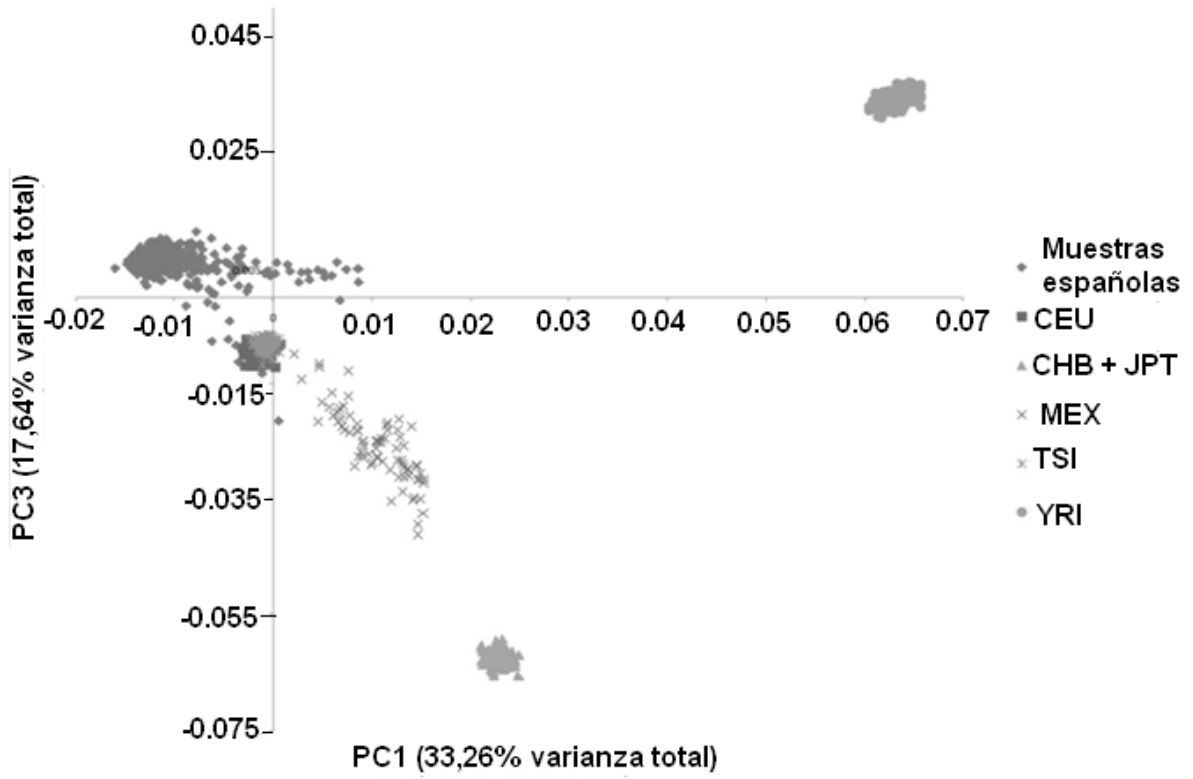


Fig.2

	rs2517474	rs9380215	rs9380217	rs2535311	rs4947296	rs2844635
rs2517474	1.000 (0)	0.536 (3161)	0.536 (5059)	0.133 (6190)	0.133 (11684)	0.032 (28987)
rs9380215	0.536 (3161)	1.000 (0)	1.000 (1898)	1.000 (3029)	1.000 (8523)	0.032 (25826)
rs9380217	0.536 (5059)	1.000 (1898)	1.000 (0)	1.000 (1131)	1.000 (6625)	0.032 (23928)
rs2535311	0.133 (6190)	1.000 (3029)	1.000 (1131)	1.000 (0)	1.000 (5494)	0.023 (22797)
rs4947296	0.133 (11684)	1.000 (8523)	1.000 (6625)	1.000 (5494)	1.000 (0)	0.032 (17303)
rs2844635	0.032 (28987)	0.032 (25826)	0.032 (23928)	0.023 (22797)	0.032 (17303)	1.000 (0)

Fig.3

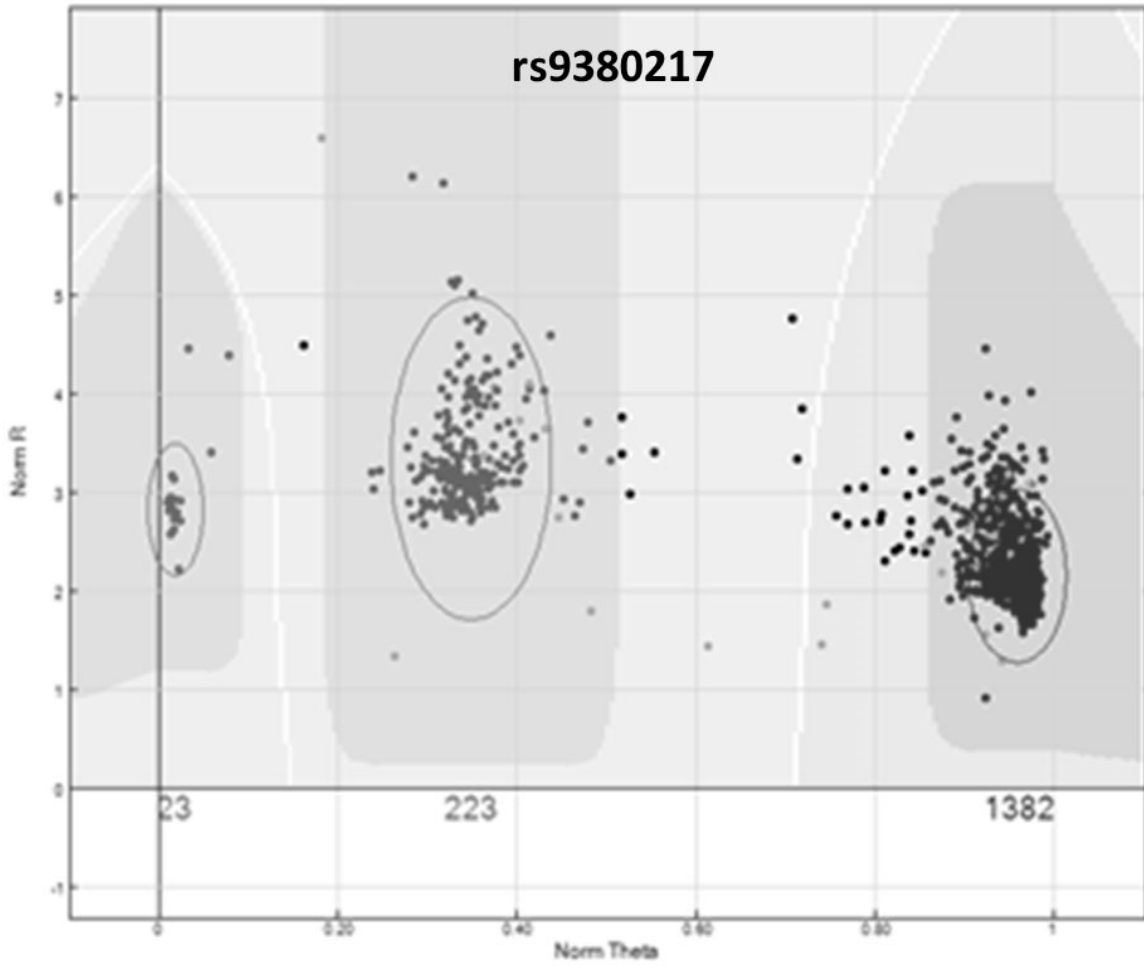


Fig. 3 cont.

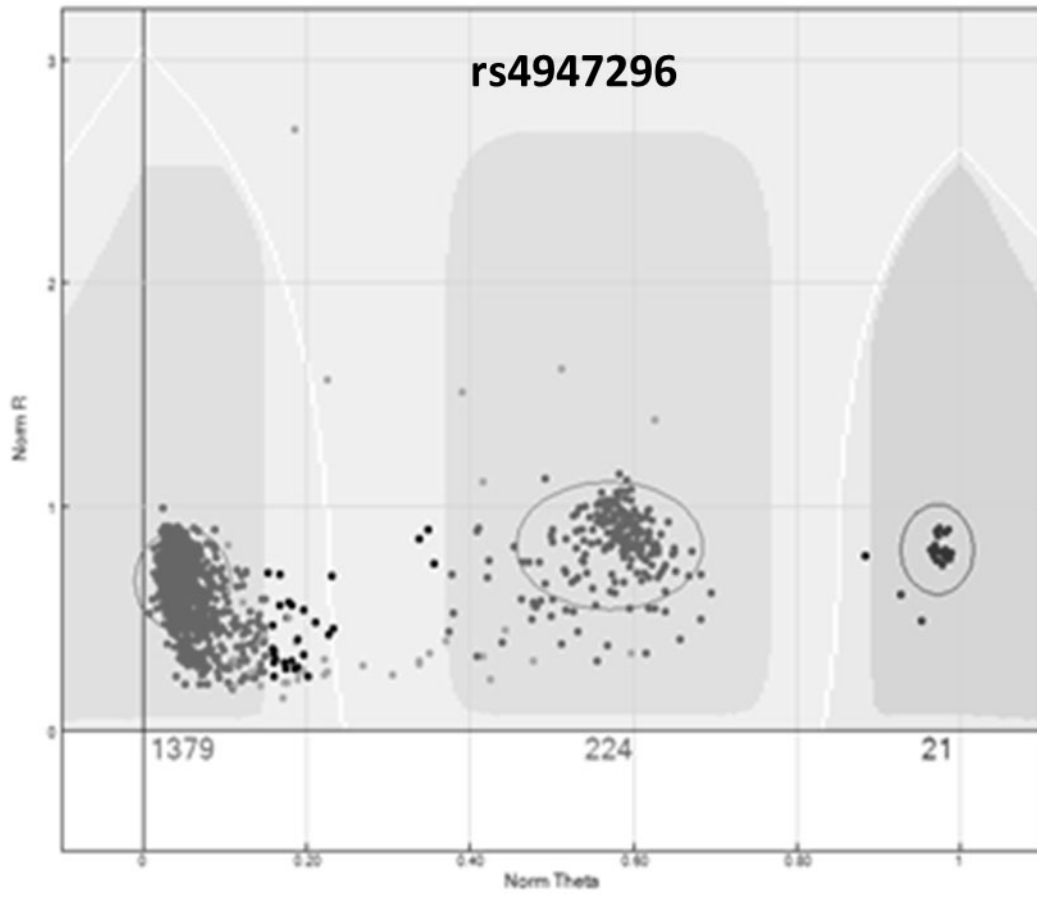


Fig. 3 cont.

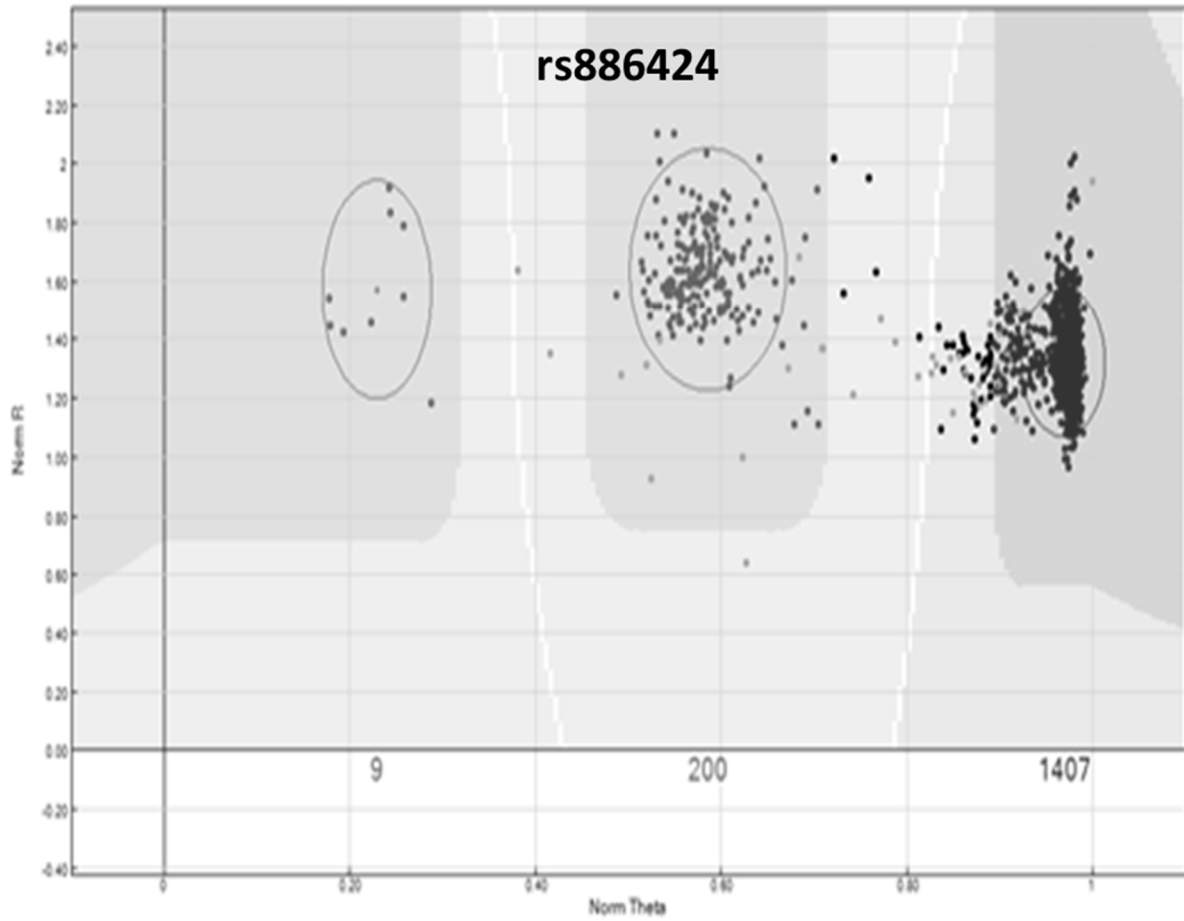


Fig.4

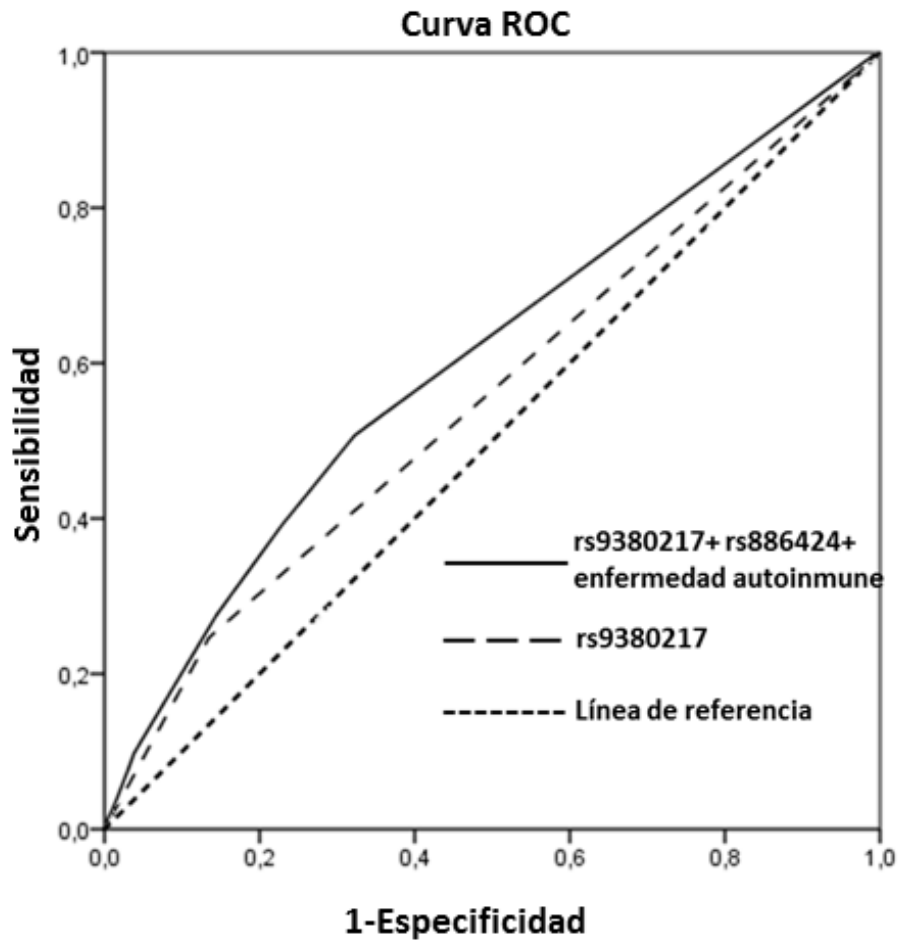


Fig.5

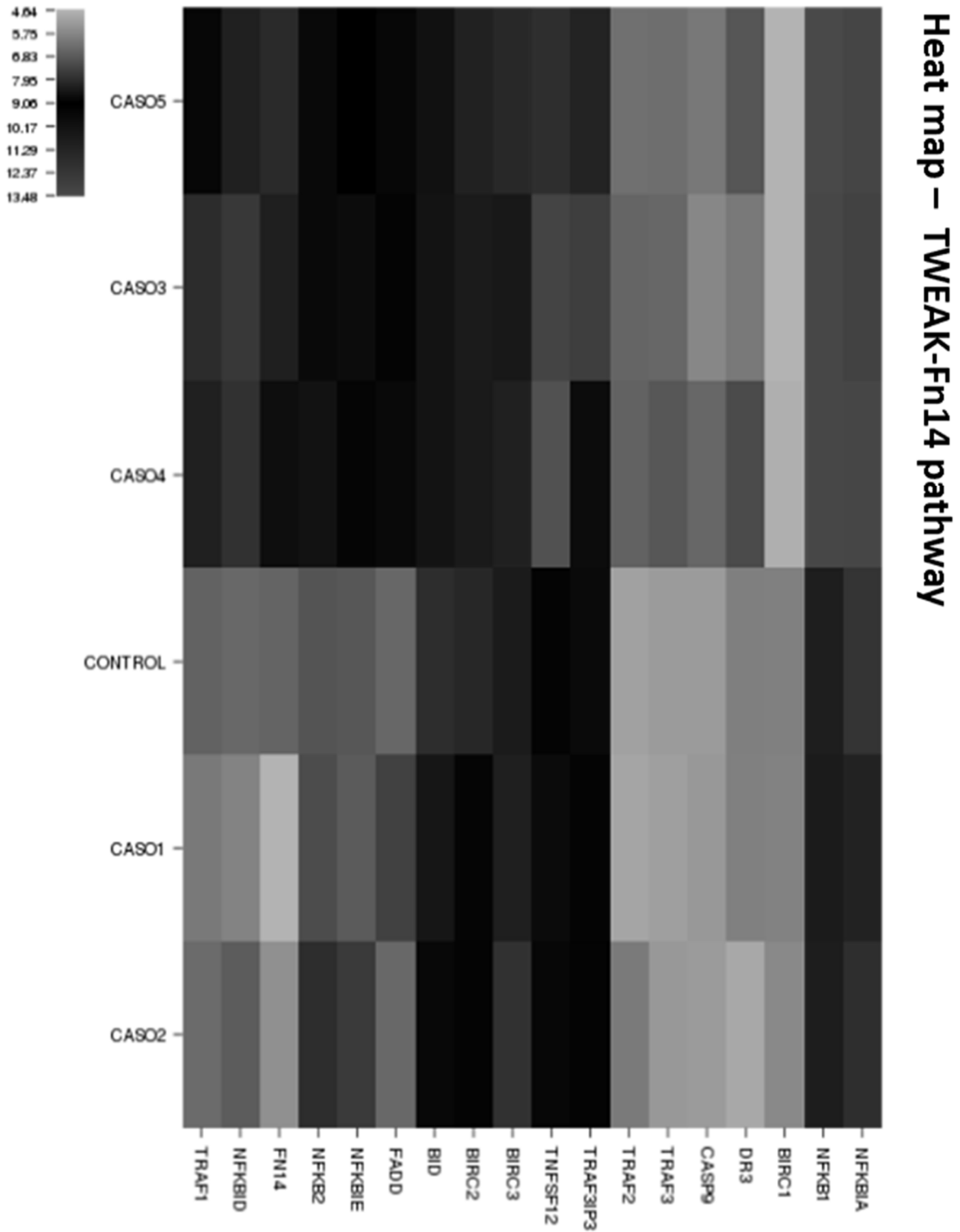


Fig.6

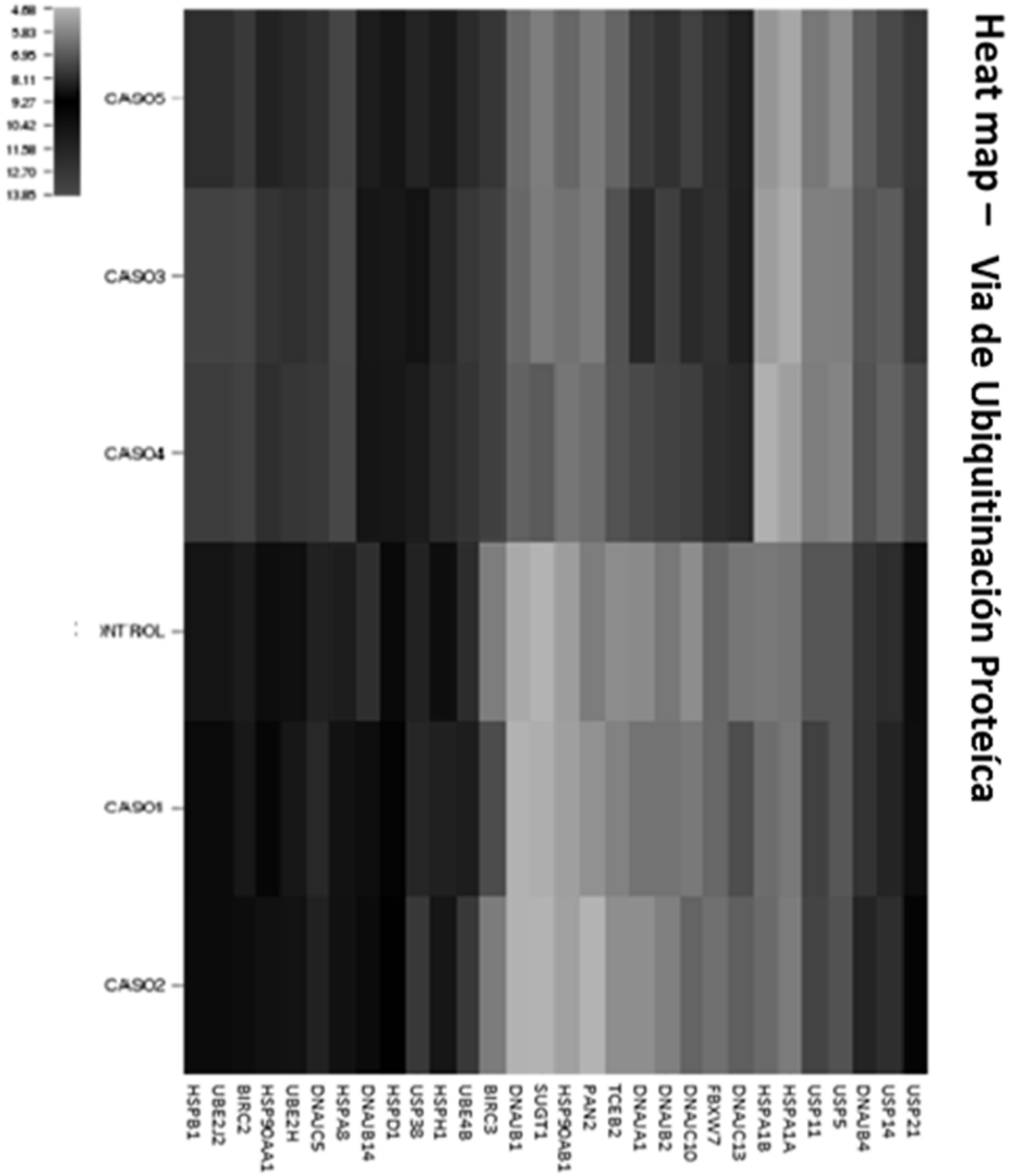
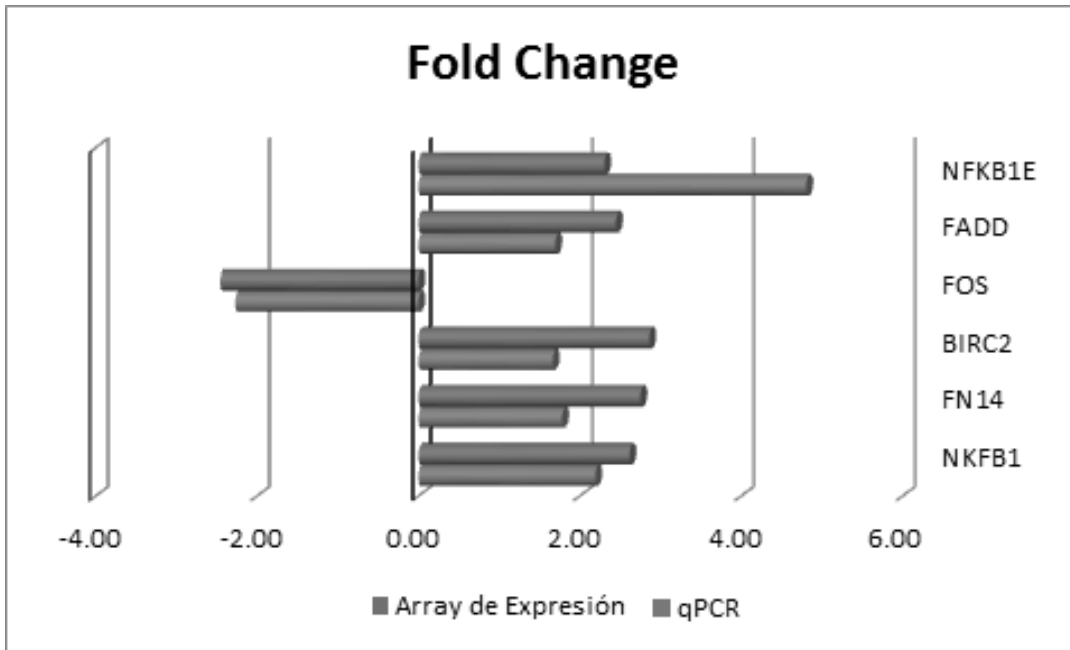


Fig.7



Listado de Secuencias

<110> SERVICIO ANDALUZ DE SALUD

<120> Uso de variantes alélicas (SNPs) en la región 6p21.33 para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la Enfermedad de Ménière.

<130> 901033

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(51)
 <223> Secuencia útil para la identificación del polimorfismo rs9380217

<400> 1
 tcttctctgc tctgattctt cctattcctc agaaaccaa gccttcctta g 51

<210> 2
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(51)
 <223> Secuencia útil para la identificación del polimorfismo rs4947296

<400> 2
 cacacaagag caaaaagga cgcaacgaaa tatggaaact agtgaatgga a 51

<210> 3
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(51)
 <223> Secuencia útil para la identificación del polimorfismo rs886424

<400> 3
 caactccaat gtcacctgct cctcatctgt acccagtgga cttttttggc a 51