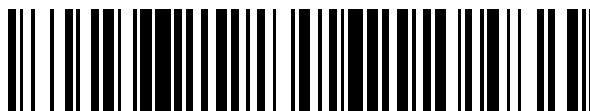


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 266**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6883** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2016 PCT/EP2016/077129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2017 WO17081073**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2016 E 16793890 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3374518**

54 Título: **Métodos para predicción del tiempo de supervivencia de los pacientes con cirrosis  
alcohólica descompensada**

30 Prioridad:

**10.11.2015 EP 15306785**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:

**19.05.2020**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET  
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR;  
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (25.0%);  
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS  
(APHP) (25.0%) y  
UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (25.0%)**

72 Inventor/es:

**MOREAU, RICHARD;  
WEISS, EMMANUEL y  
RAUTOU, PIERRE-EMMANUEL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 761 266 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos para predicción del tiempo de supervivencia de los pacientes con cirrosis alcohólica descompensada

### Campo de la invención:

5 La presente invención se refiere a métodos para predicción del tiempo de supervivencia de los pacientes con cirrosis alcohólica descompensada.

### Antecedentes de la invención:

10 La cirrosis es una enfermedad crónica del hígado cuya prevalencia aumentará espectacularmente durante la próxima década. La cirrosis puede ser consecuencia de cierto número de enfermedades hepáticas crónicas tales como enfermedad hepática alcohólica, hepatitis viral crónica, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedades autoinmunes del hígado (cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, y hepatitis autoinmune). La cirrosis progresa a lo largo de varios años. La aparición de complicaciones indica la transición a la fase denominada "descompensada" (aproximadamente 100.000 pacientes al año en Francia); estas complicaciones incluyen ascitis (30.000 pacientes al año en Francia), hemorragia gastrointestinal (10.000 episodios/año en Francia), insuficiencia renal e infecciones bacterianas, lo cual es muy común y debido frecuentemente a la translocación de bacterias intestinales Gram-negativas. La mortalidad en la cirrosis es por tanto usualmente una consecuencia de la descompensación o sus complicaciones subsiguientes. El tratamiento de elección para la cirrosis descompensada es el trasplante de hígado, y muchos de tales pacientes están incluidos en listas de espera de trasplante. Por tanto, la predicción del tiempo de supervivencia de los pacientes con cirrosis alcohólica descompensada es sumamente deseable para determinar si el paciente será elegible para el trasplante. Actualmente se utiliza el registro MELD (Modelo para Enfermedad Hepática de Última Etapa) para la asignación de órganos. Aunque el registro MELD predice mortalidad a los 90 días basada en bilirrubina, INR (ratio internacional normalizada) y creatinina en suero, los factores de predisposición para muerte y eventos finales conducentes a mortalidad precisan mejorarse. JP2010-502979 se refiere a biomarcadores para evaluación de la función hepática y predicción del riesgo de muerte.

### Compendio de la invención:

25 La presente invención se refiere a métodos para predicción del tiempo de supervivencia de pacientes con cirrosis alcohólica descompensada. En particular, la presente invención se define por las reivindicaciones.

### Descripción detallada de la invención:

30 Aunque se cree que la inflamación sistémica es un impulsor principal de la mortalidad en los pacientes con cirrosis alcohólica descompensada, sus mecanismos no están claros. Sobre la base de los resultados de la determinación del perfil de expresión génica en microrredes realizada en células inmunes cirróticas y sanas, los inventores plantearon una hipótesis en el sentido de que los niveles de expresión basales de los genes implicados en la inmunidad celular autónoma (la mayoría de los cuales son inducibles por IFN tipo 1) y/o de los genes codificantes de citocinas o quimiocinas inflamatorias secretadas por las células mononucleares circulantes en los pacientes con cirrosis pueden estar relacionados con el desenlace del paciente. Por esta razón, midieron la expresión basal de genes en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con cirrosis alcohólica descompensada e investigaron su relación con el riesgo de muerte. Los inventores demostraron que, en las PBMCs de los pacientes con cirrosis alcohólica descompensada, los niveles basales mayores de genes inducibles por IFN tipo 1 implicados en la inmunidad autonómica celular, pero no la expresión de los genes codificantes de citocinas/quimiocinas inflamatorias secretadas, son altamente predictivos del riesgo de muerte. La desregulación de la expresión de genes inducibles por IFN tipo 1 en las células inmunes circulantes puede jugar un papel en los mecanismos que dan como resultado la muerte por cirrosis. Más particularmente, en análisis univariante, un registro MELD más alto, mayor expresión basal de genes inducibles por IFN 8 así como valores de registro IFN más altos eran predictores significativos de muerte. En análisis bivariante que incluía los registros IFN y MELD, únicamente el primero predecía significativamente la muerte ((RR=3,58; 95% CI, 1,18-10,91; P=0,02). Estos resultados se debían principalmente al alto valor de pronóstico intrínseco de OAS2 (RR=2,49; P=0,04) y MX2 (RR= 1,35; P=0,01).

45 Según esto, un primer objeto de la presente invención se refiere a un método para la predicción del tiempo de supervivencia de un paciente con cirrosis alcohólica descompensada que comprende i) determinación del nivel de expresión de OAS2 o MX2 en una muestra de células mononucleares de sangre periférica obtenida del paciente, ii) comparación del nivel determinado en la etapa i) con un valor de referencia predeterminado y i) ii) llegar la conclusión de que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia corto cuando el nivel determinado en el paso i) es mayor que su nivel de referencia predeterminado, o llegar a la conclusión de que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia largo cuando el nivel determinado en el paso i) es menor que el valor de referencia predeterminado.

55 Tal como se utiliza en esta memoria la expresión "cirrosis alcohólica descompensada" tiene su significado general en la técnica. En la cirrosis, la presencia de ictericia, ascitis, hemorragia gastrointestinal portal por hipertensión, y/o, encefalopatía hepática, o cualquier combinación de éstas se considera descompensación. Las manifestaciones anteriores aparecen cuando el proceso de la enfermedad sobrepasa los mecanismos compensadores, sea por progresión de la enfermedad o por un ataque agudo superpuesto.

El método es particularmente adecuado para predecir la duración de la supervivencia global (OS) del paciente. Los expertos en la técnica reconocerán que el tiempo de supervivencia OS está basado generalmente en y se expresa como el porcentaje de gente que sobrevive durante un periodo de tiempo específico. Como se utiliza en esta memoria, la expresión "tiempo de supervivencia corto" indica que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia que será menor que la mediana (o la media) observada en la población general de pacientes con cirrosis alcohólica descompensada. Cuando el paciente tendrá un tiempo de supervivencia corto, ello quiere decir que el paciente tendrá un "mal de pronóstico" y que se encuentra en alto riesgo de muerte en la lista de espera del trasplante de hígado. Inversamente, la expresión "tiempo de supervivencia largo" indica que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia que será mayor que la mediana (o la media) observada en la población general de pacientes con cirrosis alcohólica descompensada y que el mismo podrá sobrevivir hasta el trasplante de hígado. Cuando el paciente tendrá un tiempo de supervivencia largo, ello quiere decir que el paciente tendrá un "buen de pronóstico".

El término "PBMC" o "células mononucleares de sangre periférica" o "PBMC no fraccionadas", como se utiliza en esta memoria, se refiere a PBMC totales, es decir a una población de glóbulos blancos que tienen un núcleo redondeado, que no se ha enriquecido en una subpoblación dada. Las células mononucleares de la sangre del cordón umbilical están incluidas también en esta definición. Típicamente, la muestra de PBMC conforme a la invención no se ha sometido a un paso de selección para contener sólo PBMC adherentes (que están constituidas esencialmente por > 90% de monocitos) o PBMC no adherentes (que contienen células T, células B, células asesinas naturales (NK), células NK T y precursores DC. Una muestra de PBMC conforme a la invención contiene por tanto linfocitos (células B, células T, células NK, células NK T), monocitos, y precursores de los mismos. Típicamente, estas células pueden extraerse de sangre entera utilizando Ficoll, un polisacárido hidrófilo que separa capas de sangre, formando las PBMC un anillo de células bajo una capa de plasma. Adicionalmente, las PBMC pueden extraerse de sangre entera utilizando un tampón de lisis hipotónico que lisará preferentemente los glóbulos rojos. Tales procedimientos son conocidos por el experto en la técnica.

En algunas realizaciones, ambos niveles de expresión de OAS2 y MX2 se determinan en el paso i).

En algunas realizaciones, se determina el nivel de expresión de al menos un gen adicional y se compara con su valor predeterminado correspondiente. En algunas realizaciones, el gen para el cual se determina adicionalmente la expresión se selecciona del grupo que consiste en IFIT1, CXCL10, IFIH1, DDX58, TRIM22 y GBP4.

En algunas realizaciones, se determinan los niveles de expresión de 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 genes.

En algunas realizaciones, se determinan en la muestra los niveles de expresión de OAS2, MX2, IFIT1, CXCL10, IFIH1, DDX58, TRIM22 y GBP4 y se comparan con su valor de referencia predeterminado correspondiente.

En un aspecto adicional, se determina en la muestra el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en OAS2, MX2, IFIT1, CXCL10, IFIH1, DDX58, TRIM22, GBP4, DDX60, IFIT5, IFI44 e IRF1 y se comparan con su valor de referencia predeterminado correspondiente.

En algunas realizaciones, se determinan los niveles de expresión de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 genes.

En la presente memoria descriptiva, el nombre de cada uno de los genes de interés se refiere al símbolo de gen oficial del gen correspondiente, como se encuentra en bases de datos de secuencias de genes y secuencias de proteínas reconocidas internacionalmente, en particular en la base datos del HUGO Gene Nomenclature Committee, que está disponible particularmente en la dirección siguiente de Internet: [www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/index.html](http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/index.html). En la presente memoria descriptiva, el nombre de cada uno de los diversos marcadores biológicos de interés puede hacer referencia también al nombre internacionalmente reconocido del gen correspondiente, como se encuentra en las bases de datos internacionalmente reconocidas de secuencias de genes y secuencias de proteínas ENTRE ID, Genbank, TrEMBL o ENSEMBL. A partir de estas bases de datos de secuencias reconocidas internacionalmente, pueden ser recuperadas por el experto en la técnica las secuencias de ácido nucleico correspondientes a cada uno de los genes de interés descritos en esta memoria. Para evitación de dudas, cada uno de los genes de la presente invención se caracteriza en la Tabla A con su número de acceso disponible en [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/):

**Tabla A.** Genes incluidos en el Registro IFN con el locus, la proteína codificada y la función correspondientes

Gen	Localización	Proteína	Función	Entrez ID
<b>DDX58</b>	9p21.1	RIG-I	RNA Helicasa, PRR para RNA viral	23586
<b>OAS2</b>	12q24.13	2'-5'-oligoadenilato-sintetasa-2	2-5A-sintetasa responsable de la activación y degradación del RNA viral por la RNasa L	4939
<b>MX2</b>	21q22.3	Proteína Mx2 de fijación de GTP inducida por interferón	Actividad antiviral (HIV y SIV). Puede jugar un papel en la regulación del transporte nucleocitoplásmico y la progresión del ciclo celular	4600
<b>TRIM22</b>	11p15.4	Contiene el grupo tripartito 22	Proteína antiviral inducida por interferón implicada en la inmunidad celular innata. La actividad antiviral podría estar mediada en parte por la ubiquitinación de proteínas virales dependiente de TRIM22	10346
<b>GBP4</b>	1p22.2	Proteína 4 de fijación de guanilato	Fija GTP, GBP y GMP. Hidroliza GTP, siendo GDP o GMP productos de la reacción	115361
<b>CXCL10</b>	4q21.1	Quimiocina 10 del grupo C-X-C	Quimiotáctico para monocitos y linfocitos T. Se fija a CXCR3	3627
<b>IFIT1</b>	10q23.31	Proteína inducida por IFN con repeticiones del tetratricopéptido 1	Proteína de fijación de RNA antiviral que actúa como sensor de los RNAs monocatenarios virales e inhibe la expresión del mRNA viral	3434
<b>IFIH1</b>	2q24.2	Proteína 5 Asociada a la Diferenciación del Melanoma	Enzima dsRNA-helicasa receptora semejante a RIG-I que actúa como sensor citoplásmico del RNA viral. Papel fundamental en la percepción de la infección viral y en la activación de respuestas antivirales	64135

**Tabla B.** Genes adicionales incluidos en el método de la invención con la proteína codificada y la función correspondientes

Gen	Proteína	Función	Entrez ID
<b>DDX60</b>	DEXDIH-box helicasa 60	Regula positivamente el interferón tipo I dependiente de DDX58/RIG-I e IFIH1/MDA5 y la expresión de genes inducibles por interferón en respuesta a la infección viral. Fija ssRNA, dsRNA y dsDNA y puede promover la fijación de DDX58/RIG-I a dsRNA.	55601
<b>IFIT5</b>	Proteína inducida por interferón con repeticiones del tetratricopéptido 5	Proteína de fijación de RNA inducida por interferón que fija específicamente RNA monocatenario que lleva un grupo 5'- trifosfato (PPP-RNA), actuando por tanto como sensor de RNAs monocatenarios virales. Los PPP-RNA monocatenarios son específicos de virus, proporcionando una firma molecular para distinguir entre mRNAs propios y extraños	24138
<b>IFI44</b>	Proteína 44 inducida por interferón	Esta proteína se agrega para formar estructuras microtubulares	10561
<b>IRF1</b>	Factor 1 regulador del interferón	Sirve como activador de la transcripción de los interferones alfa y beta (requerido para la inducción del RNA bicatenario de estos genes en el ratón). Funciona también como activador de la transcripción de genes inducidos por los interferones alfa, beta, y gamma. juega también papeles en la regulación de la apoptosis y la supresión de tumores	3659

5

La determinación del nivel de expresión de un gen puede realizarse por una diversidad de técnicas. Generalmente, el nivel de expresión que se determina es un nivel de expresión relativo. Típicamente, la determinación comprende poner en contacto la muestra con reactivos selectivos tales como sondas, cebadores o ligandos, y detectar con ello la presencia, o medir la cantidad, de polipéptidos o ácidos nucleicos de interés presentes originalmente en la muestra. La puesta en contacto puede realizarse en cualquier dispositivo adecuado, tal como una placa, cápsula de microtitulación, tubo de ensayo, pocillo, columna de vidrio, etc. En algunas realizaciones, la puesta en contacto se realiza sobre un sustrato recubierto con el reactivo, tal como una red de ácido nucleico o una red de ligandos específicos. El sustrato puede ser un sustrato sólido o semisólido tal como cualquier soporte adecuado que comprende vidrio, plástico, nylon, papel, metal, polímeros y análogos. El sustrato puede tener diversas formas y tamaños, tal como un portaobjetos, una membrana, una cuenta, una columna, un gel, etc. La puesta en contacto puede realizarse en cualesquiera condiciones adecuadas para la formación de un complejo detectable, tal como un híbrido de ácido nucleico o un complejo anticuerpo-antígeno, entre el reactivo y los ácidos nucleicos o polipéptidos de la muestra.

10

15

En algunas realizaciones, el nivel de expresión puede determinarse por determinación de la cantidad de mRNA. Métodos para determinación de la cantidad de mRNA son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en la muestra se extrae primeramente conforme a métodos estándar, por ejemplo, utilizando enzimas líticas o soluciones químicas, o se extrae con resinas de fijación de ácido nucleico siguiendo las instrucciones del fabricante. El mRNA extraído se detecta luego por hibridación (p. ej., análisis por transferencia Northern) y/o amplificación (p. ej., RT-PCR). Se prefiere la RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa típica. Es particularmente ventajosa la RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa en tiempo real. Otros métodos de amplificación incluyen reacción en cadena de ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación con desplazamiento de cadena (SDA) y amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA).

Los ácidos nucleicos que tienen al menos 10 nucleótidos y que exhiben complementariedad u homología de secuencia con el mRNA de interés encuentran utilidad en esta memoria como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Debe entenderse que tales ácidos nucleicos no precisan ser idénticos, pero son por regla general al menos aproximadamente 80% idénticos a la región homóloga de tamaño comparable, más preferiblemente 85% idénticos y aún más preferiblemente 90-95% idénticos. En ciertas realizaciones, será ventajoso utilizar ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, tales como una etiqueta detectable, para detectar la hibridación.

Típicamente, las sondas de ácido nucleico incluyen una o más etiquetas, por ejemplo, para permitir la detección de una molécula de ácido nucleico diana utilizando las sondas descritas. En diversas aplicaciones, tales como los procedimientos de hibridación in situ, una sonda de ácido nucleico incluye una etiqueta (p. ej., una etiqueta detectable). Una "etiqueta detectable" es una molécula o material que puede utilizarse para producir una señal detectable que indica la presencia o concentración de la sonda (particularmente la sonda fijada o hibridada) en una muestra. Así, una molécula de ácido nucleico marcada proporciona un indicador de la presencia o concentración de una secuencia de ácido nucleico diana (p. ej., secuencia de ácido nucleico diana genómico) (a la cual está fijada o hibridada la molécula de ácido nucleico específica marcada singularmente) en una muestra. Una etiqueta asociada con una o más moléculas de ácido nucleico (tal como una sonda generada por los métodos descritos) puede detectarse directa o indirectamente. Una etiqueta puede ser detectada por cualquier mecanismo conocido o todavía por descubrir que incluya absorción, emisión y/o dispersión de un fotón (con inclusión de fotones de radiofrecuencia, frecuencia de microondas, frecuencia infrarroja, frecuencia visible y frecuencia ultravioleta). Etiquetas detectables incluyen moléculas y materiales coloreados, fluorescentes, fosforescentes y luminiscentes, catalizadores (tales como enzimas) que convierten una sustancia en otra para proporcionar una diferencia detectable (tal como por conversión de una sustancia incolora en una sustancia coloreada o viceversa, o por producción de un precipitado o aumento de la turbidez de la muestra), haptenos que pueden ser detectados por interacciones de fijación de anticuerpos, y moléculas o materiales paramagnéticos y magnéticos.

Ejemplos particulares de etiquetas detectables incluyen moléculas fluorescentes (o fluorocromos). Numerosos fluorocromos son conocidos por los expertos en la técnica, y pueden seleccionarse, por ejemplo, de Life Technologies (anteriormente Invitrogen), p. ej., véase, *The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. Ejemplos de fluoróforos particulares que pueden agregarse (por ejemplo, conjugarse químicamente) a una molécula de ácido nucleico (tal como una región de fijación singularmente específica) se proporcionan en U.S. Pat. Núm. 5,866,366 otorgada a Nazarenko et al., tales como ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2' disulfónico, acridina y derivados tales como acridina y acridina-isotiocianato, ácido 5-(2'-aminoetil) aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), 4-amino-N-[3-vinil-sulfonyl]-fenil]naftalimida-3,5 disulfonato (Amarillo Lucifer VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, Amarillo Brillante, cumarina y derivados tales como cumarina, 7-amino-4-metil-cumarina (AMC, Coumarin 120), 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Coumarin 151); cianosina; 4',6-di-aminidino-2-fenilindol (DAPI); 5',5"-dibromopirógalo-1-sulfonftaleína (Rojo de Bromopirógalo); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; dietilentriaminapentaacetato; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico; ácido 4,4'-diisotio-cianatoestilbeno-2,2'-disulfónico; cloruro de 5-[dimetilamino]-naftaleno-1-sulfonylo (DNS, cloruro de dansilo); ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados tales como eosina y eosina-isotiocianato; eritrosina y derivados tales como eritrosina B y eritrosina-isotiocianato; etidio; fluoresceína y derivados tales como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazina-2- y Darninofluoresceína (DTAF), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, fluoresceína isotiocianato (FITC), y QFITC Q(RITC); 2',7'-difluorofluoresceína (OREGON GREEN®); fluorescamina; IR144; IR1446; Verde Malaquita isotiocianato; 4-metilumbeliferona; orto-cresolftaleína; nitrotirosina; parrosanilina; Rojo de Fenol; B-ficoeritrina; o-ftal- dialdehído; pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno, y succinimidil-butirato de 1-pireno; Rojo Reactivo 4 (Rojo Brillante Cibacron 3B-A); rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-rodamina (R6G), lisamina-rodamina B cloruro de sulfonylo, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, rodamina X isotiocianato, Verde de Rodamina, sulfo-rodamina B, sulfo-rodamina 101 y derivado de cloruro de sulfonylo con sulfo-rodamina 101 (Rojo Texas); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA); tetrametil-rodamina; tetrametil-rodamina isotiocianato (TRITC); riboflavina; ácido rosólico y derivados quelato de terbio. Otros fluoróforos adecuados incluyen quelatos de europio reactivos con tiol que emiten a aproximadamente 617 nm (Heyduk y Heyduk, *Analyt. Biochem.* 248:216-27, 1997; *J. Biol. Chem.* 274:3315-22, 1999), así como GFP, LissamineTM, dietilaminocumarina, clorotriazinilfluoresceína, naftofluoresceína, 4,7-dicloro-rodamina y xanteno (como se describe en U.S. Pat. Núm. 5,800,996 otorgada a Lee et al.) y derivados de los mismos. Pueden utilizarse también otros fluoróforos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, los disponibles de Life Technologies (Invitrogen; Molecular Probes (Eugene, Oreg.)) y con inclusión de la serie de tintes ALEXA FLUOR® (por ejemplo, como los

descritos en las Pat. U.S. Núms. 5,696,157, 6,130,101 y 6,716,979), la serie de tintes BODIPY (tintes de difluoruro de dipirrometenoboro, por ejemplo, como los descritos en las Pat. U.S. Núms. 4,774,339, 5,187,288, 5,248,782, 5,274,113, 5,338,854, 5,451,663 y 5,433,896), Cascade Blue (un derivado reactivo con amina del pireno sulfonado descrito en la Pat. U.S. Núm. 5,132,432) y Marina Blue (Pat. U.S. Núm. 5,830,912).

5 Además de los fluorocromos descritos anteriormente, una etiqueta fluorescente puede ser una nanopartícula fluorescente, tal como un nanocristal semiconductor, p. ej., un QUANTUM DOTTM (obtenido, por ejemplo, de Life Technologies (QuantumDot Corp., Invitrogen Nanocrystal Technologies, Eugene, Oreg.); véanse también las Patentes U.S. Núms. 6,815,064; 6,682,596; y 6,649, 138). Los nanocristales semiconductores son partículas microscópicas que  
10 tienen propiedades ópticas y/o eléctricas dependientes del tamaño. Cuando los nanocristales semiconductores se iluminan con una fuente de energía primaria, surge una emisión secundaria de energía de una frecuencia que corresponde al "bandgap" del material semiconductor utilizado en el nanocristal semiconductor. Esta emisión puede detectarse como luz coloreada de una longitud de onda o fluorescencia específica. Nanocristales semiconductores con diferentes características espectrales se describen, p. ej., en la Patente U.S. Núm. 6,602,671. Nanocristales semiconductores que pueden acoplarse con una diversidad de moléculas biológicas (con inclusión de dNTPs y/o  
15 ácidos nucleicos) o sustratos por técnicas descritas en, por ejemplo, Bruchez et al., Science 281 :20132016, 1998; Chan et al., Science 281:2016-2018, 1998; y la Pat. U.S. Núm. 6,274,323. La formación de nanocristales semiconductores de diversas composiciones se describe en, p. ej., las Pat. U.S. Núms. 6,927,069; 6,914,256; 6,855,202; 6,709,929; 6,689,338; 6,500,622; 6,306,736; 6,225,198; 6,207,392; 6,114,038; 6,048,616; 5,990,479; 5,690,807; 5,571,018; 5,505,928; 5,262,357 y en la Publicación de la Patente U.S. Núm. 2003/0165951, así como en la publicación PCT Núm. 99/26299 (publicada el 27 de mayo de 1999). Pueden producirse poblaciones separadas de nanocristales semiconductores que son identificables basándose en sus diferentes características espectrales. Por ejemplo, se pueden producir nanocristales semiconductores que emiten luz de diferentes colores basándose en su composición, tamaño o tamaño y composición. Por ejemplo, puntos cuánticos que emiten luz a diferentes longitudes de onda basadas en tamaño (longitudes de onda de emisión 565 nm, 655 nm, 705 nm, u 800 nm), que son adecuados como etiquetas fluorescentes en las sondas descritas en esta memoria, están disponibles de Life Technologies (Carlsbad, Calif.).  
25

La PCR cuantitativa se lleva a cabo típicamente en un ciclador térmico con capacidad para iluminar cada muestra con un haz de luz de una longitud de onda especificada y detectar la fluorescencia emitida por el fluoróforo excitado. El ciclador térmico es capaz también de calentar y enfriar rápidamente las muestras, aprovechando así la ventaja de las propiedades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos y la polimerasa térmica. La mayoría de los termocicladores del mercado actual ofrecen características similares. Típicamente, los termocicladores implican un formato de capilares de vidrio, tubos de plástico, placas de 96 pocillos o placas de 384 pocillos. El termociclador implica también un software de análisis. Con objeto de detectar y medir la cantidad de amplicón (es decir la secuencia de ácido nucleico diana  
30 amplificada) en la muestra, tiene que generarse una señal medible, que es proporcional a la cantidad de producto amplificado.  
35

En algunas realizaciones, el nivel de expresión se determina por análisis de chips de DNA. Tal chip de DNA o microrred de ácido nucleico consiste en diferentes sondas de ácido nucleico que están fijadas químicamente a un sustrato, el cual puede ser un microchip, un portaobjetos de vidrio o una cuenta con dimensiones de microesfera. Un microchip puede estar constituido por polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales basados en sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos, o nitrocelulosa. Las sondas comprenden ácidos nucleicos tales como cDNAs u oligonucleótidos que pueden tener aproximadamente 10 a aproximadamente 60 pares de bases. A fin de determinar el nivel de expresión, una muestra del paciente, sometida opcionalmente con anterioridad a una transcripción inversa, se etiqueta y se pone en contacto con la microrred en condiciones de hibridación, lo que conduce a la formación de complejos entre ácidos nucleicos diana que son complementarios a secuencias sonda unidas a la superficie de la microrred. Los complejos y ligandos etiquetados se detectan luego y pueden cuantificarse o semi-cuantificarse. El etiquetado puede conseguirse por diversos métodos, p. ej. utilizando etiquetado radiactivo o fluorescente. Están disponibles muchas variantes de la tecnología de hibridación de microrredes para el experto en la técnica (véase, p. ej., la revisión por Hoheisel, Nature Reviews, Genetics, 2006, 7:200-210).  
40  
45

En algunas realizaciones, se utiliza el sistema nCounter® Analysis para detectar la expresión genética intrínseca. La base del sistema nCounter® Analysis es el código exclusivo asignado a cada diana de ácido nucleico a ensayar (Publicación de Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 08/124847, Patente U.S. Núm. 8,415,102 y Geiss et al. Nature Biotechnology. 2008, 26(3): 317-325).  
50

El código se compone de una serie ordenada de manchas fluorescentes coloreadas que crean un código de barras exclusivo para cada diana a ensayar. Se designa un par de sondas para cada diana de DNA o RNA, una sonda de captura biotinilada y una sonda informadora que lleva el código de barras fluorescente. A este sistema se hace referencia también en esta memoria como el sistema de código nanoinformador. Se sintetizan para cada diana sondas específicas de información y captura. La sonda informadora puede comprender al menos una primera región de fijación de la etiqueta a la cual están unidos uno o más monómeros de la etiqueta que emiten luz que constituye una primera señal; al menos una segunda región de fijación de la etiqueta, que no se solapa con la primera región de fijación de la etiqueta, a la cual están unidos uno o más monómeros de la etiqueta que emiten luz que constituye una segunda señal; y una primera secuencia específica de la diana. Preferiblemente, cada sonda informadora específica de la secuencia comprende una secuencia específica de la diana capaz de hibridarse a no más de un gen y comprende  
55  
60

opcionalmente al menos tres, o al menos cuatro regiones de fijación de la etiqueta, comprendiendo dichas regiones de fijación uno o más monómeros de la etiqueta que emiten luz, que constituye al menos una tercera señal, o al menos una cuarta señal, respectivamente. La sonda de captura puede comprender una segunda secuencia específica de la diana; y un primer marcador de afinidad. En algunas realizaciones, la sonda de captura puede comprender también una o más regiones de fijación de etiqueta. Preferiblemente, la primera secuencia específica de la diana de la sonda informadora y la segunda secuencia específica de la diana de la sonda de captura se hibridan a diferentes regiones de hibridación, la "biblioteca de sondas". La abundancia relativa de cada diana se mide en una sola reacción de hibridación multiplexada. El método comprende poner en contacto la muestra con una biblioteca de sondas, de tal modo que la presencia de la diana en la muestra crea un complejo par de sondas-diana. El complejo se purifica luego. Más específicamente, la muestra se combina con la biblioteca de sondas, y la hibridación se produce en solución. Después de la hibridación, los complejos hibridados tripartitos (pares de sondas y diana) se purifican en un procedimiento de dos pasos utilizando cuentas magnéticas unidas a oligonucleótidos complementarios a las secuencias universales presentes en las sondas de captura e información. Este proceso de purificación dual permite que la reacción de hibridación se impulse hasta completarse con un gran exceso de sondas específicas de la diana, a fin de que las mismas se eliminen finalmente, y, por tanto, no interfieran con la fijación y obtención de la imagen de la muestra. Todos los pasos posteriores a la hibridación se manipulan robóticamente en un robot de manipulación de líquidos personalizado (Prep Station, NanoString Technologies). Las mezclas de reacción purificadas son depositadas típicamente por la Prep Station en celdas de flujo individuales de un cartucho de muestra, unidas a una superficie recubierta con estreptavidina por la sonda de captura, se someten a electroforesis para alargar las sondas informadoras, y se inmovilizan. Después del procesamiento, el cartucho de la muestra se transfiere a un dispositivo de recogida de imágenes y datos totalmente automático (Digital Analyzer, NanoString Technologies). El nivel de expresión de una diana se mide obteniendo la imagen de cada muestra y contando el número de veces que se detecta el código para dicha diana. Para cada muestra, se obtienen típicamente imágenes de 600 campos de visión (FOV) (1376 X 1024 píxels) que representan aproximadamente 10 mm<sup>2</sup> de la superficie de unión. La densidad de imagen típica es 100-1200 informadores contados por campo de visión, dependiendo del grado de multiplexación, la cantidad de muestra introducida, y la abundancia global de la diana. Los datos se emiten en formato de hoja de cálculo simple enumerando el número de recuentos por diana, por muestra. Este sistema puede utilizarse junto con nanoinformadores. Descripción adicional relativa a los nanoinformadores puede encontrarse en la Publicación Internacional No. WO07/076129 y WO07/076132, y la Publicación de Patente U.S. Núm. 2010/0015607 y 2010/0261026.

Adicionalmente, el término sondas de ácido nucleico y nanoinformadores puede incluir los diseñados racionalmente (p. ej. secuencias sintéticas) descritos en la Publicación Internacional Núm. WO 2010/019826 y la Publicación de Patente U.S. Núm. 2010/0047924.

Típicamente, el valor de referencia predeterminado es un valor umbral o un valor de corte. Típicamente, un "valor umbral" o "valor de corte" puede determinarse experimentalmente, empíricamente, o teóricamente un valor umbral puede seleccionarse también arbitrariamente basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como podría ser reconocido por una persona con experiencia ordinaria en la técnica. Por ejemplo, la medida retrospectiva de los niveles de expresión en muestras históricas de pacientes guardadas adecuadamente puede utilizarse para establecer el valor de referencia predeterminado. El valor umbral tiene que determinarse a fin de obtener la sensibilidad y especificidad óptimas conforme a la función del test y el balance beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de positivos falsos y negativos falsos). Típicamente, la sensibilidad y especificidad óptimas (y por tanto el valor umbral) pueden determinarse utilizando una curva Receiver Operating Characteristic (ROC) basada en datos experimentales. Por ejemplo, después de la cuantificación del nivel de expresión en un grupo de referencia, puede utilizarse análisis algorítmico para el tratamiento estadístico de los niveles determinados en las muestras a ensayar, y obtener así un estándar de clasificación que tiene significación para la clasificación de las muestras. El nombre completo de la curva ROC es Receiver Operator Characteristic Curve, que se conoce también como curva característica de operación del receptor. La misma se utiliza principalmente para tests diagnósticos de Bioquímica clínica. La curva ROC es un indicador exhaustivo que refleja las variables continuas de tasa de positivos verdaderos (sensibilidad) y tasa de positivos falsos (1-especificidad). La misma revela la relación entre sensibilidad y especificidad con el método de composición de imágenes. Se establece una serie de diferentes valores de corte (valores umbral o críticos, valores límite entre resultados normales y anormales del test de diagnóstico como variables continuas para calcular una serie de valores de sensibilidad y especificidad. La sensibilidad se utiliza luego como la coordenada vertical, utilizándose la especificidad como la coordenada horizontal para trazar una curva. Cuanto mayor es el área bajo la curva (AUC), tanto mayor es la exactitud del diagnóstico. En la curva ROC, el punto más próximo al extremo superior izquierdo del diagrama de coordenadas es un punto crítico que tiene a la vez valores altos de sensibilidad y especificidad. El valor AUC de la curva ROC está comprendido entre 1,0 y 0,5. Cuando AUC > 0,5, el resultado del diagnóstico es cada vez mejor a medida que AUC se aproxima a 1. Cuando AUC está comprendido entre 0,5 y 0,7, la exactitud es baja. Cuando AUC se encuentra entre 0,7 y 0,9, la exactitud es moderada. Cuando AUC es mayor que 0,9, la exactitud es muy alta. Este método algorítmico se realiza preferiblemente con una computadora. Para el trazado de la curva ROC pueden utilizarse software o sistemas existentes en la técnica, tales como: software médico estadístico MedCalc 9.2.0.1, SPSS 9.0, ROCPOWER. SAS, DESIGNROC. FOR, MULTIREADER POWER.SAS, CREATE-ROC.SAS, GB STAT V10.0 (Dynamic Microsystems, Inc. Silver Spring, Md., USA), etc.

En algunas realizaciones, el valor de referencia predeterminado se determina realizando un método que comprende los pasos de

a) proporcionar una colección de muestras de pacientes con cirrosis alcohólica descompensada;

5 b) proporcionar, para cada muestra proporcionada en el paso a), información relativa al desenlace clínico real para el paciente correspondiente (es decir la duración de la supervivencia global (OS));

c) proporcionar una serie de valores de cuantificación arbitrarios;

d) determinar el nivel de expresión del gen de interés para cada muestra contenida en la colección proporcionada en el paso a);

10 e) clasificar dichas muestras en dos grupos para un valor de cuantificación arbitrario específico en el paso c), respectivamente: (i) un primer grupo que comprende muestras que exhiben un valor de cuantificación para un nivel que es más bajo que el dicho valor de cuantificación arbitrario contenido en los dichos valores de cuantificación de serie; (ii) un segundo grupo que comprende muestras que exhiben un valor de cuantificación para dicho nivel que es más alto que el dicho valor de cuantificación arbitrario contenido en los dichos valores de cuantificación de serie; con lo cual se obtienen dos grupos de muestras para dicho valor de cuantificación específico, en donde las muestras de  
15 cada grupo se enumeran por separado;

f) calcular la significación estadística entre (i) el valor de cuantificación obtenido en el paso e) y (ii) el desenlace clínico real de los individuos de los cuales proceden las muestras contenidas en los grupos primero y segundo definidos en el paso f);

20 g) reiterar los pasos f) y g) hasta que se ensaya cualquier valor de cuantificación arbitrario proporcionado en el paso d);

h) ajustar dicho valor de referencia predeterminado como constituido por el valor de cuantificación arbitrario para el cual se ha calculado la significación estadística más alta (la más significativa) en el paso g).

25 Por ejemplo, se ha evaluado el nivel de expresión para 100 muestras de 100 individuos. Las 100 muestras están clasificadas conforme al nivel de expresión. La muestra 1 tiene la densidad máxima y la muestra 100 tiene la densidad mínima. Una primera agrupación proporciona dos subconjuntos: en un lado la muestra Núm. 1 y en el otro lado las otras 99 muestras. La agrupación siguiente proporciona por un lado las muestras 1 y 2 y por el otro lado las 98 muestras restantes, etc., hasta la última agrupación: en un lado las muestras 1 a 99 y en el otro lado la muestra Núm. 100. Conforme a la información relativa al desenlace clínico real para el paciente correspondiente, se preparan curvas Kaplan-Meier para cada uno de los 99 grupos de dos subconjuntos. Se calcula también para cada uno de los 99 grupos el valor p entre ambos subconjuntos. Se selecciona luego el valor de referencia predeterminado tal que la discriminación basada en el criterio del valor p mínimo es la más fuerte. Dicho de otro modo, el nivel de expresión correspondiente al límite entre ambos subconjuntos para el cual p es mínimo se considera como el valor de referencia predeterminado. Debe indicarse que el valor de referencia predeterminado no es necesariamente el valor de la mediana de los niveles de expresión. Así, en algunas realizaciones, el valor de referencia predeterminado permite la discriminación entre un pronóstico malo y uno bueno con respecto al tiempo de supervivencia para un paciente. En la práctica, se obtienen generalmente valores de significación estadística alta (p. ej., valores P bajos) para una gama de valores de cuantificación arbitrarios sucesivos, y no sólo para un valor de cuantificación arbitrario aislado. Así, en algunas realizaciones, en lugar de utilizar un valor de referencia predeterminado definido, se proporciona una gama de valores. Por tanto, se ajusta arbitrariamente un valor de significación estadística mínimo (umbral de significación mínimo, p. ej., valor P umbral máximo) y se retiene una gama de una pluralidad de valores de cuantificación arbitrarios para los cuales el valor de significación estadística calculado en el paso g) es mayor (más significativo, p. ej. valor P más bajo), con lo que se proporciona una gama de valores de cuantificación. Esta gama de valores de cuantificación incluye un valor de "corte" como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, conforme a esta realización específica de un valor de "corte", el desenlace puede determinarse por comparación del nivel de expresión con la gama de valores que se identifican. En algunas realizaciones, un valor de corte consiste por tanto en una gama de valores de cuantificación, p. ej. centrada en el valor de cuantificación para el cual se encontró el valor de significación estadística más alto (p. ej. generalmente el valor p mínimo encontrado). Por ejemplo, en una escala hipotética de 1 a 10, si el valor de corte ideal (el valor con la significación estadística más alta) es 5, un intervalo adecuado (ilustrativo) puede ser de 4-6. Por ejemplo, un paciente puede evaluarse por comparación de valores obtenidos por determinación del nivel de expresión del gen de interés, donde los valores mayores que 5 revelan un de pronóstico malo y los valores menores que 5 revelan un de pronóstico bueno. En otra realización, un paciente puede evaluarse por comparación de valores obtenidos por medida del nivel de expresión del gen y comparación de los valores en una escala, en la cual los valores superiores al intervalo de 4-6 indican un pronóstico malo y los valores inferiores al intervalo de 4-6 indican un de pronóstico bueno, indicando los valores que caen dentro del intervalo de 4-6 una situación (o de pronóstico) intermedia.  
55

En algunas realizaciones, cuando se determinan los niveles de expresión de al menos dos genes, se calcula un registro que es una composición de dichos niveles de expresión y se compara con su valor de referencia predeterminado correspondiente, en la cual cuando el registro es mayor que el valor de referencia predeterminado se deduce que el



paciente tendrá un tiempo de supervivencia corto, y cuando el registro es menor que el valor de referencia predeterminado, se deduce que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia largo. Típicamente, el registro es el registro IFN como se describe en el EJEMPLO.

5 El método de la presente invención es particularmente adecuado para determinar si un paciente con cirrosis alcohólica descompensada es elegible para trasplante de hígado. Conforme a ello, la presente descripción se refiere a un método de tratamiento de un paciente con cirrosis alcohólica descompensada que comprende determinar el tiempo de supervivencia del paciente por el método de la presente invención, y realizar el trasplante de hígado cuando se deduce que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia corto.

10 La invención se ilustrará adicionalmente por las figuras y ejemplos siguientes. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de la presente invención.

#### Figuras:

15 **Figura 1. Gráfico de Forrest que muestra el valor de pronóstico de 6 ISGs, el registro IFN de los autores de la invención, 2 genes citocina y 3 registros de pronóstico bien conocidos utilizados en pacientes con cirrosis en análisis univariante.** Se llevaron a cabo experimentos RT-qPCR ex vivo en PBMCs de 42-56 pacientes; sin embargo, en algunos experimentos no se obtuvieron resultados de expresión relativa de mRNA debido a reasociación ineficiente de cebadores, y los pacientes que se sometieron a trasplante de hígado se contaron como confirmados. La relación potencial de los niveles génicos de citocinas al riesgo de muerte (contado como evento) se analizó por análisis univariante con regresión de Cox.

#### Ejemplos:

20 Ejemplo 1:

Pacientes y métodos

I - Pacientes

25 Este protocolo ha sido aprobado por el comité ético (Comité de protección de las personas Isla de Francia III) y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes. Se seleccionaron 94 pacientes cirróticos del Departamento de Enfermedades Hepáticas del Hospital Beaujourn (Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Clichy, 92110, Francia) conforme a los requisitos previos de cada experimento. Como se menciona en la sección de métodos de la parte 1, los pacientes incluidos en el estudio padecían cirrosis alcohólica grave descompensada comprobada por biopsia. Sin embargo, se mantenían estables y no presentaban infección bacteriana o hemorragia gastrointestinal sin tratar o tratada recientemente (en menos de una semana). Las características globales de los pacientes se exponen en la

30 Tabla 1. Se seleccionaron individuos sanos entre los cuidadores sanitarios. Se tomaron muestras de 15 a 20 ml de sangre venosa en tubos de EDTA de 3 ml (Becton Dickinson, Francia) de los pacientes y de individuos sanos. Se recogieron los datos clínicos y biológicos y se calcularon los registros de pronóstico relevantes.

35 **Tabla 1. Características de los pacientes con cirrosis alcohólica descompensada incluidos durante la segunda parte de este trabajo.**

Variable	n= 94
Varón	77 (81,9)
Edad (años)	57,5 (50-61)
Registro Child-Pugh	11 (9-12)
Registro MELD	19,3 (15,6-23,8)
Creatinina en Suero ( $\mu\text{mol/l}$ )	84,2 (57,0-97,0)
Plaquetas (G/l)	103,0 (65,2-140)
Leucocitos (G/l)	6,9 (5-9,4)
Linfocitos (G/l)	1,1 (0,8-1,7)
Neutrófilos (G/l)	4,4 (2,9-6,6)
Monocitos (G/l)	0,8 (0,5-1)
CRP	13 (6-29)
Na (mmoL/l)	135 (131-137)
Registro CLIF SOFA	6 (4-7)
Grado ACLF	0 (0-0)
Ascitis	79 (84,0)
Encefalopatía	34 (36)

Antibiótico	47 (50)
B-bloqueantes	39 (41,5)
Corticosteroides	6 (6,6)
Hepatitis alcohólica aguda	24 (25,5)

Los resultados se expresan como número (porcentaje) o mediana (IQR).

II - Aislamiento y cultivo de PBMC y monocitos, extracción de RNA, RT-qPCR

*II-1. Aislamiento y cultivo de PBMC*

5 El aislamiento y cultivo de las PBMCs se realizó como se describe en la sección correspondiente de pacientes y métodos de la parte 1 de este trabajo.

10 PBMCs de pacientes e individuos sanos se dejaron sin estimular o se estimularon durante 4 horas con 1 µg/ml de LPS (agonista TLR4, Escherichia coli serotipo 0111:B4, Sigma Aldrich St Louis, MO, USA), 10 µg/ml Poli I :C (agonista TLR3, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), 10 µg/ml Poli I:C + lipofectamina (agonista RLR, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) o concentraciones que aumentaban 10 veces de IFN-β humano 1a (PBL Assay Science, Piscataway, NJ, USA) que comprendían desde 1 UI/mL (5 pg/mL) a 1000 UI (5 µg/ml). En algunos experimentos, las PBMCs se estimularon con 1 µg/ml de LPS (Escherichia coli serotipo 0111:B4, Sigma Aldrich) durante una hora solamente.

*II-2. Aislamiento y cultivo de monocitos*

15 Una sección correspondiente de pacientes y métodos informada de la parte 1 de este trabajo, después del aislamiento de las PBMC, se separaron los monocitos de otras células inmunes utilizando selección negativa gracias a cuentas electromagnéticas (Dynabeads®, Kit de monocitos humanos intactos, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. Los monocitos se cultivaron conforme a los protocolos descritos para PBMCs.

*II-3. Cicloheximida*

20 Las PBMC de los pacientes se aislaron, se contaron y se cultivaron conforme al protocolo descrito anteriormente. Las células se preincubaron o no durante 15 minutos con Cicloheximida (CHX, 10 µg/ml, Sigma, St Louis, MO, USA), un inhibidor natural de la síntesis de proteínas, y se dejaron luego sin tratar o se estimularon con 1 µg/ml de LPS durante 4 horas. A final del tiempo de cultivo, las células se cosecharon y se lisaron como se describe más adelante.

*II-4. Brefeldin A*

25 Las PBMC de los pacientes se aislaron, contaron y cultivaron conforme al protocolo descrito anteriormente. Las células se incubaron o no durante 2 minutos con Brefeldin AA (BRF, Sigma, St Louis, MO, USA), un inhibidor de la secreción de proteínas, y se dejaron luego sin tratar o se estimularon con 1 µg/ml de LPS durante 4 horas. Al final del tiempo de cultivo, se cosecharon las células y se lisaron como se describe más adelante.

*II-5. Bloqueo de la cadena receptora 2 de IFN-α/β (IFNAR2)*

30 Las PBMCs de pacientes e individuos sanos se aislaron, contaron y cultivaron conforme al protocolo descrito anteriormente con 1 µg/ml de LPS. Como se ha descrito en estudios anteriores [159], las PBMCs se preincubaron o no con el anti-anticuerpo monoclonal de la cadena receptora 2 de IFN-α/β humano (30 µg/ml, PBL Assay Science, Piscataway, NJ, USA) o fragmento Fc de inmunoglobulina isotópica de control (IgG2) y se dejaron luego sin tratar o se estimularon con 1 µg/ml de LPS durante 4 horas. Al final del tiempo de cultivo, se cosecharon las células y se lisaron como se describe más adelante en esta memoria.

35 *II-6. Experimentos de tolerancia de LPS*

40 Las PBMCs de pacientes e individuos sanos se estimularon una o dos veces con LPS. Las mismas se estimularon o no una primera vez con 10 ng/ml de LPS durante 24 horas y se estimularon luego con 10 ng/ml de LPS durante 4 horas. Así, por una parte, las PBMCs naïf se estimularon solamente una vez con LPS durante 4 horas después de un periodo de cultivo de 24 horas sin estimulación y, por otra parte, se estimularon también PBMCs tolerantes con LPS durante 4 horas, pero después de una estimulación previa de 24 horas con LPS a dosis baja.

*II-7. Aislamiento de RNA*

Véase el párrafo correspondiente en la sección materiales y métodos de la parte 1 de este manuscrito.

*II-8. Transcripción inversa*

45 Se eliminó el DNA genómico utilizando DNasa I, kit exento de RNasa (Fermentas Life Sciences, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. Se mezcló 1 µg de RNA con 1 µl de DNasa y 1 µl de tampón de DNasa I en un volumen de

10  $\mu$ l y se incubó durante 30 minutos a 37°C en un termociclador de PCR (Applied Biosystems 2720, Singapur). La actividad de DNasa se interrumpió por adición de 1  $\mu$ l de EDTA (50mM) e incubación de la mezcla durante 10 minutos a 65°C en el termociclador. La transcripción inversa se condujo utilizando un kit de síntesis Thermo Fischer Scientific Verso cDNA siguiendo el protocolo del fabricante (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). La mezcla obtenida  
 5 previamente se completó con oligonucleótidos iniciadores oligo-DT, desoxinucleótidos, tampón, intensificador y enzima VERSO. La mezcla se incubó durante 60 minutos a 42°C. La actividad de la enzima transcriptasa inversa se paró por calentamiento a 95°C y el cDNA se guardó a - 20°C.

#### II-9. Análisis PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR)

Se utilizó el análisis PCR cuantitativo para evaluar la expresión de mRNA en las células inmunes. Se diseñaron Cebadores Específicos para los genes estudiados utilizando la versión 4. 0 de Primer3web. Se calcularon las eficiencias de amplificación porcentuales de la PCR (E) para cada cebador como  $E = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1) \times 100$ , utilizando la pendiente de la gráfica de regresión semilogarítmica de Ct frente al logaritmo de la entrada de cDNA (dilución 10 veces, serie de 5 puntos). Se aplicó un umbral de eficiencia de 5% por encima o por debajo de 100% (es decir una eficiencia entre 1,9 y 2,1). [150]. Se diluyeron luego las soluciones de DNA desde 1/15 a 1/30 conforme al  
 10 nivel de expresión del mRNA. Se utilizaron placas de 96 pocillos. Cada pocillo se llenó con 5  $\mu$ l de solución diluida de cDNA y una solución mixta que contenía 10  $\mu$ l de enzima SYBR Green I (ABgene, Thermo Scientific, Waltham, USA), 3  $\mu$ l de agua destilada y 2 $\mu$ l de cebadores específicos. Las placas se sellaron con films de plástico y se insertaron en un ciclador Light Cycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Se condujeron secuencias de termociclación de 40 ciclos. Se ejecutó sistemáticamente una curva de fusión al final de la reacción para comprobar  
 15 que el par de cebadores utilizado producía un solo producto. Se obtuvo el nivel Umbral del Ciclo (Ct) para cada gen ensayado. Todos los análisis se realizaron por duplicado. Para favorecer la reproducibilidad técnica de los experimentos qPCR, se excluyeron del análisis las muestras con desviación estándar del punto de cruzamiento >0,3 del valor medio de Ct. Los resultados se expresaron como las diferencias de N veces en la expresión del gen diana con relación a la expresión del gen interno *GAPDH* en las PBMCs no estimuladas de los individuos sanos. Los resultados se determinaron como  $2^{-\Delta C_t^{\text{muestra}}}$ , donde el valor  $\Delta C_t$  de la muestra se determinó sustrayendo el valor medio Ct del gen diana del valor medio Ct del gen *GAPDH*. Como se ha descrito en otro lugar, los valores obtenidos de las muestras se normalizaron luego de tal manera que la mediana de los valores de los genes correspondientes en PBMCs de los individuos sanos era 1. [160].

Como se ha descrito previamente, se utilizó el cambio de la mediana de número de veces de 8 ISGs, cuando se comparó con la mediana de los controles sanos combinados, para crear un registro de interferón para cada paciente (Yao, Y., et al., Development of Potential Pharmacodynamic and Diagnostic Markers for Anti-IFN-alpha Monoclonal Antibody Trials in Systemic Lupus Erythematosus. Hum Genomics Proteomics, 2009. 2009.; Rice, G. I., et al., Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutieres syndrome associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, and ADAR: a case-control study. Lancet Neurol, 2013. 12(12): p. 1159-69.). Los genes seleccionados fueron los 7 genes estimulados de interferón que se expresaban más fuertemente en las células "sanas" estimuladas con LPS (a saber, *IFIT1*, *CXCL10*, *MX2*, *IFIH1*, *DDX58*, *OAS2* y *TRIM22*) y GBP4 (como miembro de la familia fisiopatológicamente importante GBP).

#### III -Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se expresaron luego como mediana (intervalo intercuartílico) y las variables categóricas como número (porcentaje). Las comparaciones entre grupos de variables cuantitativas se realizaron utilizando el test Mann-Whitney y el test Wilcoxon apropiado. Todos los tests eran de dos colas y utilizaban un nivel de significación de 0,05. La manipulación y el análisis de los datos se realizaron con SPSS 22. 0 (SPSS Inc., Chicago, IL) y GraphPad Prism versión 6 para Mac OS X. La supervivencia acumulativa se calculó por el método Kaplan-Meier. Los pacientes que se sometieron a trasplante de hígado se contaron como confirmados. La relación potencial de los niveles de los genes de citocinas con el riesgo de muerte se realizó por análisis univariante de regresión de Cox. Cada variable que alcanzó un valor  $p < 0,05$  se introdujo en un modelo Cox con registro MELD a fin de determinar si estas variables tenían un valor de pronóstico independientemente del registro MELD, como se ha informado anteriormente

#### Resultados

##### I – La expresión inducida por LPS de los genes identificados como ISGs por la base de datos Interferome es deficiente en las PBMCs de los pacientes con cirrosis alcohólica descompensada

Las microrredes de expresión de los inventores revelaron un núcleo de 444 genes regulados al alza en las PBMCs "sanas", pero no regulados o regulados a la baja en las PBMCs cirróticas pertenecientes a la "respuesta de defensa al virus" GO BP. Es interesante que, consultando la base de datos pública Interferome ([interferome.its.monash.edu.au](http://interferome.its.monash.edu.au)), los inventores encontraron que 174 de estos genes estaban clasificados como ISGs, entre los cuales 168 eran genes tipo 1 estimulados con IFN. Además, otros 5 genes (*IDO1*, *LAG3*, *OAS3*, *RSAD2* y *USP18*) clasificados como ISGs por Interferome eran inducidos por LPS tanto en las PBMCs "sanas" como en las cirróticas, pero su expresión era más de dos veces mayor en las células "sanas" que en las cirróticas. Finalmente, un solo gen era regulado a la baja por LPS en las PBMCs "cirróticas" mientras que era regulado al alza por LPS en las "PBMCs sanas".

A continuación, se seleccionó un conjunto de 46 ISGs tipo 1 conforme a sus funciones y se midieron, utilizando RT-qPCR, los niveles relativos en estado estacionario de mRNA de cada gen en PBMCs estimuladas con LPS, de un grupo independiente de 33 pacientes con cirrosis alcohólica descompensada y 17 individuos sanos. Como control, se midió también en PBMCs de los mismos pacientes en las mismas condiciones la expresión de 6 genes de citocinas (*IL10*, *IL12B*, *IL6*, *IL1B*, *IL8*, y *TNF*) y 4 genes de quimiocinas (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL5*).

LPS inducía la totalidad de los 46 genes en ambos grupos. Sin embargo, el nivel de expresión inducido por LPS de 70% (32 de los 46 genes estudiados) de los ISGs era significativamente menor en las PBMCs "cirróticas" que en las PBMCs "sanas". Utilizando transferencia Western, se confirmó este defecto al nivel de proteínas. De hecho, se observaba una menor expresión de los niveles de proteína OAS2 (codificada por el ISG *OAS2*) en las PBMCs cirróticas estimuladas con LPS, comparados con las PBMCs "sanas" estimuladas con LPS.

Considerados en su conjunto, nuestros resultados muestran, en las PBMCs de pacientes con cirrosis alcohólica descompensada, una expresión deficiente inducida por LPS de un gran grupo de genes identificados como ISGs de IFN tipo 1 por Interferome. Esta inducción deficiente de ISGs en las PBMCs cirróticas no era debida a una muerte celular aumentada. De hecho, los inventores cuantificaron la lisis celular y la muerte celular por medida de lactato-deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante de PBMCs sanas (n = 14) y cirróticas (n = 14) estimuladas con LPS durante 4 horas utilizando un ensayo colorimétrico. Se encontró un porcentaje medio muy bajo de citotoxicidad que no difería entre las células sanas y las cirróticas (0,6% frente a 1,1%, p = 0,51). Adicionalmente, se encontraron varios genes de citocina y quimiocina tales como *TNF* (codificante de TNF- $\alpha$ ), *CXCL2*, *CXCL3* y *CXCL5* (codificante de ENA-78) con expresión significativamente mayor inducida por LPS en PBMCs cirróticas. Por último, se encontró el defecto similar de expresión de ISG después de una hora de estimulación con LPS.

#### II - Verificación del estado ISG real de los genes

Se analizaron las funciones de cada gen y, por razones prácticas, se seleccionó un conjunto "restringido" de 21 genes de interés identificados como ISGs por la base de datos Interferome y cuya expresión estaba alterada en las PBMCs cirróticas estimuladas con LPS para los experimentos realizados posteriormente. Se comprobó el estado ISG "auténtico" de cada gen de interés utilizando dos estrategias. En primer lugar, los inventores se preguntaban si el bloqueo del receptor de IFN tipo I (IFNAR) podría dar como resultado una inhibición de la inducción de estos genes por LPS. Por ello, PBMCs de 5 pacientes con cirrosis alcohólica descompensada, se preincubaron, o no, con un antagonista (30  $\mu$ g/ml) (del receptor de IFN- $\alpha/\beta$  tipo I de la cadena 2 (IFNAR2) durante 15 minutos antes de ser estimuladas con LPS. Se encontró que la preincubación de las células cirróticas con el antagonista IFNAR2 anulaba la expedición inducida por LPS de 19 genes (95%), mientras que la incubación con el anticuerpo isotipo de control no lo hacía. Este efecto inhibitor era específico para ISG, en la medida en que la expresión inducida por LPS de genes codificantes de citocinas no conocidos como pertenecientes a ISGs no se veía alterada por preincubación con IFNAR 2. Adicionalmente, el anticuerpo IFNAR tenía el mismo efecto sobre la inducción de ISG en PBMCs "sanas" estimuladas con LPS.

En segundo lugar, los inventores se preguntaban si una estimulación con IFN- $\beta$  podría dar como resultado una inducción de estos genes. Por ello, PBMCs de 8 pacientes con cirrosis alcohólica descompensada se estimularon con 10 UI/ml de IFN- $\beta$ . 18 de los 19 genes cuya inducción por LPS era sensible al antagonista IFNAR se indujeron también por una estimulación con 10 UI/ml de IFN- $\beta$ . Así, en total, se encontró que entre el conjunto restringido de los 21 genes de interés identificados como ISGs por la base de datos pública Interferome, 18 (86%) eran ISGs "auténticos" en las PBMCs de pacientes con cirrosis alcohólica descompensada.

#### III - Construcción de una firma de ISG denominada registro de IFN

Como se ha realizado anteriormente (Yao, Y., et al., Development of Potential Pharmacodynamic and Diagnostic Markers for Anti-IFN-alpha Monoclonal Antibody Trials in Systemic Lupus Erythematosus. Hum Genomics Proteomics, 2009. 2009.; Rice, G. I., et al., Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutieres syndrome associated with mutations in *TREX1*, *RNASEH2A*, *RNASEH2B*, *RNASEH2C*, *SAMHD1*, and *ADAR*: a case-control study. Lancet Neurol, 2013. 12(12): p. 1159-69.) los inventores desarrollaron una firma de ISG que se denominó registro de IFN para cuantificar la magnitud de la regulación global a la baja de ISGs en PBMCs de pacientes con cirrosis. Resumidamente, se calculó el registro IFN para cada paciente e individuo sano como el cambio mediano de veces de 8 ISGs normalizados con la mediana de los controles sanos combinados. Los 7 ISG que se expresaban más fuertemente (entre los 18 ISGs auténticos identificados anteriormente) en células "sanas" estimuladas con LPS (a saber, *IFIT1*, *CXCL10*, *MX2*, *IFIH1*, *DDX58*, *OAS2* y *TRIM22*) se utilizaron en el registro IFN. A fin de incluir un miembro de la familia fisiopatológicamente importante GBP, se seleccionó también *GBP4*, el miembro de la familia GBP inducido más fuertemente por LPS. Por tanto, se incluyeron 8 ISGs en el registro IFN. Su nombre, locus correspondiente, proteína codificada y funciones se presentan en la Tabla A.

El cálculo del registro IFN en PBMCs estimuladas con LPS de los pacientes de cirrosis descompensada e individuos sanos mencionados anteriormente permitió a los inventores confirmar la inducción global deficiente de ISGs en las células inmunes de los pacientes. Es importante observar que los valores del registro IFN no se correlacionaban con los recuentos de leucocitos, monocitos o linfocitos y el tratamiento con antibióticos o beta-bloqueantes de los pacientes.

IV – Los defectos en la expresión de ISG basal e inducida por LPS están ligados a la gravedad de la cirrosis

5 Dado que, en los pacientes con cirrosis, las alteraciones de la respuesta inmune innata y la translocación bacteriana están ligadas estrechamente a la gravedad de la cirrosis, se investigó la expresión de ISG no estimulados y estimulados con LPS en PBMCs de pacientes con gravedad creciente de cirrosis como se refleja por el registro Child-Pugh. Se incluyeron 8 pacientes con cirrosis Child-Pugh grado A, 20 con Child-Pugh grado B y 45 con Child-Pugh grado C (Tabla 2).

**Tabla 2. Características de los pacientes Child-Pugh A, Child-Pugh B, y Child-Pugh C incluidos**

	Child Pugh A	Child Pugh B	Child-Pugh C
Núm. de pacientes, n	7	20	28
Sexo (M/F)	6 (0,85)	17 (0,8)	23 (82)
Edad, años	59,5 (53-66)	57 (51-60)	59 (53-63)
Registro Child-Pugh	5 (5-5,2)	8,5 (8-9)	12 (11-13)
MELD	8,9 (8-10)	13 (10-16)	21,2 (18-27)
Creatinina en suero (µmol/l)	68,5 (66-71)	74,5 (67-97)	67 (57-88)
Plaquetas (g/l)	124 (81-147)	113(85-155)	96 (56-120)
Leucocitos (g/l)	5,2 (3,5-5,8)	6 (4,4-7,7)	7,3 (4,8-10,1)
Linfocitos (g/l)	1,16 (0,8-1,6)	1,07 (0,8-1,5)	1,03 (0,7-1,6)
Monocitos (g/l)	0,39 (0,3-0,5)	0,69 (0,5-0,9)	0,78 (0,5-1,1)
CRP (mg/l)	2,5 (2-4)	11(5-15)	16 (6-30)
Na (mmol/l)	138 (135-138)	135 (131-137)	134 (130-137)
Registro CLIF SOFA	1,5 (1-2)	3 (2,7-4)	7 (5-8)
Grado ACLF	0 (0)	0 (0-0)	0 (0-1)
Ascitis, n (%)	0 (0)	15 (75)	24 (87)
Encefalopatía	0 (0)	2 (10)	13 (45)
Antibióticos, n (%)	0 (0)	5 (25)	15 (55)
β-bloqueante, n (%)	2 (28)	5 (25)	10 (37)
Corticosteroides, n (%)	0 (0)	0 (0)	3 (11)
Hepatitis alcohólica histológica, n (%)	0 (0)	2 (10)	9 (33)

10 Como se indica por los valores menores del registro IFN, se encontró que el defecto en la expresión de ISG de las células inmunes tanto no estimuladas como estimuladas por LPS empeora significativamente con la gravedad de la cirrosis. Mientras que el registro IFN no difería estadísticamente entre los pacientes Child A y los individuos sanos, el mismo era significativamente menor en los pacientes Child-Pugh B y Child-Pugh C en comparación con los Child A. Así pues, la respuesta ISG más baja parece estar restringida a los pacientes cirrótica más graves.

15 V - Impacto de la expresión de ISG en el de pronóstico de los pacientes

Por último, los inventores intentaron demostrar la importancia primordial del sistema ISG y su regulación en los pacientes con cirrosis por investigación del impacto de su menor activación en el desenlace de los pacientes, para lo cual se monitorizó prospectivamente la supervivencia de pacientes en los cuales se midió la expresión de PBMC ISG. 40 pacientes (40%) murieron durante un seguimiento mediano (IQR) de 6,55 (1,32-12,60) meses. Utilizando el modelo Cox se encontró que, en las células no estimuladas, el valor del registro IFN de los inventores y la expresión de 6 de los 18 ISGs verdaderos de interés estaban asociados con el desenlace de los pacientes en análisis univariante (Figura 1). Es interesante, que cuanto menores eran el valor del registro IFN y la expresión de ISG, tanto mejor era el desenlace. Estos hallazgos son coherentes con la hipótesis de una regulación a la baja beneficiosa de la expresión de ISG en los pacientes con cirrosis grave para evitar la inmunopatología. La importancia fundamental del sistema ISG se puso de manifiesto por el hecho de que la probabilidad del valor del registro IFN en las células no estimuladas para predecir la muerte era mucho mayor que la de los registros usuales de pronóstico de los pacientes cirróticos tales como el registro MELD, el registro Child-Pugh, el registro CLIF-SOFA y el grado ACLF (Figura 1). Además, al contrario de los ISGs, la expresión no estimulada de los genes de citocina usuales no tenía valor de pronóstico alguno (Figura 1). La expresión de los ISGs y los genes de citocina después de estimulación con LPS no estaba asociada con el desenlace. En análisis multivariante, un valor alto del registro IFN basal seguía siendo un factor de riesgo de muerte con independencia del registro MELD, el registro CLIF-SOFA y el nivel CRP (Tabla 3). Es interesante que la mitad de estas muertes se debían a choque séptico y el 86% eran debidas a fallo multiorgánico (Tabla 4). Al nivel de genes, las expresiones basales altas de *MX2* y *OAS2* predecían también la muerte con independencia de los registros MELD y CLIF-SOFA. También es interesante que en el grupo de los inventores el registro IFN tenía la capacidad óptima de predicción de muerte para los pacientes con registro MELD menor que 19, el registro MELD mediano del grupo de los inventores. Así pues, el presente registro IFN puede permitir una detección precoz de los pacientes con cirrosis descompensada estable que se encuentran particularmente en riesgo de muerte en el futuro inmediato. De hecho, este subgrupo de pacientes puede obtener el beneficio máximo del trasplante de hígado.

Tabla 3. Valor de pronóstico de las expresiones del registro IFN basal, *MX2* y *OAS2* y de los registros usuales de pronóstico de los pacientes cirróticos (registro MELD y registro CLIF-SOFA). Se llevaron a cabo experimentos RT-qPCR ex vivo en PBMCs de 42-56 pacientes. Sin embargo, en algunos experimentos no se obtuvieron resultados de la expresión relativa de mRNA debido a la reasociación ineficiente de los cebadores y a que los pacientes que se sometieron a trasplante de hígado se contaron como comprobados. Para análisis bivariantes: se adaptaron 5 modelos Cox que incluían registro MELD en los cuales cada variable alcanzaba un  $p < 0,05$  sucesivamente, a fin de determinar si estas variables tenían un valor de pronóstico con independencia de los registros de pronóstico usuales de pacientes cirróticos (registro MELD, registro CLIF-SOFA y niveles CRP).

	Núm. de eventos	Núm. total de pacientes	Ratio de riesgo	95,0% CI para ratio de riesgo		Valor P
				Inferior	Superior	
Primer modelo	14	43				
<i>Registro IFN</i> basal			3,583	1,177	10,905	0,025
Registro MELD			1,071	0,993	1,155	0,074
Segundo modelo	14	43				
<i>Registro IFN</i> basal			3,958	1,358	11,533	0,012
Registro CLIF SOFA			1,126	0,904	1,403	0,288
Tercer modelo	13	42				
<i>Registro IFN</i> basal			4,072			0,007
CRP			1,007			0,454
Cuarto modelo	21	56				
Expresión basal de <i>MX2</i>			1,346	1,077	1,681	0,009
Registro MELD			1,091	1,020	1,167	0,011
Quinto modelo	21	56				
Expresión basal de <i>MX2</i>			1,416	1,144	1,752	0,001
Registro CLIF SOFA			1,301	1,063	1,591	0,010

Sexto modelo	20	55				
Expresión basal de OAS2			2,492	1,053	5,901	0,038
Registro MELD			1,060	0,984	1,141	0,122
Séptimo modelo	20	55				
Expresión basal de OAS2			2,754	1,235	60,140	0,013
Registro CLIF SOFA			1,153	0,930	1,429	0,195

Tabla 4. Causas de muerte (n = 14) en el grupo de pacientes en los cuales se midió el registro IFN (n = 43)

Causa de la muerte	n (%)
Choque séptico	7 (50)
MOF sin etiología	3 (22)
MOF subsiguiente a choque hemorrágico	2 (14)
Síndrome hepatorenal	1 (7)
Desconocida	1 (7)

**EJEMPLO 2:**

5 La expresión basal de ISG está relacionada con el desenlace en la cirrosis

Los inventores llevaron a cabo el seguimiento prospectivo de un grupo de pacientes después de la medida de la expresión de PBMC ISG en la inclusión. 41 pacientes murieron durante un seguimiento mediano de 6,55 (1,32-12,60) meses. Un modelo Cox univariante mostró que estaba asociada significativamente una mortalidad mayor con un modelo más alto de registro de enfermedad hepática en fase terminal (MELD), un registro IFN más alto en las células no estimuladas, y expresiones más altas de DDX58, MX2, OAS2, DDX60, IFI44, IFIT1, IFIT5 and IRF1 en las células no estimuladas (Figura 1; Tabla 5). Al contrario de los ISGs, la expresión de los genes de citocinas (con inclusión del ISG CXCL10) no predecía significativamente la muerte en las células no estimuladas (Figura 1; Tabla 5). Solamente uno (IFI35) de los genes medidos en células estimuladas por LPS predecía significativamente la muerte (Tabla 5). Un análisis bivariante que incluía los registros basales IFN y MELD indicaba que el primero era significativamente predictivo de muerte (Tabla 6). Estos resultados se explican principalmente por el valor de pronóstico intrínseco de MX2, OAS2, y DDX58 basales mayores. Finalmente, las expresiones basales mayores de IFI44 y DDX60 eran predictores significativos de muerte, con independencia del registro MELD (Tabla 6)

Tabla 5: valor de pronóstico del registro MELD y expresión ex vivo de ISG y genes de citocinas en PBMCs no estimuladas y estimuladas con LPS de pacientes con cirrosis relacionados con la Figura 1. Los genes resaltados tenían valor de pronóstico significativo (p <0,05).

Variables en la Ecuación	Núm. total de pacientes	Núm. de eventos	Ratio de riesgo	95,0% CI para ratio de riesgo		Valor p
<b>Registros de pronóstico</b>						
<b>Registro MELD</b>	<b>98</b>	<b>41</b>	<b>1,120</b>	<b>1,065</b>	<b>1,177</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Expresión génica en las células no estimuladas</b>						
<b>Genes estimulados con Interferón</b>						
<i>AIM2</i>	15	8	0,965	0,162	5,746	0,969
<i>BST2</i>	18	10	1,199	0,311	4,623	0,792
<i>CXCL10</i>	60	20	1,045	0,959	1,139	0,316
<i>CXCL11</i>	13	8	1,285	0,272	6,065	0,751
<b><i>DDX58</i></b>	<b>55</b>	<b>21</b>	<b>1,717</b>	<b>1,191</b>	<b>2,476</b>	<b>0,004</b>

ES 2 761 266 T3

<b>DDX60</b>	<b>46</b>	<b>16</b>	<b>2,526</b>	<b>1,391</b>	<b>4,586</b>	<b>0,002</b>
DHX58	49	18	1,209	0,729	2,005	0,461
EIF2AK2	18	9	1,128	0,690	1,845	0,631
GBP1	17	9	1,194	0,521	2,738	0,676
GBP2	16	9	0,468	0,087	2,526	0,378
GBP3	47	17	1,330	0,880	2,011	0,176
GBP4	53	19	1,217	0,723	2,047	0,459
GBP5	16	9	0,367	0,095	1,416	0,146
HERC5	18	10	1,448	0,707	2,966	0,312
IDO1	17	9	1,073	0,957	1,203	0,228
IFI16	16	8	0,527	0,054	5,099	0,580
<b>IFI35</b>	<b>54</b>	<b>21</b>	<b>1,067</b>	<b>0,905</b>	<b>1,259</b>	<b>0,440</b>
IFI44	17	9	1,711	1,091	2,683	0,019
IFIH1	54	20	1,551	0,982	2,449	0,060
<b>IFIT1</b>	<b>50</b>	<b>18</b>	<b>1,168</b>	<b>1,032</b>	<b>1,322</b>	<b>0,014</b>
IFIT2	16	9	1,339	0,964	1,862	0,082
IFIT3	49	18	1,016	0,987	1,047	0,282
<b>IFIT5</b>	<b>40</b>	<b>14</b>	<b>1,293</b>	<b>1,008</b>	<b>1,659</b>	<b>0,043</b>
IFITM3	18	10	1,084	0,903	1,300	0,387
IFNB1	37	17	1,157	0,907	1,476	0,241
IFNG	41	13	0,870	0,584	1,295	0,493
<b>IRF1</b>	<b>56</b>	<b>22</b>	<b>1,699</b>	<b>1,049</b>	<b>2,752</b>	<b>0,031</b>
ISG20	17	9	0,624	0,200	1,950	0,418
MB21D1	48	20	1,611	0,761	3,411	0,213
MCOLN2	15	8	1,002	0,446	2,251	0,996
MOV10	54	19	1,768	0,867	3,605	0,117
MX1	15	10	1,176	0,767	1,801	0,457
<b>MX2</b>	<b>56</b>	<b>21</b>	<b>1,416</b>	<b>1,151</b>	<b>1,741</b>	<b>0,001</b>
OAS1	16	9	1,914	0,799	4,585	0,145
<b>OAS2</b>	<b>55</b>	<b>20</b>	<b>3,359</b>	<b>1,634</b>	<b>6,908</b>	<b>0,001</b>
PNPT1	17	9	1,048	0,262	4,199	0,947
RSAD2	17	10	1,108	0,920	1,335	0,280
SMCHD1	18	10	0,904	0,495	1,651	0,742
TLR3	49	19	1,341	0,578	3,115	0,495
TLR7	52	20	1,449	0,479	4,384	0,511
TREX1	50	19	0,968	0,597	1,570	0,895
TRIM14	55	21	1,930	0,982	3,793	0,057
TRIM21	47	15	2,156	0,775	5,995	0,141
TRIM22	48	18	1,180	0,579	2,403	0,649
TRIM25	16	9	,704	0,174	2,848	0,623
TRIM5	16	9	1,193	0,772	1,843	0,426
USP18	13	8	0,901	0,407	1,995	0,798
XRN1	18	10	1,211	0,158	9,249	0,854
ZBP1	52	19	1,548	0,937	2,558	0,088
<b>Genes de citocina</b>						



ES 2 761 266 T3

<i>IL10</i>	81	34	1,152	0,643	2,063	0,634
<i>IL6</i>	52	20	0,989	0,966	1,012	0,353
<i>IL1B</i>	70	28	1,020	0,978	1,063	0,355
<i>IL8</i>	47	22	0,999	0,898	1,111	0,980
<i>CXCL1</i>	50	22	1,014	0,967	1,063	0,579
<i>CXCL2</i>	52	23	0,989	0,925	1,057	0,746
<i>CXCL3</i>	51	22	0,977	0,931	1,025	0,337
<i>CXCL5</i>	48	21	0,955	0,889	1,027	0,214
<i>TNF</i>	37	17	0,362	0,103	1,275	0,114
<b>Expresión de genes en las células estimuladas por LPS</b>						
<b>Genes estimulados con interferón</b>						
<i>AIM2</i>	7	6	1,562	0,616	3,959	0,348
<i>BST2</i>	10	7	1,823	0,551	6,031	0,325
<i>CXCL10</i>	40	12	0,991	0,945	1,039	0,704
<i>CXCL11</i>	8	5	0,993	0,811	1,216	0,948
<i>DDX58</i>	33	12	1,004	0,958	1,052	0,883
<i>DDX60</i>	28	10	1,030	0,866	1,225	0,739
<i>DHX58</i>	31	11	0,970	0,796	1,182	0,763
<i>EIF2AK2</i>	15	9	0,779	0,581	1,046	0,097
<i>GBP1</i>	10	7	1,047	0,902	1,215	0,546
<i>GBP2</i>	10	7	1,402	0,734	2,677	0,307
<i>GBP3</i>	28	11	0,993	0,874	1,128	0,915
<i>GBP4</i>	33	12	1,009	0,891	1,141	0,891
<i>GBP5</i>	10	7	1,115	0,913	1,363	0,286
<i>HERC5</i>	10	7	1,019	0,781	1,329	0,891
<i>IDO1</i>	10	7	0,989	0,944	1,036	0,650
<i>IFI16</i>	17	9	1,386	0,615	3,126	0,431
<b><i>IFI35</i></b>	<b>26</b>	<b>10</b>	<b>1,313</b>	<b>1,007</b>	<b>1,711</b>	<b>0,044</b>
<i>IFI44</i>	19	10	0,994	0,937	1,053	0,830
<i>IFIH1</i>	33	12	1,005	0,958	1,055	0,827
<i>IFIT1</i>	31	12	1,021	0,950	1,097	0,573
<i>IFIT2</i>	9	6	1,033	0,847	1,261	0,748
<i>IFIT3</i>	31	10	1,058	0,930	1,203	0,392
<i>IFIT5</i>	19	7	1,149	0,648	2,038	,635
<i>IFITM3</i>	9	6	1,032	0,781	1,364	0,825
<i>IFNB1</i>	23	8	0,991	0,920	1,068	0,812
<i>IFNG</i>	28	8	1,001	0,998	1,003	0,716
<i>IRF1</i>	32	12	1,186	0,851	1,652	0,315
<i>ISG20</i>	10	7	1,059	0,724	1,550	0,766
<i>MB21DI</i>	31	12	1,068	0,689	1,658	0,768
<i>MCOLN2</i>	10	7	1,193	0,937	1,520	0,153
<i>MOV10</i>	33	12	1,148	0,936	1,408	0,186

ES 2 761 266 T3

<i>MX1</i>	10	7	1,062	0,832	1,354	0,631
<i>MX2</i>	33	12	1,046	0,978	1,118	0,189
<i>OAS1</i>	9	6	1,249	0,761	2,050	0,379
<i>OAS2</i>	33	12	1,075	0,941	1,228	0,289
<i>PNPT1</i>	19	10	1,529	0,490	4,764	0,464
<i>RSAD2</i>	9	6	0,977	0,803	1,188	0,812
<i>SMCHD1</i>	9	6	1,632	0,780	3,413	0,193
<i>TLR3</i>	26	10	0,782	0,457	1,338	0,370
<i>TLR7</i>	31	12	0,962	0,591	1,567	0,876
<i>TREX1</i>	28	10	1,078	0,754	1,541	0,680
<i>TRIM14</i>	32	12	1,079	0,788	1,477	0,637
<i>TRIM21</i>	31	10	1,324	0,913	1,918	0,139
<i>TRIM22</i>	33	12	0,989	0,854	1,145	0,881
<i>TRIM25</i>	8	6	0,688	0,273	1,735	0,428
<i>TRIM5</i>	10	7	1,256	0,688	2,294	0,458
<i>USP18</i>	10	7	1,173	0,818	1,681	0,386
<i>XRN1</i>	10	7	1,241	0,449	3,425	0,677
<i>ZBP1</i>	31	12	1,091	0,984	1,210	0,098
<b>Genes de citocina</b>						
<i>IL10</i>	56	24	0,982	0,939	1,026	0,414
<i>IL6</i>	50	19	1,000	1,000	1,000	0,968
<i>IL1B</i>	54	21	,996	0,984	1,008	0,491
<i>IL8</i>	50	23	1,002	0,997	1,007	0,440
<i>CXCL1</i>	46	21	1,002	0,998	1,005	0,360
<i>CXCL2</i>	45	20	1,000	0,999	1,002	0,539
<i>CXCL3</i>	48	22	1,001	0,998	1,005	0,425
<i>CXCL5</i>	46	22	,987	0,966	1,009	0,244
<i>TNF</i>	41	20	1,002	0,993	1,010	,738

Tabla 6: La expresión basal de ISG está relacionada con el desenlace de los pacientes. Resultados del análisis utilizando un modelo bivariante.

	Núm.de eventos	Núm.total de pacientes	Ratio de riesgo	95,0% CI para la ratio de riesgo		Valor P
				Inferior	Superior	
Primer modelo	14	43				
Registro basal de <i>IFN</i>			3,583	1,177	10,905	0,025
Registro MELD			1,071	0,993	1,155	0,074
Segundo modelo	21	56				
Expresión basal de <i>MX2</i>			1,346	1,077	1,681	0,009
Registro MELD			1,091	1,020	1,167	0,011
Tercer modelo	20	55				
Expresión basal de <i>OAS2</i>			2,492	1,053	5,901	0,038
Registro MELD			1,060	0,984	1,141	0,122
Cuarto modelo	10	26				
Expresión basal de <i>IFI35</i>			1,393	1,043	1,861	0,025
Registro MELD			1,178	1,026	1,351	0,020

## ES 2 761 266 T3

Quinto modelo	9	17			
Expresión basal de <i>IF144</i>			1,635	1,017	2,627
Registro MELD			1,032	0,936	1,136
					0,042
					0,529

### REFERENCIAS:

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para la predicción del tiempo de supervivencia de un paciente con cirrosis alcohólica descompensada que comprende i) determinar el nivel de expresión del gen OAS2 o MX2 en una muestra de células mononucleares de sangre periférica obtenida del paciente, ii) comparar el nivel determinado en el paso i) con un valor de referencia predeterminado e iii) deducir que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia corto cuando el nivel determinado en el paso i) es mayor que su valor de referencia predeterminado o llegar la conclusión de que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia largo cuando el nivel determinado en el paso i) es menor que el valor de referencia predeterminado.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el cual los niveles de expresión de OAS2 y MX2 se determinan en el paso i) y se comparan con su valor de referencia predeterminado correspondiente.
3. El método de la reivindicación 1, en el cual se determina el nivel de expresión de al menos un gen adicional y se compara con su valor predeterminado correspondiente.
4. El método de la reivindicación 3, en el cual el gen para el que se determina adicionalmente la expresión se selecciona del grupo que consiste en IFIT1, CXCL10, IFIH1, DDX58, TRIM22 y GBP4.
- 15 5. El método de la reivindicación 4, en el cual se determinan los niveles de expresión de 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 genes.
6. El método de la reivindicación 4, en el cual se determinan en la muestra los niveles de expresión de OAS2, MX2, IFIT1, CXCL10, IFIH1, DDX58, TRIM22 and GBP4 y se comparan con sus valores de referencia predeterminados correspondientes.
- 20 7. El método de la reivindicación 1, en el cual se determina el nivel de expresión de los genes por RT-PCR.
8. El método de la reivindicación 1, en el cual, cuando se determinan los niveles de expresión de al menos 2 genes, se calcula un registro que es un valor compuesto de dichos niveles de expresión y se compara con su valor de referencia predeterminado correspondiente, en donde cuando el registro es mayor que el valor de referencia predeterminado se deduce que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia corto y cuando el registro es menor que el valor de referencia predeterminado, se deduce que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia largo.
- 25

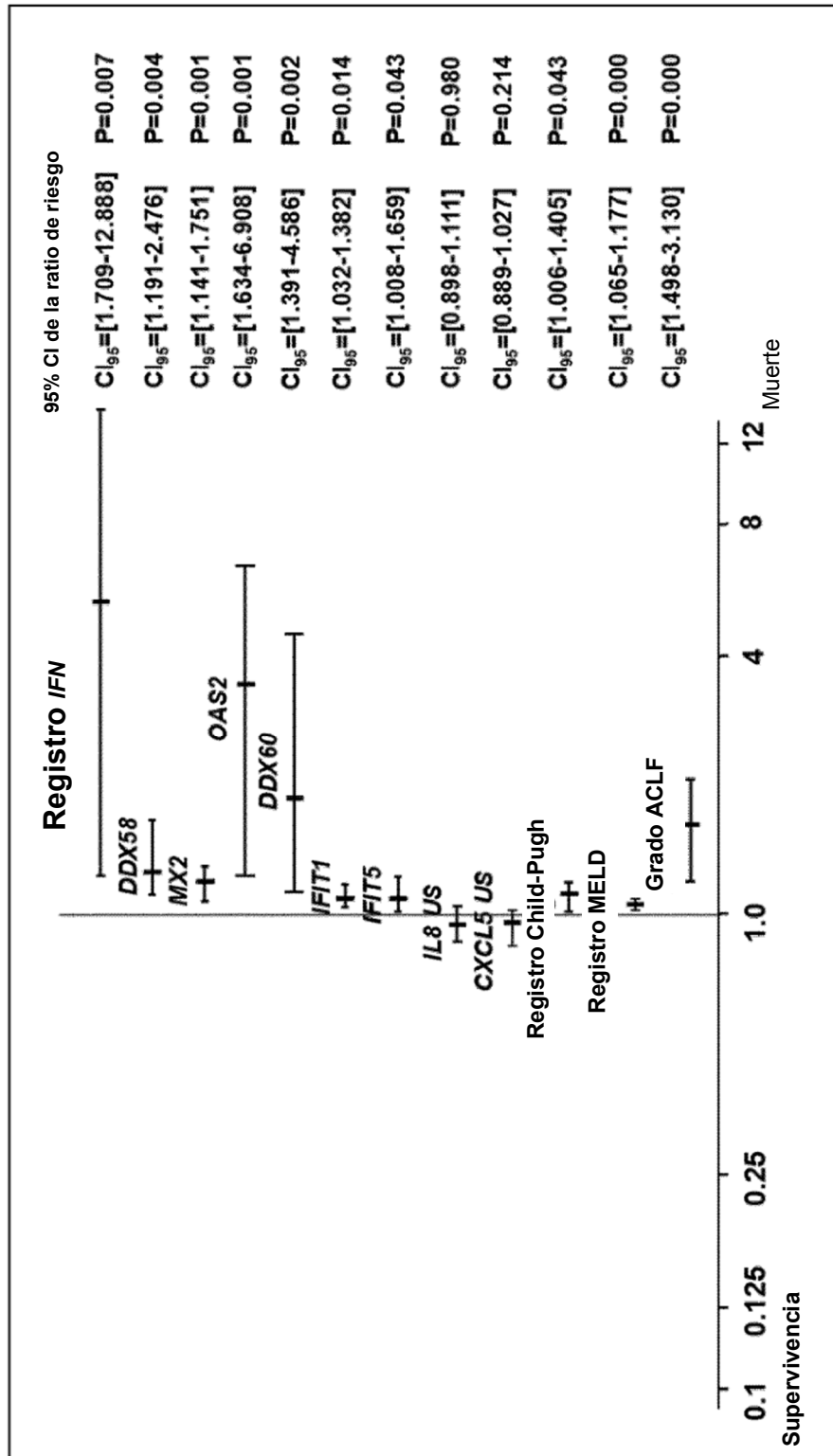


Figura 1