

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 413 566**

21 Número de solicitud: 201132013

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

14.12.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.07.2013

71 Solicitantes:

FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD (20.0%)

**Avda. Américo Vespucio nº 5 Bloque 2, 2ª planta
41092 Sevilla ES;**

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (20.0%);

AGENCIA PÚBLICA EMPRESARIAL SANITARIA

HOSPITAL DE PONIENTE (20.0%);

SERVIZO GALEGO DE SAÚDE (20.0%) y

FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN DEL

HOSPITAL UNIVESITARIO LA FE (20.0%)

72 Inventor/es:

LÓPEZ ESCAMEZ, José Antonio;

LÓPEZ NEVOT, Miguel Ángel;

GAZQUEZ PÉREZ, Irene;

MORENO CASARES, Antonia María;

LÓPEZ NEVOT, Alicia;

REQUENA NAVARRO, María Teresa;

ARAN GONZÁLEZ, Ismael;

SOTO VARELA, Andrés;

SANTOS PÉREZ, Sofía y

PÉREZ GARRIGUES, Herminio

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

54 Título: **MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES PARA EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LA HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL**

57 Resumen:

Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y pronóstico de la hipoacusia neurosensorial.

Método de obtención de datos útiles para la determinación del riesgo de un individuo a padecer hipoacusia neurosensorial severa, preferiblemente en la enfermedad de Menière, cebadores útiles en la determinación y kit que los comprende.

ES 2 413 566 A1

DESCRIPCIÓN

Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y pronóstico de la hipoacusia neurosensorial.

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 diagnóstico, el pronóstico y la clasificación de pacientes que sufren hipoacusia neurosensorial, y especialmente de aquellos que presentan enfermedad de Menière.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La enfermedad de Meniere (EM) es un trastorno crónico que afecta el oído interno caracterizado por episodios recurrentes de vértigo espontáneo, presión auditiva, acúfeno y pérdida de la audición. Dado que se observa un incremento en el número de autoanticuerpos y una mejoría clínica con la terapia con esteroides se observa en algunos pacientes, se ha propuesto una etiología autoinmune para esta enfermedad. La elevación en suero de complejos inmunes circulantes (CIC) que se encuentran en pacientes con EM sugiere que pueden estar involucrados en la fisiopatología de la enfermedad, ya sea como una causa directa del daño, o como producto de una anomalía autoinmune.

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-DRB1 * 1602 y HLA-DRB1 * 1101 en diferentes poblaciones. El complejo principal de histocompatibilidad de clase I relacionado con el gen A (MICA), codifica una molécula MICA estrés inducible con tres dominios extracelulares, es decir, $\alpha 1$ (codificado por el exón 2), $\alpha 2$ (codificado por el exón 3) y $\alpha 3$ (codificado por el exón 4), un segmento transmembrana (TM) (codificado por el exón 5) y una cola citoplasmática carboxi-terminal (codificado por el exón 6).

El gen MICA muestra un notable grado de variación de nucleótidos en los exones 2, 3 y 4, y alberga un polimorfismo de repetición corta del tándem (GCT) n (cuatro, cinco, seis o nueve, abreviado como MICA-STR) en el exón 5.

5 Además, el alelo MICA * A5.1 presenta la inserción de un nucleótido (G) entre las repeticiones de triplete segunda y la tercera, lo que resulta en un codón de parada prematuro.

Los genes MIC se expresan principalmente en el epitelio gastrointestinal, células endoteliales y fibroblastos. Sin embargo, las transcripciones de MIC se han observado en todos los órganos principales, excepto el cerebro. MICA actúa como un ligando para las células natural killer (NK), células T $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$, células T CD8 +, que expresan un receptor de la activación de las células NK común NKG2D. La interacción MICA-NKG2D parece aumentar la producción de citoquinas inflamatorias y la proliferación de un determinado subconjunto de células T.

Varias investigaciones han sugerido una asociación entre el gen MICA y las enfermedades autoinmunes. Por otra parte, el producto del gen MICA podría desempeñar un papel importante en el proceso autoinmune y los polimorfismos del gen MICA puede modular las vías inmunes que son complementarios y sinérgicos de los modulados por los clásicos genes HLA de clase II.

Se ha propuesto una gran variedad de tratamientos, tanto médicos como quirúrgicos, para la hipoacusia, y en concreto 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 transtimpánica, 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 hace algún tiempo la inyección intratimpánica de medicamentos ototóxicos, como la gentamicina, en la cavidad del oído medio. El objetivo de este procedimiento sería el de producir una laberintectomía médica, lo que causaría la disminución o la desaparición de los
5 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, estreptomicina y, actualmente, la gentamicina.

10 En casos muy graves se ha recurrido a la cirugía, pero este recurso empeora la calidad de vida del enfermo porque elimina no sólo los síntomas, sino también el sentido del equilibrio.

Por tanto, los tratamientos actualmente disponibles para la hipoacusia, pueden
15 ser excesivamente agresivos, como por ejemplo la cirugía o la aplicación de gentamicina intratimpánica y pueden poner el riesgo la audición del paciente. Por tanto, sería importante, disponer de algún marcador que permitiera evaluar la idoneidad del tratamiento.

20 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.

25

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un método de obtención de datos útiles para
30 el diagnóstico precoz y el pronóstico de la pérdida auditiva, así como para evaluar la respuesta al tratamiento de dicha enfermedad, permitiendo el seguimiento y el establecimiento de grupos de pacientes. Los autores de la

presente invención son los primeros en demostrar la asociación de microsatélites polimórficos, como MICA-STR, con la progresión de la hipoacusia en la EM, demostrando, a su vez, que la asociación con otros marcadores previos no tiene soporte estadístico. Por tanto, las variantes alélicas de MICA-STR en el exón 5 influyen en la susceptibilidad y curso temporal de la pérdida de audición de la EM, preferiblemente en la población española.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso del gen MICA, para la obtención de datos útiles en el diagnóstico y/o pronóstico de la hipoacusia neurosensorial.

En esta memoria se entiende por “hipoacusia neurosensorial” la disminución del nivel de audición por debajo de lo que se considera normal, por lo que según la pérdida de intensidad, medida en *decibelios*(dB), la hipoacusia se clasifica en:

- Leve – cuando la pérdida de audición es menor de 35 dB.
- Moderada – cuando la pérdida de audición está entre 35 y 60 dB.
- Profunda o severa – cuando la pérdida de audición está entre 60 y 90 dB.
- Total o *cofosis* – cuando la pérdida de audición es superior a 90

Además, en la enfermedad de Meniere, la *American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* (AAO-HNS) definió en 1995 cuatro estadios auditivos basados en el umbral de audición de las frecuencias de 500, 1000, 2000 y 3000 Hz, donde la hipoacusia se clasifica en:

- Estadio 1- cuando la pérdida de audición es menor o igual a 25 dB
- Estadio 2- cuando la pérdida de audición está entre 26 y 40 dB
- Estadio 3- cuando la pérdida de audición está entre 41-70 dB
- Estadio 4. Cuando la pérdida de audición es superior a 70 dB

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
5 elementos neurosensoriales cocleares o el nervio coclear se lesionan de algún modo, por medios físicos o de otra naturaleza.

La cóclea es el órgano fundamental de audición situado en el oído interno, con forma de conducto enrollado espiralmente y, que contiene el órgano de Corti,
10 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 afectados, se interrumpe la transmisión de los sonidos. Cualquiera de estas delicadas estructuras pueden verse afectadas por diferentes procesos infecciosos,
15 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.

Según el órgano afectado pueden clasificarse en:

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

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la hipoacusia neurosensorial se selecciona de la lista que consiste en: hipoacusia súbita,
25 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 se manifiesta en individuos del oeste de Europa, y más preferiblemente, en la población española o individuos que
30 poseen el mismo acervo genético o uno similar.

En otra realización preferida, la hipoacusia neurosensorial además se asocia a crisis de vértigo recurrente. En una realización aún más preferida, la hipoacusia neurosensorial está asociada a la enfermedad de Menière. En otra realización más preferida, la región del gen MICA que se emplea es la región 5' del exón terminal (SEQ ID NO: 2).

Tal y como se entiende en esta memoria, el gen MICA o "*MHC class I polypeptide-related sequence A*", (DAMA-345G11.2, MIC-A, PERB11.1), codifica el MHC (HLA) de clase I de la cadena relacionados con el gen A. El producto de la proteína se expresa en la superficie celular, aunque a diferencia de las moléculas canónicas de clase I no parece asociarse con beta-2-microglobulina. Se cree que las funciones de MICA como un antígeno inducido por el estrés en las células epiteliales intestinales es reconocido por linfocitos gamma delta T y células NK a través del receptor común NKG2D. El splicing alternativo da lugar a múltiples variantes de la transcripción. Se encuentra en el cromosoma 6, (6p21.33).

En el contexto de la presente invención, MICA se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NR_036524 y/o en la SEQ ID NO: 1, o a cualquiera de sus variantes.

MÉTODO DE DIAGNÓSTICO

25

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o pronóstico de la hipoacusia neurosensorial, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

- a) obtener el ADN genómico de una muestra biológica aislada de un individuo, y
- b) detectar las variantes del gen MICA, en el ADN genómico de la muestra biológica aislada de (a).

En una realización preferida, el primer método de la invención comprende además:

- 5 c) comparar las variantes detectadas en el paso (b) con una variante de referencia.

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
10 aislada es sangre periférica, y/o comprende células de sangre periférica (*peripheral blood cells* PBCs), más preferiblemente mononucleares.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) se obtiene de sangre periférica.
15 En una realización aún más preferida, el genotipo del individuo tiene el patrimonio génico (también llamado pool, complejo, reservorio o acervo génico) característico de la población del oeste de Europa, y más preferiblemente, característico de la península ibérica y/o de la población española.

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.

25

En otra realización preferida, la hipoacusia neurosensorial además se asocia a crisis de vértigo recurrente. En una realización aún más preferida, el gen MICA se usa para la obtención de datos útiles en el diagnóstico y/o pronóstico del riesgo a padecer la enfermedad de Menière.

30

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 del gen MICA. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos (y repeticiones de microsatélites). Más preferiblemente, las variantes descritas hacen referencia al número de repeticiones de la secuencia GCT en el exon 5 del gen MICA.

Tal como aquí se utiliza, una secuencia es "sustancialmente homóloga" a La SEQ ID NO: 1, cuando su secuencia presenta un buen alineamiento con dicha secuencia SEQ ID NO: 1.

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.

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.

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.

Los distintos alelos o secuencias microsatélite del exón 5 del gen MICA que se detectan en el ejemplo de la invención son:

MICA A4	GCTGCTGCTGCT	SEQ ID NO: 5
MICA A5	GCTGCTGCTGCTGCT	SEQ ID NO: 6
MICA A5.1	GCTGCTGGCTGCTGCTG	SEQ ID NO: 7
MICA A6	GCTGCTGCTGCTGCTGCT	SEQ ID NO: 8
MICA A9	GCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	SEQ ID NO: 9

- 5 Preferiblemente, las variantes son los distintos alelos o secuencias microsatélite del exón 5 del gen MICA SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

10 La detección de las variantes del gen MICA puede hacerse por cualquier método conocido en el estado de la técnica, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante secuenciación de ADN, electroforesis capilar, espectrometría de masas, single-strand conformation polymorphism (SSCP), análisis electroquímico, HPLC desnaturizante en gel de electroforesis, restriction fragment length polymorphism (RFLPs), y análisis de hibridación.

15

En otra realización preferida, el primer método de la invención además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos que presentan bajo riesgo a padecer hipoacusia neurosensorial severa (umbral de audición tonal superior a 40dB), cuando presenta el alelo MICA * A4, detectado en el paso (b). Preferiblemente, la hipoacusia neurosensorial, es la enfermedad de Menière.

20

Los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c).

25

El término “diagnóstico”, 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 severa, y más preferiblemente, al mayor

30

o menor riesgo a padecer la enfermedad de Menière con hipoacusia severa.

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 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 del 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 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.

25

KIT DE DIAGNÓSTICO Y USOS

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit, de ahora en adelante kit de la invención, que comprende al menos un oligonucleótido complementarios a la secuencia SEQ ID NO: 1, y más preferiblemente con la secuencia SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, comprende dos cebadores complementarios a la secuencia

30

SEQ ID NO: 1, , y más preferiblemente con la secuencia SEQ ID NO: 2.. Y más preferiblemente, los cebadores son capaces de hibridar con la SEQ ID NO: 1, más preferiblemente con la secuencia SEQ ID NO: 2, en condiciones de amplificación. En una realización aún más preferida, los cebadores
5 comprenden la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, y en una realización aún mucho más preferida, el cebador de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 4 está marcado en el extremo 5', preferiblemente con 6-FAM.

Las "condiciones de amplificación" o "condiciones de extensión" se refieren
10 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, y se describen, por ejemplo, en Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a Edición, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press y Ausubel *et al.*, *Current*
15 *Protocols in Molecular Biology*, 1987-2007, John Wiley & Sons.

El término "cebador" 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
20 capaces de "cebar" la síntesis del ADN mediante una ADN polimerasa dependiente 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
25 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
30 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.

5 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
10 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
15 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
20 síntesis química pueden incluirse, por ejemplo, el método del fosfotriéster descrito por Narang S.A. *et al.*, *Methods in Enzymology* 68:90-98, 1979, el método del fosfodiéster de Brown E.L. *et al.*, *Methods in Enzymology* 68:109-151, 1979, el método de la fosforamidita dado a conocer en Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Letters* 22:1859, 1981, y el método del H-fosfonato dado a conocer
25 en Garegg *et al.*, *Chem. Scr.* 25:280-282, 1985, 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
30 conocido por el experto en la materia. Se utiliza en la presente memoria para referirse a un "ácido nucleico" en 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 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, p. ej., para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para estimular o 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 base modificados, 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, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-t i o u r i d i n a , 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-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 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.

"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
5 50% en forma de cadena única y 50% en forma de cadena doble. Hay programas informáticos fácilmente disponibles para calcular la Tm.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit de la invención para la determinación del riesgo a padecer hipoacusia neurosensorial.

10

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

En otra realización preferida, la hipoacusia neurosensorial además se asocia a crisis de vértigo recurrente. En una realización aún más preferida, el gen MICA se usa para la obtención de datos útiles en el diagnóstico y/o pronóstico del
20 riesgo a padecer la enfermedad de Menière.

Los términos "polinucleótido" 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
25 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.

30 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.

5

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. MICA-STR se asocia con una progresión más lenta la pérdida de audición. (A) Los portadores de la variante alélica MICA A.4 llegaron a la etapa 3 a la mediana de 6 años más tarde que los pacientes con una variante de MICA-STR (log-rank test, $p = 3.7 \times 10^{-3}$). (B) Los pacientes con el haplotipo MICA*A.4-HLAB*18 o MICA A.4-con otro loci HLAB no mostraron diferencias en la progresión de la pérdida de la audición (log-rank test, $p = 0,67$). Esto demuestra que el efecto de MICA A.4 es independiente de locus B.

15

EJEMPLOS

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

20

Materiales y Métodos

Sujetos y muestras

El presente estudio incluyó un total de 302 pacientes con EM. El grupo 1 constaba de 153 pacientes del sureste de España, el grupo 2 incluyó 149 pacientes de Galicia. Las muestras fueron reclutadas en cinco centros: Hospital de Poniente de El Ejido, Almería, Hospital de la Fe de Valencia, Hospital Virgen de las Nieves de Granada, Hospital Clínico de Santiago de Compostela y el Complejo Hospitalario de Pontevedra entre enero de 2007 marzo de 2011. 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 Meniere's disease. American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Foundation, Inc. Otolaryngol Head Neck Surg 1995; 113: 181–185).

- 5 Un total de 420 controles de las ciudades correspondientes obtenidos de la Biobanco español de ADN (<http://www.bancoadn.org>) se incluyeron como controles sanos (Tabla 1):

Variable	Población sureste		Población noroeste	
	MD	Control	MD	Control
Sujetos	153	276	149	144
Género femenino (%)	53.5	51.4	52.3	51.4
Edad (años)				
Media	55.2	38.8	55.1	37.2
Mediana	56	37	57.5	35.5
Rango	15-88	21-64	12-79	16-64
SD	12.9	9.5	13.5	13.1

Tabla 1. Características basales de casos y controles.

10

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 estadio auditivo para cada paciente con EM definitiva se define como la

15 media del promedio de cuatro tonos de 0.5, 1, 2 y 3 kHz de acuerdo con los criterios de la AAO-HNS: estadio 1, ≤ 25 dB; estadio 2, 26-40dB, estadio 3, 41-70dB, 4 y estadio 4, > 75 dB.

20

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 investigación del hospital aprobó el protocolo de investigación.

El ADN genómico se aisló de las células mononucleares de sangre periférica con anticoagulantes mediante el GenoVision robot M-48 (Qiagen, Venlo, Países Bajos) y el MagAttract DNA Blood Mini M48 (192) kit de Qiagen. Todos los pacientes e individuos sanos dieron su consentimiento informado para el estudio.

Genotipado de MICA

Se analizó MICA-STR en el exón 5 del gen MICA en ambos grupos, utilizando el método descrito por Ota et al. (Ota *et al.*, 1997. *Tissue Antigens*: 49:448-54). Los primers empleados para la PCR fueron MICA 5F (SEQ ID NO: 3) 5'-CCT TTT TTT GGA CAG AAG TGC-3' y MICA 5R (SEQ ID NO: 4) 5'-CCT TAC CAT CTC CAG AAA CTG C-3 ', que fue marcado en el extremo 5' con 6-FAM. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un ABI Prism 3100XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y sus tamaños se determinaron utilizando la versión 4.0 del software GeneMapper (Applied Biosystems).

Genotipado HLA

El genotipado de HLA-B * se llevó a cabo en 292 pacientes y 1014 controles mediante el uso de la ADN polimerasa de reacción en cadena (PCR) con oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) sondas (Dynal RELI™ SSO HLA-B typing kit; Dynal Biotech, Bromborough, UK).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL). Las frecuencias alélicas del polimorfismo MICA y locus B se obtuvieron por recuento directo. El análisis estadístico se realizó con el test de χ^2 con el test de Fisher `s exacto y los *odds ratios* (OR) y el intervalo de confianza al 95% (IC) se calcularon para comparar las frecuencias observadas entre los

pacientes y los controles de EM. Los valores de P fueron corregidos, de acuerdo con el método de Bonferroni, para el número de comparaciones realizadas (5 para los alelos MICA y 24 de la HLA-B). Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

5

Las frecuencias de haplotipos de MICA-STR y locus B se calcularon para determinar el desequilibrio de ligamiento (LD) con Haploview 4.2. software (<http://www.broadinstitute.org/haploview>). Parámetro de desequilibrio de ligamiento (D) se calcula a partir de tablas de 2x2. Parámetro D 'corresponde a D estándar. D '= 1 corresponde al total desequilibrio. El tiempo para alcanzar la pérdida de audición > 40 dB (estadio auditivo 3 o 4) para cada polimorfismo MICA-STR o locus B se determinó según el método de Kaplan-Meier. Las curvas de supervivencia se compararon mediante la prueba de log-rank.

15 **Resultados**

Este estudio fue diseñado para investigar el polimorfismo de mica-STR en pacientes con DM. Se analizó el efecto de MICA en dos grupos independientes: el grupo 1 incluyó 420 individuos (153 pacientes, 276 controles) del sudeste de España, el grupo 2 incluyó 293 individuos (149 pacientes, 144 controles) de Galicia para replicar los resultados.

La hipoacusia neurosensorial fue estratificada en función del tiempo desde el inicio de la enfermedad en nuestra serie, demostrándose que el estadio auditivo está relacionado con la duración de la EM ($p=0.001$).

Se encontraron cinco alelos del MICA-STR en el exón 5 en ambos grupos: A6 A4, A5, A5.1 y A9. Ya que las frecuencias de los alelos STR-MICA en los controles de los sujetos y las poblaciones del sudeste al noroeste, no fueron significativamente diferentes ($p = 0,75$), se agruparon todos los datos para otros análisis. El alelo MICA-STR visualizar la frecuencia más alta en ambos grupos fue A6 (34,1% y 38,2%, respectivamente). Los pacientes con EM

unilaterales y bilaterales han tenido la misma distribución de las frecuencias alélicas y por lo tanto se han considerados como un solo grupo de pacientes.

La tabla 2 muestra las frecuencias de alelos de MICA-STR en pacientes con EM y los controles. Se encontró que el alelo MICA * A5 del microsatélite es más común en los controles (12,7%) que en pacientes con EM (6,9%) en el grupo del Sureste (PC = 0,04, OR = 0,51 [IC del 95%, 0.30-0.84]) . Sin embargo, no hemos podido replicar estos hallazgos en el grupo del noroeste y un metaanálisis de los dos grupos mostraron que MICA*A5 no está asociado con MD.

Enfermedad de Menière	Controles	MD	OR (95% CI)	Valor P	Corregido
Sureste	N=276	N=153			
A.4	82 (14.9)	46 (15.0)	1.01 (0.68-1.50)	0.95	NS
A.5	70 (12.7)	21 (6.9)	0.51 (0.30-0.84)	0.008	0.04
A.5.1	141 (25.6)	72 (23.5)	0,86 (0.65-1.24)	0.50	NS
A.6	188 (34.1)	121 (39.5)	1.26 (0.95-1.69)	0.11	NS
A.9	70 (12.7)	46 (15.0)	1.22 (0.81-1.82)	0.34	NS
Noroeste	N=144	N=149			
A.4	36 (12.5)	29 (9.7)	0.76 (0.45-1.27)	0.29	NS
A.5	38 (13.2)	35 (11.7)	0.88 (0.54-1.43)	0.60	NS
A.5.1*	68 (23.6)	82 (27.5)	1.23 (0.85-1.78)	0.28	NS
A.6	110 (38.2)	111 (37.2)	0.96 (0.69-1.34)	0.81	NS
A.9	36 (12.5)	41 (13.8)	1.12 (0.69-1.81)	0.65	NS

Enfermedad de Meniere total	Controles N=420	MD N=302	OR (95% CI)	Valor P	P Corregido
A.4	118 (12.4)	75 (12.4)	0.86 (0.64-1.18)	0.36	NS
A.5	108 (12.9)	56 (12.9)	0.69 (0.49-0.97)	0.03	NS
A.5.1	209 (24.9)	154 (25.5)	1.03 (0.81-1.31)	0.80	NS
A.6	298 (35.5)	232 (38.4)	1.13 (0.91-1.41)	0.26	NS
A.9	106 (12.6)	87 (14.4)	1.16 (0.86-1.58)	0.33	NS

Tabla 2. Frecuencia de los alelos MICA-STR en pacientes con MD y controles.

La distribución de frecuencias de los alelos HLA-B no fue diferente entre el grupo noroeste y sureste y se agruparon todos los datos. Por otra parte, la tipificación HLA no ha encontrado HLA-B * en asociación significativamente con EM (Tabla 3).

Locus	MD Unilateral	MD Bilateral	OR	Valor P	Casos (n=292)	Controles (n=1014)	OR	Valor P
B*07	.072	.072	1.002	.995	.072	.092	0.762	.126
B*08	.049	.048	1.026	.949	.046	.052	0.878	.557
B*13	.013	.008	1.648	.695	.010	.019	0.529	.142
B*14	.092	.040	2.426	.016	.067	.051	1.340	.134
B*15	.036	.056	0.634	.260	.045	.053	0.836	.423
B*18	.066	.064	1.0026	.940	.067	.089	0.730	.084
B*27	.020	.052	0.366	.037	.033	.037	0.875	.610
B*35	.095	.060	1.646	.128	.084	.103	0.797	.171
B*37	.023	.012	1.934	.524	.017	.010	1.664	.184
B*38	.033	.024	1.379	.538	.029	.028	1.055	.848
B*39	.013	.020	0.651	.738	.017	.014	1.244	.556
B*40	.039	.036	1.097	.837	.039	.034	1.181	.498
B*41	.023	.020	1.151	.812	.021	.013	1.554	.205
B*44	.167	.204	0.783	.266	.182	.151	1.247	.074
B*45	.008	.016	0.406	.417	.010	.016	0.627	.292
B*49	.049	.040	1.241	.604	.048	.031	1.570	.050
B*50	.030	.036	.814	.668	.031	.030	1.043	.880
B*51	.095	.108	0.868	.615	.103	.090	1.154	.361
B*52	.016	.024	0.678	.555	.019	.015	1.236	.549
B*53	.016	.012	1.372	.735	.014	.016	0.866	.717
B*55	.007	.004	1.644	1.000	.007	.010	0.659	.443
B*56	.003	1.000	.002	.002	0.694	1.00
B*57	.023	.032	0.711	.513	.027	.025	1.091	.763
B*58	.013	.012	1.094	1.000	.012	.013	0.899	.802

Tabla 3. Frecuencia de HLA locus B en pacientes con DM y los controles.

Cálculos de desequilibrio de ligamiento se realizaron en los controles y los pacientes de los haplotipos HLA-B-MICA-STR con una frecuencia $\geq 1,5\%$. Como era de esperar desde la posición cromosómica de MICA y HLA-B *, se encontraron desequilibrios de ligamiento significativos entre ciertos alelos HLA-B * y STR-MICA. Se encontraron 13 haplotipos en el grupo control, siendo la mayoría de los bienes comunes MICA * A6-HLA-B * 44 (7,2%), MICA * A6-HLA-B * 51 (7,4%) y MICA * A5.1-HLA -B * 7 (6,5%). En pacientes con EM, se encontró la misma distribución de frecuencias y no se encontraron diferencias en el MICA-STR y HLA-B haplotipos entre casos y controles (Tabla 4).

10

Haplotipo	Grupo Control				Grupo de Pacientes			
	HF	D'	LOD	Pc	HF	D'	LOD	Pc
MICA*A.4-B*18	0.053	0.906	36.22	1.18×10^{-24}	0.042	0.829	17.51	2.64×10^{-13}
MICA*A.4-B*27	0.026	1.000	24.32	5.28×10^{-9}	0.023	0.864	9.35	3.30×10^{-7}
MICA*A.5-B*15	0.026	0.603	11.10	2.15×10^{-7}	0.023	0.390	3.56	1.36×10^{-5}
MICA*A.5-B*35	0.025	0.201	2.21	0.02	0.026	0.100	0.44	5.28×10^{-4}
MICA*A.5.1-B*7	0.065	0.764	22.02	2.02×10^{-13}	0.055	0.865	10.14	4.62×10^{-10}
MICA*A.5.1-B*8	0.029	0.679	6.92	5.94×10^{-6}	0.036	0.851	5.97	2.42×10^{-7}
MICA*A.5.1-B*35	0.015	1.000	4.07	0.01	0.015	0.002	0.00	NS
MICA*A.5.1-B*40	0.018	0.202	0.56	NS	0.023	0.283	0.61	0.06
MICA*A.6-B*44	0.072	0.442	4.69	6.16×10^{-5}	0.098	0.332	2.47	0.02
MICA*A.6-B*49	0.024	0.908	5.11	7.26×10^{-6}	0.034	0.825	3.89	6.6×10^{-4}
MICA*A.6-B*50	0.025	1.000	6.02	2.86×10^{-6}	0.028	0.657	2.01	0.02
MICA*A.6-B*51	0.074	0.865	15.54	1.87×10^{-14}	0.089	0.828	8.36	3.52×10^{-14}
MICA*A.9-B*35	0,024	0.340	6.85	0.02	0.019	0.353	3.53	NS
MICA*A.9-B*57	0.023	0.878	9.70	6.03×10^{-15}	0.021	0.896	5.59	2.86×10^{-7}

15

Tabla 4. La frecuencia de haplotipos (HF) y el desequilibrio de ligamiento (LD) el análisis de los alelos HLA-B y el STR-MICA. El análisis de LD se limitó a los haplotipos HLA-BMICA-STR con las frecuencias observadas $\geq 1,5\%$ en los controles.

20

Los datos de pérdida auditiva estaban disponibles en todos los pacientes con ED. Diecisiete estaban en la etapa 1 (6,2%), 60 en la etapa 2 (19,7%), 157 en la etapa 3 (51,7%) y 68 en la etapa 4 (22,3%). La mediana de tiempo para desarrollar pérdida de audición > 40 dB es de 16 años (95% intervalo de

confianza, 9.23) para los pacientes con el alelo MICA * A.4, y 10 años (9-11) para los pacientes con otro alelo MICA-STR (log -rank test, $p = 0,0038$; Fig. 1).

5 Conclusiones

La enfermedad de Meniere es una enfermedad multifactorial y los factores genéticos, epigenéticos y ambientales, contribuyen a su manifestación. A pesar de que se han reportado diversas asociaciones de HLA de clase I y II con MD en los estudios caso-control a través de diferentes grupos étnicos, estos hallazgos no se han replicado en distintas poblaciones. Por otra parte, aunque varias razones pueden explicar que los estudios de replicación no confirmen la asociación observada inicialmente (sesgo de selección, estratificación de la población o variantes étnicas específicas), los estudios de asociación HLA requiere una muestra de gran tamaño, ya que el número de alelos para comparar locus B o DR es muy alta. Los datos de la presente solicitud incluyen las series más amplias para el estudio HLA-B en pacientes con ED y confirmar la ausencia de asociación entre la EM con el locus B.

Esta falta de replicación de los genes HLA hace que el presente estudio sea el primero que analice la asociación de los genes situados dentro de esta región con microsatélites polimórficos, como MICA-STR, que ha demostrado el desequilibrio de ligamiento con genes HLA-B.

Se ha estudiado la frecuencia de los alelos STR-MICA en pacientes con EM y controles en España. No hubo diferencias en la distribución de MICA-STR en los controles de Galicia o de la población del Mediterráneo, lo que sugiere que este polimorfismo es homogéneo dentro de la población española. Sin embargo, encontramos que MICA * A5 fue más común en los controles que en los pacientes en la cohorte del Mediterráneo, lo que sugiere diferencias con el conjunto de Galicia. Los factores epigenéticos y ambientales desencadenantes de crisis MD pueden explicar estos hallazgos.

El alelo MICA * A5 ha sido asociada con la colitis ulcerosa, con una progresión peor de diabetes mellitus tipo I y la esclerosis múltiple.

MICA * A5 muestra desequilibrio de ligamiento con HLA-B * 15 y HLA-B * 35.

5 Ya que las frecuencias de los alelos HLA-B * 15 no fue diferente entre los casos y el control y las frecuencias de los alelos HLA-B * 35 fueron 5% y 10%, respectivamente, es posible que el haplotipo MICA * A5-HLA-B35 puede ser un factor de protección para el MD.

10 Cuando se compararon las frecuencias de haplotipos MICA-HLA-B entre pacientes y controles no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, el alelo MICA * A4 se asoció con un mayor tiempo para desarrollar pérdida de audición > 40 dB (16 años frente a 10 años para cualquier otro alelo MICA). Esto sugiere que la interacción entre este alelo y el
15 receptor NKG2D puede determinar menos daño a los tejidos del oído interno.

A pesar de que la importancia de la afinidad alta / baja de los receptores NKG2D en términos de la activación inmune no está completamente demostrada, es posible que la presencia de repeticiones en el exon 5 del gen
20 MICA podría influir en la interacción con este receptor, modificar las células NK, $\gamma\delta$ células T y $\alpha\beta$ CD8 + T y permitir una respuesta inmune exacerbada. Sin embargo, la respuesta de las células NK y células T CD8+ no han sido investigadas en la EM.

25

REIVINDICACIONES

1.- Uso del gen MICA, para la obtención de datos útiles en el diagnóstico y/o pronóstico de la hipoacusia neurosensorial.

5

2.- El uso del gen MICA según la reivindicación anterior, donde 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.

10

3.- El uso del gen MICA según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la hipoacusia neurosensorial además se asocia a crisis de vértigo recurrente.

15

4.- El uso del gen MICA según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de Menière.

20

5.- El uso del gen MICA según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque la región del gen MICA que se emplea es la región 5' del exón terminal (SEQ ID NO: 2).

6.- Un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o pronóstico de la hipoacusia neurosensorial, que comprende:

25

a) obtener el ADN genómico de una muestra biológica aislada de un individuo, y

b) detectar las variantes del gen MICA, en el ADN genómico de la muestra biológica aislada de (a).

7.- El método de obtención de datos útiles según la reivindicación anterior, que además comprende:

30

c) comparar las variantes detectadas en el paso (b) con una variante de referencia.

8.- El método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 6-7, caracterizado porque la región del gen MICA que se emplea es la región 5' del exón terminal (SEQ ID NO: 2).

5 9.- El método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, donde la muestra aislada es ADN de sangre periférica.

10.- El método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos con bajo riesgo de padecer la enfermedad hipoacusia neurosensorial severa, cuando presenta el alelo MICA * A4.

11.- El método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, donde 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.

12.- El método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 6-11, donde la hipoacusia neurosensorial además se asocia a crisis de vértigo recurrente.

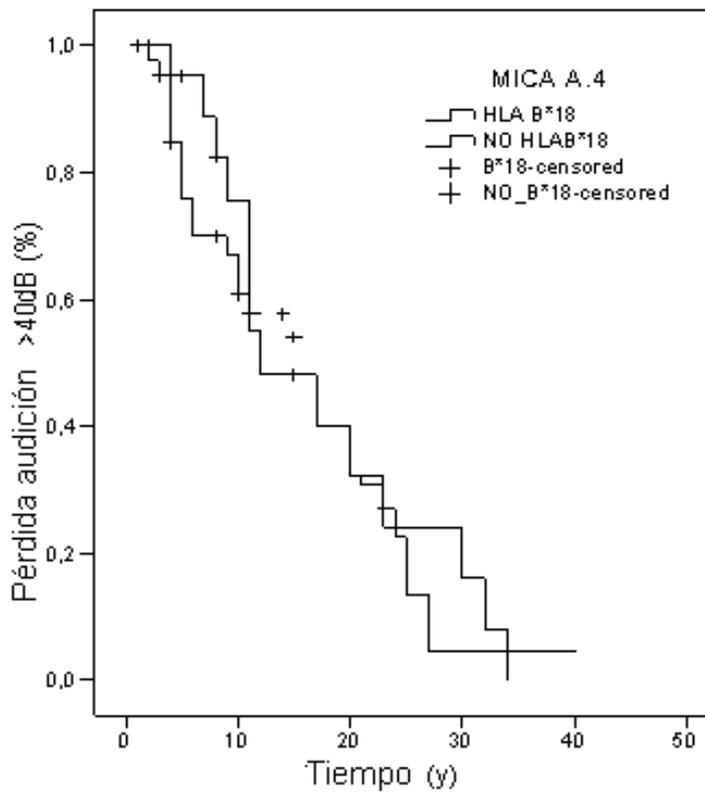
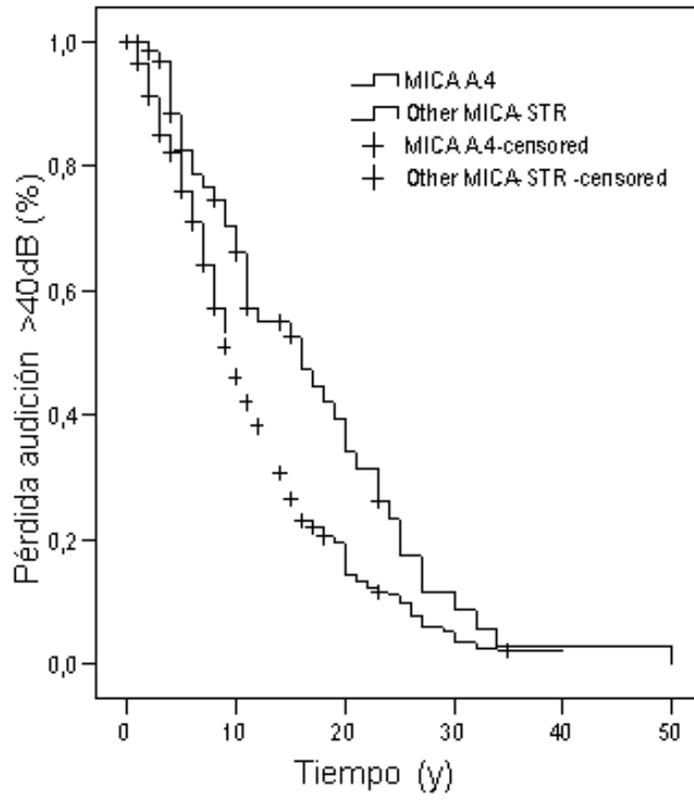
13.- El uso del método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 6-12, en el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de Menière.

14.- Un kit que comprende al menos un oligonucleótido complementario a la secuencia SEQ ID NO: 1.

30

- 15.- El kit según la reivindicación anterior, que comprende dos cebadores complementarios a la secuencia SEQ ID NO: 1, capaces de hibridar con ella, o con su secuencia complementaria, en condiciones de amplificación.
- 5 16.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 14-15, donde los cebadores son capaces de hibridar con la secuencia SEQ ID NO: 2, o con su secuencia complementaria.
- 17.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 14-16, donde los cebadores
10 son la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, respectivamente.
- 18.- El kit según la reivindicación 17, donde el cebador de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 4 está marcado en el extremo 5' con 6-FAM.
- 15 19.- Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 12-15, para el diagnóstico y/o pronóstico de la hipoacusia neurosensorial.
- 20.- El uso del kit según la reivindicación anterior, donde la hipoacusia neurosensorial se selecciona de la lista que consiste en: hipoacusia súbita,
20 hipoacusia rápidamente progresiva, hipoacusia lentamente progresiva, hipoacusia neurosensorial con afectación de bajas frecuencias, enfermedad inmunomediada del oído interno, o cualquiera de sus combinaciones.
- 21.- El uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 19-20, donde la
25 hipoacusia neurosensorial además se asocia a crisis de vértigo recurrente.
- 22.- El uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de Menière.

Figura 1



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud
 <110> Agencia Publica Empresarial Hospital de Poniente
 <110> Servicio Andaluz de Salud
 <110> Servizo Galego de Saúde
 <110> Fundación para la Investigación del Hospital Universitario La Fe

<120> Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y pronóstico de la hipoacusia neurosensorial

<130> P-04994

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 1348
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 tttctctttc ttttccggac cctgcagtgg cgcctaaagt ctgagagagg gaagtcgcct 60
 ctgtgctcgt gagtgcattg ggtataagag cccacagtc ttcgttataa cctcacgggtg 120
 ctgtcctggg atggatctgt gcagtcaggg tttcttgctg aggtacatct ggatgggtcag 180
 cccttctgc gctatgacag gcagaaatgc agggcaaagc cccagggaca gtgggcagaa 240
 gatgtcctgg gaaataagac atgggacaga gagaccaggg acttgacagg gaacggaaag 300
 gacctcagga tgaccctggc tcatatcaag gaccagaaag aaggcttgca ttcctccag 360
 gagattaggg tctgtgagat ccatgaagac aacagcacca ggagctcca gcatttctac 420
 tacgatgggg agctcttctt ctcccaaac ctggagactg aggaatggac agtgccccag 480
 tctccagag ctgagacctt ggccatgaac gtcaggaatt tcttgaagga agatgccatg 540
 aagaccaaga cacactatca cgctatgcat gcagactgcc tgcaggaact acggcgatat 600
 ctagaatccg gcgtagtcct gaggagaaca gtgccccca tggatgaatgt caccgcagc 660
 gaggcctcag agggcaacat caccgtgaca tgcagggctt ccagcttcta tccccggaat 720
 atcactactga cctggcgtca ggatggggta tctttgagcc acgacacca gcagtggggg 780
 gatgtcctgc ctgatgggaa tggaacctac cagacctggg tggccaccag gatttgccga 840
 ggagaggagc agaggttcac ctgctacatg gaacacagcg ggaatcacag cactcacct 900
 gtgccctctg ggaaagtgct ggtgcttcag agtcattggc agacattcca tgtttctgct 960
 gttgctgctg gctgctgcta tttttgttat tattattttc tatgtccggt gttgtaagaa 1020
 gaaaacatca gctgcagagg gtccagagct cgtgagcctg caggtcctgg atcaacaccc 1080
 agttgggacg agtgaccaca gggatgccac acagctcgga tttcagcctc tgatgtcagc 1140

tcttgggtcc actggctcca ctgagggcac ctagactcta cagccaggcg gctggaattg 1200
aattccctgc ctggatctca caagcacttt ccctcttggg gcctcagttt cctgacctat 1260
gaaacagaga aaataaaagc acttatttat tgttgttgga ggctgcaaaa tgttagtaga 1320
tatgaggcat ttgcagctgt gccatatt 1348

<210> 2
<211> 63
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
acattccatg tttctgctgt tgctgctggc tgctgctatt tttgttatta ttattttcta 60
tgt 63

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
cctttttttg gacagaagtg c 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
ccttaccatc tccagaaact g 21

<210> 5
<211> 12
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
gctgctgctg ct 12

<210> 6
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
gctgctgctg ctgct 15

<210> 7
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
gctgctggct gctgctg 17

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
gctgctgctg ctgctgct 18

<210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
gctgctgctg ctgctgctgc tgctgct 27

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud
 <110> Agencia Publica Empresarial Hospital de Poniente
 <110> Servicio Andaluz de Salud
 <110> Servizo Galego de Saúde
 <110> Fundación para la Investigación del Hospital Universitario La Fe

<120> Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y pronóstico de la hipoacusia neurosensorial

<130> P-04994

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 1348
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 1

tttctctttc ttttccggac cctgcagtgg cgcctaaagt ctgagagagg gaagtcgcct	60
ctgtgctcgt gagtgcattg ggtataagag cccacagtc ttcgttataa cctcacgggtg	120
ctgtcctggg atggatctgt gcagtcaggg tttcttgctg aggtacatct ggatggtcag	180
cccttctgc gctatgacag gcagaaatgc agggcaaagc cccagggaca gtgggcagaa	240
gatgtcctgg gaaataagac atgggacaga gagaccaggg acttgacagg gaacggaaag	300
gacctcagga tgacctggc tcatatcaag gaccagaaag aaggcttgca ttcctccag	360
gagattaggg tctgtgagat ccatgaagac aacagcacca ggagctcca gcatttctac	420
tacgatgggg agctcttctt ctccaaaac ctggagactg aggaatggac agtgccccag	480
tctccagag ctgagacctt ggccatgaac gtcaggaatt tcttgaagga agatgccatg	540
aagaccaaga cacactatca cgctatgcat gcagactgcc tgcaggaact acggcgatat	600
ctagaatccg gcgtagtcct gaggagaaca gtgccccca tggatgaatgt caccgcagc	660
gaggcctcag agggcaacat caccgtgaca tgcagggctt ccagcttcta tccccggaat	720
atcactactga cctggcgtca ggatggggta tctttgagcc acgacacca gcagtggggg	780
gatgtcctgc ctgatgggaa tggaacctac cagacctggg tggccaccag gatttgccga	840
ggagaggagc agaggttcac ctgctacatg gaacacagcg ggaatcacag cactcacct	900
gtgccctctg ggaaagtgct ggtgcttcag agtcattggc agacattcca tgtttctgct	960
gttgctgctg gctgctgcta tttttgttat tattattttc tatgtccggt gttgtaagaa	1020
gaaaacatca gctgcagagg gtccagagct cgtgagcctg caggtcctgg atcaacaccc	1080
agttgggacg agtgaccaca gggatgccac acagctcgga tttcagcctc tgatgtcagc	1140

tcttgggtcc actggctcca ctgagggcac ctagactcta cagccaggcg gctggaattg 1200
aattccctgc ctggatctca caagcacttt ccctcttggg gcctcagttt cctgacctat 1260
gaaacagaga aaataaaagc acttatttat tgttgttgga ggctgcaaaa tgttagtaga 1320
tatgaggcat ttgcagctgt gccatatt 1348

<210> 2
<211> 63
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
acattccatg tttctgctgt tgctgctggc tgctgctatt tttgttatta ttatatttcta 60
tgt 63

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
cctttttttg gacagaagtg c 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
ccttaccatc tccagaaact g 21

<210> 5
<211> 12
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
gctgctgctg ct 12

<210> 6
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
gctgctgctg ctgct 15

<210> 7
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
gctgctggct gctgctg 17

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
gctgctgctg ctgctgct 18

<210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
gctgctgctg ctgctgctgc tgctgct 27



- ②① N.º solicitud: 201132013
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.12.2011
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)
C12N15/12 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 0071081 A2 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 30.11.2000, reivindicaciones 2-16.	2-16
X	LOPEZ-ESCAMEZ, J.A. et al., 'Association of a functional polymorphism of PTPN22 encoding a lymphoid protein phosphatase in bilateral Meniere's disease.', LARYNGOSCOPE, 2010 Ene, Vol. 120, No. 1, páginas 103-107, ISSN: 0023-852X (print), Resultados, Tabla III; Discusión.	2-16
A	AU 2005201792 A (UNIV. TENNESSEE RES. CORP.) 26.05.2005, todo el documento.	1-22
A	US 2001036644 A (YOO) 01.11.2001, todo el documento.	1-22
A	DEREBERY, M.J. et al., 'Allergy and its relation to Meniere's disease.', OTOLARYNGOLOGIC CLINICS OF NORTH AMERICA, 2010 Oct, Vol. 43, No. 5, páginas 1047-1058, ISSN: 0030-6665 (print), todo el documento.	1-22

Categoría de los documentos citados

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
23.04.2013

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/4

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

C12Q, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.04.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-22	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-5, 13-22	SI
	Reivindicaciones 6-12	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 0071081 A2 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL)	30.11.2000
D02	Lopez-Escamez, J.A. et al., <i>Laryngoscope</i> , (2010 Ene), <u>120</u> (1): 103-7.	Ene 2010
D03	AU 2005201792 A (UNIV. TENNESSEE RES. CORP.)	26.05.2005
D04	US 2001036644 A (YOO)	01.11.2001
D05	Derebery, M.J. et al., <i>Otolaryngol. Clin. North Am.</i> , (2010 Oct), <u>43</u> (5): 1047-58.	Oct 2010

En D1-D2 se describen métodos de diagnóstico de la enfermedad de Ménière basados en la identificación de marcadores genéticos.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**1. NOVEDAD (Art 33(2) PCT).**

1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste básicamente en el uso del gen MICA ('MHC (HLA) class I chain-related gene A'), como marcador genético para el diagnóstico y/o pronóstico de la hipoacusia neurosensorial. En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D1-D5, no se ha divulgado el uso de un marcador genético de dicha patología que comparta las mismas características técnicas que las reivindicadas en la solicitud de patente.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-22 es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 33(3) PCT).**2.1. Reivindicación independiente 6.**

2.1.1. Los documentos D1-D2 constituyen el estado de la técnica más próximo. En ellos se describen métodos de diagnóstico de la enfermedad de Ménière basados en la detección de marcadores genéticos. En concreto, en D1 se describe un método de identificación del riesgo a la enfermedad de Ménière basado en la detección de mutaciones en el gen que codifica la proteína COCH5B2. En D2 se describe la asociación del polimorfismo funcional 1858C/T en el gen *PTPN22* con la enfermedad de Ménière (cf. D1: Reivindicaciones 2-15, Ejemplos D2: Resultados, Tabla III; Discusión).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación independiente 6 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de un nuevo método para el diagnóstico diagnóstico y/o pronóstico de la hipoacusia neurosensorial, en particular, la enfermedad de Ménière.

2.1.3. La solución propuesta en la reivindicación 6 consiste básicamente en la detección de variantes del gen MICA. Este método se diferencia básicamente de los descritos en D1-D2 en el marcador genético empleado. En la solicitud no se explicita ningún efecto sorprendente e inesperado derivado del uso del gen MICA frente a los marcadores genéticos empleados en D1-D2 con relación al objetivo de diagnosticar la hipoacusia neurosensorial y, en particular, la enfermedad de Ménière. Por consiguiente, se considera que la solución propuesta en la solicitud es una alternativa no inventiva frente a las del estado de la técnica. Por ello, el objeto de la reivindicación independiente 6 puede considerarse que no es inventivo. Según lo anteriormente expuesto, el objeto de las reivindicaciones dependientes 7-12 también se considera que es no inventivo.

2.2. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 6-12, no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.