

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 128**

21 Número de solicitud: 201631690

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

27.12.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.06.2018

Fecha de concesión:

03.04.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

10.04.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (100.0%)
PATIO DE ESCUELAS 1
37008 SALAMANCA (Salamanca) ES**

72 Inventor/es:

**ISIDORO GARCÍA, María;
DÁVILA GÓNZALEZ, Ignacio;
SANZ LOZANO, Catalina Sofía;
GARCÍA SÁNCHEZ, María Asunción y
SAN SEGUNDO VAL, Ignacio**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Método para diagnosticar sensibilización alérgica en un sujeto**

57 Resumen:

Método para diagnosticar sensibilización alérgica en un sujeto.

La presente invención se refiere a un método in vitro para diagnosticar sensibilización alérgica en un sujeto que comprende cuantificar los niveles de expresión del gen PTGDR, en donde unos niveles de expresión de dicho gen incrementados con respecto a una muestra control es indicativo de que el sujeto padece sensibilidad alérgica.

ES 2 674 128 B1

DESCRIPCIÓN

Método para diagnosticar sensibilización alérgica en un sujeto

5 La presente invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar sensibilización alérgica (atopia) en un sujeto, que comprende cuantificar los niveles de expresión del gen *PTGDR*, en donde unos niveles de expresión de dicho gen incrementados con respecto a una muestra control es indicativo de que el sujeto padece sensibilidad alérgica. Por lo tanto, la presente invención se engloba dentro del campo de la
10 medicina, en particular, dentro en el diagnóstico de alergia.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Las enfermedades alérgicas suponen en la actualidad una de las patologías más frecuentes en el mundo desarrollado, habiéndose observado un notable incremento de su prevalencia en las últimas décadas. Ello supone que la demanda de atención en investigación especializada en este campo continúe incrementándose a un ritmo similar al presente o superior.

20 En Europa Occidental las enfermedades alérgicas afectan a más del 35 % de la población y se prevé que esta cifra pueda continuar aumentando a lo largo de las próximas décadas. Indudablemente, esta situación supone un enorme coste económico (costes Sanitarios directos de aproximadamente 10.000 millones de € e indirectos de aproximadamente 19.000 millones de € (European White Paper, 2000)).

25 Las pruebas cutáneas como método diagnóstico empezaron a emplearse en el siglo XIX. La técnica de las pruebas intraepidérmicas fue descrita por vez primera en 1924 por Lewis y Grant, generalizándose su uso como prueba diagnóstica en los años setenta. Estas pruebas se fundamentan en reproducir la reacción de hipersensibilidad tipo I (mediada por IgE) al introducir en la epidermis un alérgeno. Se trata de pruebas
30 rápidas, de bajo coste, respuesta inmediata y con elevada sensibilidad, si bien la especificidad no es tan buena y los resultados obtenidos en las mismas no son siempre concluyentes. Por todo lo anterior, su resultado debe valorarse junto con la historia clínica de cada paciente y muy frecuentemente ser complementado con otro
35 método de diagnóstico.

Actualmente, en los sujetos en los que el resultado de las pruebas cutáneas no resulta concluyente se suele realizar una determinación de Inmunoglobulina E (IgE) total. La IgE se aisló por primera vez en 1968. Sus principales funciones derivan de su participación en la reacción alérgica y en la defensa contra parásitos. La técnica más
5 utilizada actualmente para determinar la concentración de IgE total presente en el suero se denomina ImmunoCAP Total IgE (ThermoFisher Scientific, Waltham, EEUU). Dicha prueba consiste en un enzimoimmunoanálisis en sándwich. Básicamente, en esta prueba los anticuerpos anti-IgE unidos covalentemente a los pocillos del ImmunoCAP se fijan a la IgE del suero del paciente. Se añaden anticuerpos anti-IgE
10 marcados enzimáticamente (β -galactosidasa-anti-IgE, anticuerpos monoclonales de ratón, 1 μ g/ml), formándose un inmunocomplejo de tipo sándwich. La fluorescencia detectada es directamente proporcional a la concentración de IgE.

Este método de diagnóstico presenta varias desventajas. Por ejemplo, el que la vida media de la IgE en sangre es corta y que su producción no es específica de procesos alérgicos, sino que puede deberse a otros factores como son las infecciones y los parásitos. Además, el método de detección requiere equipos de gran tamaño, complejidad y coste elevado, que se ve aumentado por el coste de los reactivos necesarios para la determinación de la IgE. Por otro lado, la determinación de IgE total
15 como marcador de atopia es una técnica con una aceptable sensibilidad, pero con una baja especificidad.

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar un biomarcador alternativo a los utilizados en la actualidad para el diagnóstico de
25 procesos alérgicos de mayor sensibilidad que los actuales que permita la identificación precoz de la enfermedad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han observado que los niveles de expresión del gen que codifica el receptor de la prostaglandina D (gen *PTGDR* o, de sus iniciales en inglés, *Prostaglandin D receptor*) están incrementados en la sangre de sujetos alérgicos, por lo que dicho nivel de expresión puede emplearse como biomarcador para el diagnóstico de la sensibilización alérgica (atopia) en un sujeto. Los inventores
30 llegaron a esta conclusión a partir de un estudio observacional, analítico, de tipo caso-control en el que se analizó la relación entre la variable nivel de expresión del gen
35

5 *PTGDR* en sangre periférica mediante PCR y el desarrollo de distintas manifestaciones clínicas en pacientes alérgicos (ver Ejemplo 1). El análisis estadístico permitió concluir que existe una asociación estadísticamente significativa entre el aumento de los niveles de expresión del gen *PTGDR* y la presencia de fenotipo alérgico, conclusión que fue corroborada por la curva ROC (ver Figura 2), y que demuestra que el nivel de expresión del gen *PTGDR* es un biomarcador de sensibilidad alérgica más sensible que los existentes en la actualidad.

10 Así, este biomarcador se basa en una tecnología completamente distinta, y a diferencia de los anteriores, se caracteriza por no requerir un equipamiento muy específico ni costes elevados. Además, presenta gran robustez y sensibilidad y puede utilizarse a partir de muestras de sangre total, por lo que no requiere procedimientos invasivos ni toma de muestras adicionales del paciente. Asimismo, a diferencia de los niveles de IgE total, no se ve afectado por la polisensibilización.

15 En base a estos hechos, los autores de la presente invención han desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán descritos en detalle a continuación.

Método *in vitro* para el diagnóstico de sensibilidad alérgica

20 Tal como se ha explicado previamente, los niveles de expresión del gen *PTGDR* pueden emplearse como biomarcador de sensibilidad alérgica en un sujeto.

25 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar sensibilización alérgica en un sujeto, de aquí en adelante “método de diagnóstico de la invención”, que comprende

(a) cuantificar los niveles de expresión del gen que codifica el receptor de la prostaglandina D (gen *PTGDR*) en una muestra biológica de dicho sujeto, y
(b) comparar el nivel de expresión previamente obtenido con la expresión de dicho gen en una muestra control,

30 en donde si los niveles de expresión del gen *PTGDR* están incrementados con respecto a los niveles de expresión de dicho gen en la muestra control, entonces el sujeto presenta sensibilidad alérgica.

35 En la presente invención se entiende por “diagnóstico” al proceso cognitivo que conlleva la estimación de la probabilidad de padecer una enfermedad en base a uno o

más parámetros presentes en un sujeto. En el contexto de la presente invención, dicho parámetro es el nivel de expresión del gen *PTGDR* y la enfermedad es la sensibilidad alérgica a uno o más alérgenos.

5 Se entiende por “sensibilización alérgica” al proceso asintomático que sufre un individuo cuando entra en contacto con un alérgeno (inhalado, ingerido o por contacto) y que da lugar a la producción de Inmunoglobulinas de tipo E (IgE) específicas del alérgeno en cuestión.

10 Como entiende el experto en la materia, un alérgeno es un tipo antígeno capaz de desencadenar una respuesta de anticuerpos IgE específicos. No obstante, en el contexto de la presente invención, los términos “alérgeno” y “antígeno” se consideran equivalentes y pueden usarse indistintamente a lo largo de la presente descripción.

15 Se entiende por “antígeno” a cualquier sustancia que es capaz de inducir una respuesta inmune, tanto humoral como celular, en el organismo de un sujeto (un hombre o un animal), o que puede inducir una respuesta inmune celular (expansión, activación y/o maduración de células inmunes, producción de citoquinas, o anticuerpos) cuando entra en contacto con células inmunitarias. En una realización
20 particular, el antígeno es un alérgeno.

Se entiende por “alérgeno” a aquella sustancia que es capaz de provocar alergia en un sujeto, es decir, aquella sustancia que es reconocida como extraña por el sistema inmune del sujeto, provocando una reacción inmunitaria, principalmente, la producción
25 de inmunoglobulinas de tipo E (IgE). Dicha sustancia puede ser una proteína o una glicoproteína capaz de unirse a la IgE. Ejemplos de alérgenos incluyen, sin limitarse a, componentes presentes en plantas que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto (e.g. polen), artrópodos (tales como los ácaros del polvo), alimentos o productos alimenticios (tales como, proteínas de la leche de vaca, huevo, frutas, frutos
30 secos, etc.), componentes presentes en saliva, pinzas, agujones de insectos que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto (avispas, abejas, etc.), epitelios de animales y fármacos.

Ejemplos de alérgenos de ácaros del polvo incluyen, sin limitarse a,
35 *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Acarus siro*, *Blomia*

tropicalis, *Euroglyphus maynei*, *Glyciphagus domesticus*, *Lepidoglyphus destructor* y *Tyrophagus putrescentiae*.

5 Ejemplos de alérgenos del polen incluyen, sin limitarse a, el polen de gramíneas (*Lolium perenne*, *Poa pratense*, *Phleum pratense*, *Cynodon dactylon*, *Festuca pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Avena sativa*, *Triticum sativa*), de otras hierbas (tales como *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, *Plantago lanceolata*, *Taraxacum vulgare*, *Parietaria judaica*, *Salsola kali*, *Urtica dioica*), de árboles (tales como *Olea europaea*, *Platanus spp*, *Cupressus spp*).

10

Ejemplos de alérgenos alimentarios incluyen, sin limitarse a, proteínas de leche de vaca, huevo, frutas y frutos secos.

15

Ejemplos de alérgenos de epitelios de animales incluyen, sin limitarse a, epitelio de cánidos [tales como el perro (*Canis familiaris*), etc.], de felinos [tales como el gato (*Felis domesticus*) etc.], de roedores (tales como ratones, jerbos, chinchillas, hurones, ardillas, hámsteres, cobayas, etc.), de animales de granja (tales como vacas, caballos, aves, conejos, etc.) y de reptiles (tales como la iguana etc.). Como entiende el experto en la materia, dentro del término “epitelio” se incluye la piel y los anexos cutáneos como el pelo.

20

Ejemplos de alérgenos procedentes de hongos incluyen, sin limitar a, hongos de los filos *Chytridiomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* y *Ascomycota*. En particular, los principales hongos alergénicos incluyen, sin limitarse a, los géneros *Alternaria* (e.g. *Alternaria alternata* o *A. tenuis*), *Aspergillus* (e.g. *Aspergillus fumigatus*), *Cladosporium* (e.g. *Cladosporium herbarum*), *Penicillium* (e.g. *Penicillium chrysogenum*), *Helminthosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Mucor*. De todos estos géneros, los cuatro primeros son los que tienen mayor importancia clínica.

25

30

Ejemplos de alérgenos de fármacos incluyen, sin limitarse a, antibióticos (tales como los beta-lactámicos), anestésicos, antiinflamatorios (pirazolonas), etc.

35

En una realización particular, la sensibilización alérgica o alergia se selecciona del grupo que consiste en alergia a los pólenes, alergia a los ácaros, alergia al epitelio de los animales y alergia a los hongos.

Todas estas sustancias pueden sensibilizar al sujeto de modo que su sistema inmunitario produce una serie de anticuerpos, habitualmente del tipo inmunoglobulina E (IgE), contra estos alérgenos. Estos anticuerpos de tipo IgE se fijan a la superficie de unas células llamadas mastocitos (localizadas en la piel y mucosas) y basófilos (circulantes en el torrente sanguíneo). Cuando el sujeto vuelve a tener contacto con el alérgeno se produce una interacción con la IgE fijada a dichas células y se efectúa un cambio conformacional en la superficie de estas células, que liberan una serie de mediadores proinflamatorios, responsables de los diferentes síntomas y signos de las enfermedades alérgicas.

5

En la presente invención se entiende por "sujeto" o "individuo" a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no está restringido a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un humano, hombre o mujer, de cualquier edad o raza.

10

El método de diagnóstico de la invención comprende en una primera etapa cuantificar los niveles de expresión del gen *PTGDR* en una muestra biológica de un sujeto [etapa a)].

20

El gen que codifica el receptor de la prostaglandina D2 o gen *PTGDR* (de sus siglas en inglés *prostaglandin D2 receptor*) es un gen que, en humanos, está localizado en el cromosoma 14q22.1. Nombres alternativos que pueden usarse en la literatura científica para referirse al gen *PGTDR* incluyen, pero no se limitan a, gen *DP*, gen *AS1*, gen *DP1*, gen *ASRT1* y gen *PTGDR1*. En una realización particular, el gen *PTGDR* comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de, 100% con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 (número de acceso a GeneBank U31332, versión U31332.1).

25

30

SEQ ID NO: 1

1 gaattctggc tattttcctc ctgccgttcc gactcggcac cagagtctgt ctctactgag
 61 aacgcagcgc gtcagggccg agctcttcac tggcctgctc cgcgctcttc aatgccagcg
 121 ccaggcgctc accctgcaga gcgtcccgcc tctcaaagag ggggtgtgacc cgcgagttta
 181 gataggaggt tcctgccgtg gggaacaccc cgccgccctc ggagcttttt ctgtggcgca
 241 gcttctccgc ccgagccgcg cgcggagctg ccgggggctc cttagcaccc gggcgccggg
 301 gccctcgccc ttccgcagcc ttcactccag ccctctgctc ccgcacgcca tgaagtcgcc

35

ES 2 674 128 B1

361 gttctaccgc tgccagaaca ccacctctgt ggaaaaaggc aactcggcgg tgatgggcgg
421 ggtgctcttc agcaccggcc tcctgggcaa cctgctggcc ctggggctgc tggcgcgctc
481 ggggctgggg tgggtgctgc ggcgtccact gcgcccgtg ccctcggctc tctacatgct
541 ggtgtgtggc ctgacggtca ccgacttgct gggcaagtgc ctctaagcc cgggtggtgct
5 601 ggctgcctac gctcagaacc ggagtctgcg ggtgcttgcg cccgcattgg acaactcgtt
661 gtgccaagcc ttcgccttct tcatgtcctt ctttgggctc tcctcgacac tgcaactcct
721 ggccatggca ctggagtgct ggctctccct agggcaccct ttcttctacc gacggcacat
781 caccctgctc ctggggcgac tgggtggccc ggtggtgagc gccttctccc tggctttctg
841 cgcgctacct ttcattgggt tcgggaagtt cgtgcagtac tgccccggca cctggtgctt
10 901 tatccagatg gtccacgagg agggctcgtc gtcggtgctg gggactctctg tgctctactc
961 cagcctcatg gcgctgctgg tcctcgccac cgtgctgtgc aacctcggcg ccatgcgcaa
1021 cctctatgcg atgcaccggc ggctgcagcg gcacccgcgc tcctgcacca gggactgtgc
1081 cgagccgctc gcggacggga ggggaagctc ccctcagccc ctggaggagc tggatcacct
1141 cctgctgctg gcgctgatga ccgtgctctt cactatgtgt tctctgcccg taattgtgag
15 1201 tccccgggcc ccgagg

En la presente invención se entiende por “identidad de secuencia” al grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos (o aminoácidos) obtenido mediante el alineamiento de las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado de identidad expresado en tanto por ciento. El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos (o aminoácidos) puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo BLAST [Altschul S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10]. Los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX, and TBLASTX, BLASTP and TBLASTN, son de dominio público en la página web de The National Center for Biotechnology Information (NCBI).

El gen *PTGDR* codifica la proteína receptora del receptor de tipo 1 de la prostaglandina D2 (también conocido como DP; AS1; DP1; ASRT1; PTGDR1). Esta proteína es un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G de unión a nucleótido de guanina [en inglés *guanine nucleotide-binding protein (G protein)-coupled receptor (GPCR)*]. Los receptores son proteínas que presentan 7 dominios transmembranarios que responden a señales extracelulares y activan las rutas de transmisión de señales de transducción intracelulares. Se ha descrito que esta proteína es un receptor para la prostaglandina D2, un mediador de la inflamación alérgica y de la inflamación de las vías respiratorias en asma. Distintos

procesamientos del ARNm correspondientes a dicho gen dan lugar a múltiples transcritos de la proteína.

5 En una realización particular del método de diagnóstico de la invención, la proteína codificada por el gen *PTGDR* comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de 100% con la secuencia SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 2 (número de acceso a GenBank AAC50178, versión AAC50178.1)

10 MKSPFYRCQNTTSVEKGN SAVMGGVLFSTGLLGNLLALGLLARSGLGWCSRRPLRPLPSVFYMLVCGL
 TVTDLLGKCLLSPVLAAYAQNRSRLRVLAPALDNSLCQAF AFFMSFFGLSSTLQLLAMALECWL SLGH
 PFFYRRHITLRLGALVAPVVSFAFSLAF CALPFMGFGKFVQYCPGTWCFIQMVHEEGSLSVLGYSVLYS
 SLMALLVLATVLCNLGAMRNLYAMHRRLQRHPR SCTRDCAEPRADGREAS PQLEELDHL LLLLALMTV
 LFTMCSLPVI

15 El experto en la materia entiende que las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de los genes que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan a su estructura global ni a su funcionalidad, dando lugar a variantes de la proteína. Dichas variantes caen dentro del ámbito de la
 20 presente invención, es decir, aquellas variantes de la proteína codificada por el gen *PTGDR* que presentan inserciones, deleciones o modificaciones de uno o más aminoácidos con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2.

25 En la presente descripción, los términos "expresión" y "expresión génica" incluyen la transcripción y/o traducción del ácido nucleico. Por lo tanto, la cuantificación de la expresión del gen *PTGDR* puede determinarse a partir del ácido nucleico del gen *PTGDR* o de la proteína codificada por dicho gen, es decir, de la proteína receptor de prostanoides DP.

30 Así, en una realización particular del método de diagnóstico de la invención, la cuantificación de los niveles de expresión del gen *PTGDR* comprende la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de dicho gen, o un fragmento de dicho ARNm, el ADN complementario (ADNc) de dicho gen, o un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas. Alternativamente, en otra realización particular, la cuantificación de los niveles de
 35 expresión del gen *PTGDR* comprende la cuantificación de los niveles de proteína codificada por dicho gen, o un fragmento de dicha proteína.

En la presente invención se entiende por "fragmento de ARNm" o "fragmento de ADNc" a la secuencia de nucleótidos del gen *PTGDR* que comprende uno o más nucleótidos ausentes de los extremos 3' y/o 5' con respecto a la secuencia de nucleótidos completa del gen *PTGDR*. En una realización particular, el fragmento del gen *PTGDR* es un fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 1.

De forma análoga, en la presente invención se entiende por "fragmento de la proteína receptor del prostanoide DP" a la secuencia de aminoácidos de la proteína receptor del prostanoide DP que comprende uno o más aminoácidos ausentes de su extremo amino terminal o carboxilo terminal con respecto a la secuencia de aminoácidos completa de la proteína receptor de prostanoide DP. En una realización particular, el fragmento de la proteína receptor de prostanoide DP es un fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 2.

Si la cuantificación de la expresión del gen *PTGDR* va a realizarse a partir del ADNc o el ARNm, primero es necesaria la extracción del ácido nucleico de la muestra biológica aislada del sujeto. Para este fin, la muestra biológica se puede tratar para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o la célula, liberando los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica para aislar y preparar los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se extraen mediante procedimientos conocidos para el experto en la materia y disponibles comercialmente (Sambroock, J., *et al.* 2012, "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3.).

Una vez extraído el ácido nucleico se procede a realizar la cuantificación de la expresión del gen *PTGDR*. Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de ARNm del gen *PTGDR* o de su ADNc correspondiente. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de ARNm de dicho gen pueden ser cuantificados mediante el empleo de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del ARNm y la cuantificación del producto de la amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante Southern blot y empleo de sondas apropiadas, Northern blot y empleo de sondas específicas del ARNm del gen de interés (gen *PTGDR*) o de su ADNc correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-PCR, hibridación, *microarrays*, etc.

Análogamente, los niveles del ADNc correspondiente a dicho ARNm del gen *PTGDR* también pueden ser cuantificados mediante el empleo de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del correspondiente
5 ADNc mediante transcripción inversa (RT) del ARNm correspondiente seguida de amplificación y cuantificación del producto de la amplificación de dicho ADNc. Métodos convencionales de cuantificar los niveles de expresión pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook *et al.* citado *ad supra*. En una realización particular, la cuantificación de los niveles de expresión se realiza mediante una reacción en cadena
10 de la polimerasa (PCR) cuantitativa, un *array* de ADN o ARN, o RNA-Seq o Secuenciación Masiva aplicada al estudio de ARN.

Si la cuantificación de la expresión del gen *PTGDR* va a realizarse a partir de la proteína codificada por el gen *PTGDR*, es decir, la proteína receptor de la
15 prostaglandina DP, entonces la muestra biológica aislada del sujeto tiene que ser tratada para extraer las proteínas. Métodos para extraer o aislar proteínas son conocidos para el experto en la materia y están disponibles comercialmente (Sambroock, J., *et al.* 2012, citado *ad supra*).

20 Los niveles de la proteína receptor de la prostaglandina D pueden ser cuantificados mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra de un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de dicha proteína pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a la proteína receptor de prostaglandina D y la posterior
25 cuantificación de los complejos formados.

Se entiende por “anticuerpo” a una glicoproteína del tipo gamma globulina que forma parte del sistema inmunitario humoral que se une de forma específica a un antígeno.
30 El término anticuerpo tal como aquí se utiliza incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos recombinantes de anticuerpos, combibodies, fragmentos Fab y scFv de anticuerpos, así como los dominios de unión a ligando. Anticuerpos específicos de la proteína codificada por el gen *PTGDR* están disponibles comercialmente. Ejemplos de dichos anticuerpos incluyen, sin limitar a, los
35 anticuerpos de la empresa Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts,

USA) con número de catálogo PA5-34114, PA5-34113, PA1-32793, PA5-34116 y PA5-34115.

5 Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Los términos "marca" o "marcado" se refieren a una composición capaz de producir una señal detectable indicativa de la presencia de la molécula marcada. Ejemplos ilustrativos de marcadores adecuados incluyen, sin limitar a, radioisótopos, cromóforos de nucleótidos, enzimas, sustratos, moléculas fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas, restos bioluminescentes, y similares.

10 Como tal, una marca es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el

15 Western-blot o transferencia Western, ELISA (enzimoinmunoensayo RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (enzimoinmunoensayo competitivo), DAS-ELISA (ELISA tipo sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación

20 coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar dicha la proteína receptor de prostaglandina D, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, espectrometría de masas etc. No obstante, en una realización particular, la cuantificación de los niveles de proteína se realiza mediante *Western blot*, ELISA, un *array* de proteínas o un estudio de *binding*. Cuando

25 se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o reactivo que se sabe se une a la proteína receptor de prostaglandina D con alta afinidad para detectar la cantidad de la misma. Ejemplos de anticuerpos o reactivos con capacidad de unirse a dicha la proteína receptor de prostaglandina D incluyen, sin limitarse a, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos

30 de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados. En el mercado, existen anticuerpos comerciales contra la proteína receptor de prostaglandina D que pueden emplearse en el contexto de la presente invención, tales como los citados en párrafos anteriores.

35 Tal como se ha puesto de manifiesto en párrafos anteriores, para llevar a cabo la primera etapa del método de diagnóstico de la invención, es necesario disponer de

una muestra biológica aislada del sujeto en estudio. En el contexto de la presente invención, el término “muestra biológica” se refiere a cualquier material biológico que se puede obtener del sujeto, tal como una biopsia, un tejido, una célula o un fluido (suero, saliva, semen, esputo, lágrimas, moco, sudor, leche, extractos de cerebro y similares), y que puede albergar información sobre la dotación genética característica de una persona. En una realización particular en el que la muestra biológica es una muestra de sangre periférica, esputo u orina. El término “aislado/a” implica que la muestra biológica ha sido separada o extraída del resto de componentes que la acompañan de forma natural.

10

Una vez que se han cuantificado los niveles de expresión del gen *PTGDR*, el método de diagnóstico de la invención comprende comparar el nivel de expresión obtenido con la expresión de dicho gen en una muestra control.

15

La determinación de los niveles de expresión del gen *PTGDR* necesita ser correlacionada con valores de una muestra control o muestra de referencia que corresponden al nivel de expresión del gen *PTGDR* medido en una muestra procedente de un sujeto que no padece sensibilidad alérgica ni alergia a un determinado alérgeno o que corresponden al valor medio de los niveles de expresión del gen *PTGDR* medidos en una colección de muestras biológicas de sujetos que no padecen sensibilidad alérgica ni alergia a un determinado alérgeno. Dicha muestra de referencia se obtiene típicamente combinando cantidades iguales de muestras de una población de sujetos. En general, las muestras de referencia típicas se obtendrán de sujetos que están clínicamente bien documentados y en los que la ausencia de sensibilidad alérgica o alergia se encuentra bien caracterizada. En tales muestras, las concentraciones normales (de referencia) del biomarcador (gen *PTGDR*) se pueden determinar, por ejemplo, proporcionando la concentración media sobre la población de referencia. Al determinar la concentración de referencia del marcador se toman en cuenta varias consideraciones. Entre tales consideraciones están la edad, peso, sexo, estado físico general del paciente y similares. Por ejemplo, se toman como grupo de referencia cantidades iguales de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 a preferiblemente más de 1000 sujetos, preferiblemente clasificados según las consideraciones anteriores, por ejemplo, de varias categorías de edad. La colección de muestras de las que deriva el nivel de referencia estará preferiblemente constituida de sujetos que padecen el mismo tipo de sensibilidad alérgica o alergia que se quiere diagnosticar.

20

25

30

35

Una vez que se ha establecido este valor medio, se puede comparar el nivel de expresión del gen *PTGDR* en el sujeto de estudio y dicho valor medio. De esta manera se puede asignar un nivel de expresión "incrementado" o "disminuido". Debido a la variabilidad entre sujetos (por ejemplo, aspectos referidos a la edad, raza, etc.) es muy difícil (si no prácticamente imposible) establecer valores de referencia absolutos de expresión del gen *PTGDR*. Así, en una forma de realización particular, los valores de referencia para expresión "incrementada" o "disminuida" de la expresión del gen *PTGDR* se determinan calculando los percentiles por medios convencionales que implica ensayar en una o varias muestras aisladas de sujetos en los que la sensibilidad alérgica o alergia se encuentra bien documentada. Los niveles de expresión "incrementados" del gen *PTGDR* se pueden entonces asignar, preferiblemente, a muestras en donde los niveles de expresión del gen *PTGDR* son iguales a o superan el percentil 50 en la población normal, incluyendo, por ejemplo, niveles de expresión iguales a o en exceso al percentil 60 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 70 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 80 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 90 en la población normal, e iguales a o en exceso al percentil 95 en la población normal.

En la presente invención se entiende por "niveles de expresión incrementados" cuando el nivel de expresión se refiere a niveles del gen *PTGDR* superiores a los que aparecen en una muestra de referencia o muestra control. En particular, se puede considerar que una muestra presenta niveles altos de expresión del gen *PTGDR* cuando los niveles de expresión son de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto a los niveles de expresión en la muestra control.

Una vez hecha la comparación entre el nivel de expresión del gen *PTGDR* en la muestra del sujeto con la expresión de dicho gen en la muestra control, se puede concluir si el sujeto padece sensibilidad alérgica o no ya que, según se ha descrito en la presente invención, si los niveles de expresión del gen *PTGDR* están incrementados con respecto a los niveles de expresión de dicho gen en la muestra control, entonces el sujeto padece sensibilidad alérgica.

35

Los niveles de expresión del gen *PTGDR* también pueden emplearse como biomarcador de la eficacia de un tratamiento contra la alergia, basta con medir los niveles de expresión del gen antes y después de la administración del tratamiento. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento contra la alergia administrado a un sujeto, de aquí en adelante “método de evaluación de la eficacia de un tratamiento”, que comprende

- (a) cuantificar los niveles de expresión del gen *PTGDR* en una muestra biológica de dicho sujeto antes y después de la administración del tratamiento, y
 - (b) comparar el nivel de expresión obtenido antes del tratamiento con el nivel de expresión obtenido después del tratamiento,
- en donde un nivel de expresión del gen *PTGDR* después del tratamiento menor que un nivel de expresión de dicho gen antes del tratamiento, es indicativo de que el tratamiento administrado está siendo eficaz contra la alergia.

En la presente invención se entiende por “alergia” a la respuesta exagerada e inapropiada del sistema inmunitario frente a sustancias que son inocuas para la mayoría de las personas. Los términos “alergia” e “hipersensibilidad” se pueden considerar sinónimos y pueden usarse indistintamente en la presente descripción. Ejemplos de enfermedades alérgicas incluyen, sin limitar a, conjuntivitis, rinitis alérgica, asma alérgica, anafilaxia, urticaria, dermatitis atópica o eccema atópico, dermatitis alérgica de contacto y alergia alimentaria. La sustancia que desencadena dicha respuesta exagerada e inapropiada del sistema inmunitario se denomina antígeno que, tal como se ha explicado previamente, en el contexto de la presente invención, dicho antígeno es un alérgeno.

Las distintas realizaciones particulares descritas para el método de diagnóstico de la invención, así como las definiciones y explicaciones de los términos y expresiones empleados, son aplicables al presente aspecto inventivo.

La eficacia de cualquier compuesto empleado en el tratamiento de la alergia puede ser evaluada mediante el método descrito en el presente aspecto inventivo. Ejemplos de tratamientos contra la alergia incluyen, sin limitar a, antihistamínicos, inmunoterapia, fármacos antiasmáticos y compuestos biológicos.

Ejemplos de antihistamínicos incluyen, sin limitar a, antihistamínicos de primera generación (tales como dexclorfeniramina, hidroxicina, carbocisteína, difenhidramina, doxilamina, dimenhidrato, dexclorfeniramina y tripelenamina entre otros), antihistamínicos de segunda generación (tales como cetirizina, loratadina y ebastina entre otros) o antihistamínicos de segunda generación más posteriores (tales como levocetirizina, desloratadina, bilastina y entre otros).

La inmunoterapia, o también denominada como "vacunas de alergia", es un procedimiento médico que consiste en la administración repetitiva y en las más de las ocasiones, gradual de una sustancia alérgica a un paciente sensibilizado a ella, en cantidades generalmente crecientes durante varios años, con la intención de lograr su tolerancia. Las distintas sustancias alérgicas (alérgenos) que pueden administrarse como "vacuna de alergia" han sido descritas en párrafos anteriores.

Ejemplos de fármacos antiasmáticos incluyen, sin limitar a, broncodilatadores beta-adrenérgicos (tales como salbutamol, terbutalina, formoterol, salmeterol vilanterol, entre otros), corticoides inhalados (tales como dipropionato de beclometasona, budesonida, mometasona, fluticasona y ciclesonida, entre otros), corticoides sistémicos (tales como prednisona, metilpredinosolona, triamcinolona y dexametasona, entre otros) o anticolinérgicos inhalados (tales como bromuro de ipratropio o tiotropio, entre otros).

Ejemplos de biológicos incluyen, sin limitar a, omalizumab, mepolizumab y reslizumab, entre otros.

Tal como se describe en la presente invención, para evaluar si un tratamiento administrado a un sujeto está siendo efectivo es necesario medir los niveles de expresión del gen *PTGDR* en dicho sujeto antes y después de la administración del tratamiento, y si el nivel de expresión de dicho gen después del tratamiento es menor que el nivel de expresión de ese gen antes del tratamiento, entonces se puede concluir que el tratamiento administrado está siendo eficaz contra la alergia.

Métodos para cuantificar los niveles de expresión de un gen ya han sido descritos previamente. En la presente invención se entiende por "nivel de expresión menor" o "niveles de expresión menores" a una disminución del nivel de expresión del gen *PTGDR* después del tratamiento con respecto al nivel de expresión de dicho gen

antes del tratamiento. Dicha disminución del nivel de expresión puede ser de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso menor con respecto al nivel de expresión del gen *PTGDR* antes del tratamiento.

5

En la presente invención se entiende que un tratamiento está siendo efectivo cuando la alergia padecida por el sujeto desaparece o disminuye, es decir, los síntomas asociados a la alergia se desaparecen o atenúan, y el bienestar del sujeto mejora.

10

Usos de la invención

La presente invención está basada en el hecho de que los niveles de expresión del gen *PTGDR* están incrementados en la sangre de sujetos alérgicos. Por lo tanto, dicho nivel de expresión puede emplearse como biomarcador para el diagnóstico de la sensibilización alérgica en un sujeto.

15

Así, en un aspecto, la presente invención se relaciona con el uso *in vitro* de los niveles de expresión del gen *PTGDR*, de aquí en adelante "uso de la invención", como biomarcador para diagnosticar sensibilidad alérgica en un sujeto o para evaluar la eficacia de un tratamiento contra la alergia en un sujeto.

20

Tal como se ha puesto de manifiesto a lo largo de la presente descripción, si los niveles de expresión del gen *PTGDR* están incrementados con respecto a los niveles de expresión de dicho gen en la muestra control, entonces dicho sujeto padece sensibilidad alérgica o el tratamiento no está siendo efectivo.

25

Los términos y expresiones empleados en el presente aspecto inventivo han sido definidos y explicados en párrafos anteriores.

30

En una realización particular del uso de la invención, la sensibilidad alérgica o la alergia se selecciona del grupo que consiste en alergia al polen, alergia a los ácaros, alergia al epitelio de los animales y alergia a los hongos. Ejemplos de los distintos alérgenos pueden encontrarse en párrafos anteriores.

35

Los niveles de expresión del gen *PTGDR* pueden determinarse mediante

(i) la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de dicho gen, o un fragmento de dicho ARNm, el ADN complementario (ADNc) de dicho gen, o un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas; o

(ii) la cuantificación de los niveles de proteína codificada por dicho gen.

5

Las técnicas para la cuantificación de expresión tanto de ácidos nucleicos como de proteínas han sido descritas previamente y cualquiera de ellas puede emplearse en el contexto de la presente invención. No obstante, en una realización particular, la cuantificación de los niveles de expresión de los ácidos nucleicos se lleva a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, un *array* de ADN o ARN, o un RNAseq; y en otra realización particular, la cuantificación de los niveles de proteína se realiza mediante *Western blot*, ELISA, *array* de proteínas o estudios de *binding*.

10

Las características del gen *PTGDR* y de la proteína codificada por dicho gen, al igual que sus respectivas secuencias de nucleótidos y aminoácidos, han sido descritas en párrafos anteriores de la presente descripción.

15

En la presente invención también se contempla el uso de inhibidores de la expresión del gen *PTGDR* o de la proteína codificada por dicho gen.

20

Se entiende por “inhibidores de la expresión” a cualquier sustancia o compuesto que sea capaz de impedir o bloquear la transcripción y la traducción del gen de interés (es decir, impedir o bloquear la expresión de dicho gen), o que sea capaz de impedir que la proteína codificada por dicho gen realice su función (actividad).

25

A modo ilustrativo, agentes inhibidores de la expresión del gen *PTGDR* adecuados para su uso en la presente invención son, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ARN de interferencia (ARNip), ARN catalíticos o ribozimas específicos, ARN con actividad *decoy*, es decir, con capacidad para unirse específicamente a un factor (proteico generalmente) importante para la expresión del gen, de manera que la expresión del gen de interés, en este caso el gen *PTGDR* sea inhibida, etc. Asimismo, agentes inhibidores capaces de impedir que la proteína codificada por dicho gen realice su función son, por ejemplo, péptidos inhibidores de la proteína, anticuerpos dirigidos específicamente contra epítomos de la proteína esenciales para desempeñar su función. Por tanto, el agente inhibidor del gen *PTGDR* se selecciona del grupo formado por ARNip, oligonucleótidos antisentido, ribozimas específicos, anticuerpos y

30
35

polipéptidos. Preferiblemente, el inhibidor del gen *PTGDR* es un ARNip específico para dicho gen.

5 Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un ARN de interferencia específico del gen *PTGDR* (ARNip) y/o de un anticuerpo específico para la proteína codificada por el gen *PTGDR* (Ab), en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de la alergia.

ARNip

10 En la presente invención se entiende por ARN de interferencia pequeños, o ARNip (siRNA en su denominación en inglés) son agentes que son capaces de inhibir la expresión de un gen diana mediante interferencia de ARN. Un ARNip se puede sintetizar químicamente, se puede obtener mediante transcripción *in vitro* o se puede sintetizar *in vivo* en la célula diana. Típicamente, los ARNip consisten en una cadena
15 doble de ARN de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud y que puede contener una región protuberante 3' y/o 5' de 1 a 6 nucleótidos. La longitud de la región protuberante es independiente de la longitud total de la molécula de ARNip. Los ARNip actúan mediante la degradación o el silenciamiento post-transcripcional del mensajero diana.

20

Los ARNip pueden ser los llamados shRNA (short hairpin RNA), caracterizados por que las cadenas antiparalelas que forman el ARNip están conectadas por una región bucle u horquilla. Los shRNAs pueden estar codificados por plásmidos o virus, particularmente retrovirus y estar bajo el control de promotores tales como el promotor
25 U6 de la ARN polimerasa III.

30

Los ARNip de la invención son sustancialmente homólogos al ARNm del gen *PTGDR*. Por sustancialmente homólogos se entiende que tienen una secuencia que es suficientemente complementaria o similar al ARNm diana, de forma que el ARNip sea capaz de provocar la degradación de éste por interferencia de ARN. Los ARNip adecuados para provocar dicha interferencia incluyen ARNip formados por ARN, así como ARNip que contienen distintas modificaciones químicas tales como:

35

- ARNip en los que los enlaces entre los nucleótidos son distintos a los que aparecen en la naturaleza, tales como enlaces fosforotioato.
- Conjugados de la cadena de ARN con un reactivo funcional, tal como un fluoróforo.

- Modificaciones de los extremos de las cadenas de ARN, en particular el extremo 3' mediante la modificación con distintos grupos funcionales del hidroxilo en posición 2'.
- Nucleótidos con azúcares modificados tales como restos O-alkilados en posición 2' tales como 2'-O-metilribosa o 2'-O-fluororibosa.
- Nucleótidos con bases modificadas tales como bases halogenadas (por ejemplo 5-bromouracilo y 5-iodouracilo), bases alquiladas (por ejemplo 7-metilguanosa).

Los ARNip y ARNsh de la invención se pueden obtener usando una serie de técnicas conocidas para el experto en la materia. La región de la secuencia de nucleótidos que se toma como base para diseñar los ARNip no es limitante y puede contener una región de la secuencia codificante (entre el codón de iniciación y el codón de terminación) o, alternativamente, puede contener secuencias de la región no traducida 5' o 3', preferentemente de entre 25 y 50 nucleótidos de longitud y en cualquier posición en posición sentido 3' con respecto al codón de iniciación. Una forma de diseñar un ARNip implica la identificación de los motivos AA(N19)TT, en donde N puede ser cualquier nucleótido en la secuencia que codifica aprataxina, y la selección de aquellos que presenten un alto contenido en G/C. Si no se encuentra dicho motivo, es posible identificar el motivo NA(N21), en donde N puede ser cualquier nucleótido.

20

Oligonucleótidos antisentido

Alternativamente a los ARNip, la invención también contempla uso de ácidos nucleicos antisentido aislados para inhibir la expresión, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción de un ácido nucleico del gen *PTGDR*. Los ácidos nucleicos antisentido se pueden unir mediante complementariedad de bases convencional o, por ejemplo, en el caso de unirse a ADN bicatenario, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. En general, estos métodos se refieren al rango de técnicas generalmente empleadas en la técnica e incluyen cualquier método que se basa en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

30

Una construcción antisentido se puede distribuir, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN que es complementario a al menos una parte única del ARNm celular del gen *PTGDR*. De forma alternativa, la construcción antisentido es una sonda de oligonucleótidos que se genera *ex vivo* y que, cuando se introduce en la célula, produce inhibición de la

35

expresión génica hibridando con el ARNm y/o secuencias genómicas de un ácido nucleico diana. Tales sondas de oligonucleótidos son preferiblemente oligonucleótidos modificados, que son resistentes a las nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas, y que son por lo tanto estables in vivo. Moléculas de ácidos nucleicos ejemplares para su uso como oligonucleótidos antisentido son análogos de ADN de fosforamidato, fosfotionato y metilfosfonato.

Respecto al oligonucleótido antisentido, son preferidas las regiones de oligodesoxirribonucleótidos derivadas del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre -10 y +10 del gen diana. Las aproximaciones antisentido implican el diseño de oligonucleótidos (bien ADN bien ARN) que son complementarios al ARNm que codifica el polipéptido diana. Los oligonucleótidos antisentido se unirán a los transcritos de ARNm y prevendrán la traducción.

Los oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del ARNm, por ejemplo, la secuencia 5' no traducida hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG, deberían funcionar de la forma más eficaz para inhibir la traducción. Sin embargo, se ha mostrado recientemente que las secuencias complementarias a las secuencias 3' no traducidas de los ARNm también son eficaces para inhibir la traducción de los ARNm. Por lo tanto, se podrían usar oligonucleótidos complementarios bien a las regiones 5' ó 3' no traducidas, no codificantes de un gen en una aproximación antisentido para inhibir la traducción de ese ARNm. Los oligonucleótidos complementarios a la región 5' no traducida del ARNm deberían incluir el complemento del codón de iniciación AUG. Los oligonucleótidos complementarios a las regiones codificantes del ARNm son inhibidores de la traducción menos eficaces, pero también se podrían usar según la invención. Si están diseñados para hibridar con la región 5', 3' o codificante del ARNm, los ácidos nucleicos antisentido deberían tener al menos seis nucleótidos de longitud y tener preferiblemente menos de alrededor de 100 y más preferiblemente menos de alrededor de 50, 25, 17 ó 10 nucleótidos de longitud.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser de ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, de cadena sencilla o de cadena doble. El oligonucleótido se puede modificar en el grupo de la base, el grupo del azúcar o el esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, su capacidad de hibridación etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a receptores de

células huésped) o agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular o la barrera hematoencefálica, agentes intercalantes. Para este fin, el oligonucleótido puede estar conjugado a otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente transportador, agente de corte desencadenado por hibridación, etc.

5

Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender al menos un grupo de base modificada. El oligonucleótido antisentido también puede comprender al menos un grupo azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye, pero no está limitado a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y hexosas. El oligonucleótido antisentido también puede contener un esqueleto semejante a péptido neutro. Tales moléculas se denominan oligómeros ácido nucleico peptídico (ANP).

10

En algunos casos, puede ser difícil alcanzar las concentraciones intracelulares del antisentido suficientes para suprimir la traducción de los ARNm endógenos. Por lo tanto, en una aproximación se usa una construcción de ADN recombinante en la que se coloca el oligonucleótido antisentido bajo el control de un promotor fuerte de pol III o pol II. De forma alternativa, se puede reducir la expresión del gen diana dirigiendo secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen (es decir, el promotor y/o potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que previenen la transcripción del gen en las células diana en el cuerpo.

15

20

Ribozimas

También se pueden usar moléculas de ribozimas diseñadas para cortar de forma catalítica transcritos de un ARNm diana para prevenir la traducción de los ARNm del gen *PTGDR* cuya actividad se desea inhibir. Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar el corte específico de ARN. El mecanismo de acción de la ribozima implica hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima a un ARN diana complementario, seguido por un suceso de corte endonucleolítico. La composición de las moléculas de ribozima preferiblemente incluye una o más secuencias complementarias al ARNm diana, y la bien conocida secuencia responsable del corte del ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente. Las ribozimas usadas en las composiciones de la presente invención incluyen las ribozimas de cabeza de martillo, las ARN endorribonucleasa (de aquí en adelante ribozimas de tipo Cech). Las ribozimas pueden estar compuestas de oligonucleótidos modificados (por ejemplo, para mejorar la estabilidad, direccionamiento, etc.) y se deberían distribuir a células que expresan el gen diana *in vivo*. Un método preferido de

30

35

distribución implica usar una construcción de ADN que codifica la ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte de pol III ó pol II, de modo que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajeros diana endógenos e inhibir la traducción. Puesto que las ribozimas, contrariamente a otras moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una concentración intracelular menor para su eficacia.

Péptidos inhibidores

El término péptido inhibidor, tal como aquí se utiliza, hace referencia a aquellos péptidos capaces de unirse a la proteína codificada por el gen *PTGDR* e inhibir su actividad según se ha explicado anteriormente.

Anticuerpos inhibidores

Por anticuerpo inhibidor se entiende en el contexto de la presente invención todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse a la proteína codificada por el gen *PTGDR* de manera específica e inhibir una o más de las funciones del mismo. Ejemplos de anticuerpos específicos de la proteína codificada por el gen *PTGDR* han sido citados previamente. Los anticuerpos pueden ser preparados usando cualquiera de los métodos que son conocidos para el experto en la materia. Una vez identificados anticuerpos con capacidad de unión a la proteína codificada por el gen *PTGDR*, se seleccionarán aquellos capaces de inhibir la actividad de ésta proteína usando un ensayo de identificación de agentes inhibidores.

Para identificar o diseñar los agentes inhibidores anteriormente definidos es necesario conocer la secuencia de nucleótidos del gen *PTGDR* y la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por dicho gen. Así, en una realización particular, la proteína codificada por el gen *PTGDR* es la proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 2. En otra realización particular, el gen *PTGDR* comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de, al menos, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1.

Cualquiera de los inhibidores de la expresión del gen *PTGDR* citados anteriormente puede emplearse en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de la alergia. En una realización particular de la invención, la alergia se selecciona del grupo que consiste en alergia al polen, alergia a los ácaros, alergia a

los hongos y alergia a los epitelios de los animales. Ejemplos de cada una de las alergias citadas han sido citados en párrafos anteriores.

5 Como entiende el experto en la materia, la elaboración de la composición farmacéutica puede comprender *carriers*, excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables, así como adyuvantes. Métodos sobre como elaborar composiciones farmacéuticas son ampliamente conocidos por el experto en la materia.

10 El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción del principio activo, lo estabiliza o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la
15 humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

20 El término “farmacológicamente aceptable” se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño, o efectos fisiológicos indeseables, al sujeto que se administra.

La composición puede comprender además un vehículo farmacológicamente
25 aceptable o *carrier*. Además, el vehículo debe ser farmacéuticamente aceptable. Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “*carrier* farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos (soluciones salinas tamponadas con
30 fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, soluciones estériles), disolventes o tensioactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de las secuencias de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación del extracto de la invención así como también de otros compuestos, permitir una mejor
35 dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente.

El vehículo farmacológicamente aceptable podría ser, pero sin limitarse, una nanopartícula, un liposoma, una micela o una microemulsión.

5 Los elementos necesarios para la puesta en práctica de la invención, es decir, diagnosticar sensibilidad alérgica en un sujeto o evaluar la eficacia de un tratamiento contra la alergia, pueden estar disponibles en forma de kit.

10 Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso *in vitro* de un kit para diagnosticar sensibilidad alérgica en un sujeto, o para evaluar si un tratamiento contra la alergia está siendo efectivo, en donde dicho kit comprende

- (i) una pareja de cebadores que comprenden una secuencia de nucleótidos que hibrida de forma específica con la secuencia de nucleótidos del gen *PTGDR*,
- (ii) una sonda que hibrida de forma específica con la secuencia de nucleótidos del gen del gen *PTGDR*, y/o
- 15 (iii) un anticuerpo que reconoce de forma específica la proteína codificada por el gen *PTGDR*.

20 En la presente invención se entiende por “kit” a aquel producto que contiene los diferentes componentes o principios activos necesarios para poner en práctica la invención, es decir, aquellos componentes necesarios para cuantificar los niveles de expresión del gen *PTGDR* y determinar si un sujeto padece sensibilidad alérgica o el tratamiento administrado está siendo efectivo. Opcionalmente, el kit también puede comprender la composición farmacéutica descrita anteriormente útil para tratar la alergia. Entre los componentes necesarios para cuantificar los niveles de expresión
25 del gen *PTGDR* se incluyen, pero no se limitan a, cebadores, sondas y/o anticuerpos.

30 En la presente invención se entiende por “cebador”, “iniciador” o “*primer*” a la cadena de ácido nucleico que permite que la ADN polimerasa comience la síntesis de la nueva cadena de ADN. En la mayoría de replicaciones del ADN, el principal cebador para la síntesis de ADN es una cadena corta de ARN. Este ARN lo produce una ARN polimerasa (primasa) y luego una ADN polimerasa lo elimina y lo sustituye por ADN. En la presente invención se entiende que una secuencia de nucleótidos dada hibrida de forma específica con otra secuencia de nucleótidos cuando ambas secuencias comparten un grado de complementariedad en condiciones de moderada o alta
35 astringencia. Las condiciones exactas que determinan la astringencia de la hibridación dependen no solamente de la fuerza iónica, temperatura y la concentración de

agentes de desestabilización como la formamida, sino también de factores como la longitud de la secuencia del ácido nucleico, la composición base, el porcentaje de desigualdad entre las secuencias de hibridación y la frecuencia de presencia de subseries de esa secuencia dentro de otras secuencias no idénticas. Variando las condiciones de hibridación desde un nivel de astringencia en el que no ocurre la hibridación a un nivel en el que se observa primero la hibridación, pueden determinarse las condiciones que permitirán a una secuencia dada hibridar con otra secuencia. Así, las condiciones de astringencia alta o moderada pueden determinarse empíricamente, lo cual es práctica de rutina para el experto en la materia. En general, cuánto más alta es la temperatura de hibridación y más baja la concentración de sales en el tampón de hibridación, más alta es la astringencia y sólo se dará hibridación entre secuencias de nucleótidos muy similares, es decir, con un alto grado de complementariedad.

En la presente invención se entiende por "sonda" a un fragmento de ácido nucleico de pequeño tamaño usado como herramienta para detectar a una secuencia complementaria de ácido nucleico. Como entiende el experto en la materia, tanto las sondas como los cebadores pueden ir marcados en sus extremos para facilitar su localización.

Como entiende el experto en la materia, para preparar los cebadores y las sondas que hibridan de forma específica con el gen *PTGDR* es necesario conocer la secuencia de nucleótidos de dicho gen. Dichas secuencias de nucleótidos están disponibles en las bases de datos accesibles al público, como por ejemplo, GenBank. No obstante, en una realización particular, el gen *PTGDR* comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad del 100% con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1.

Anticuerpos que reconocen de forma específica la proteína codificada por el gen *PTGDR* han sido definidos previamente en la presente descripción en párrafos anteriores. Anticuerpos específicos de la proteína *PTGDR* pueden obtenerse en el laboratorio a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína *PTGDR*. Dicha secuencia de aminoácidos, así como las estructuras secundaria y terciaria de la proteína *PTGDR* pueden encontrarse en bases datos disponibles al público como protein DataBank. No obstante, en una realización particular, la proteína codificada por el gen *PTGDR* es la proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 2. Ejemplos de

anticuerpos que reconocen de forma específica la proteína codificada por el gen *PTGDR* han sido citados en párrafos anteriores.

5 En otra realización particular, la sensibilización alérgica o alergia se selecciona del grupo que consiste en alergia al polen, alergia a los ácaros, alergia al epitelio de los animales y alergia a los hongos. Todos estos términos han sido definidos y explicados previamente.

10 Adicionalmente, componentes útiles para la puesta en práctica de la invención y que pueden estar comprendidos dentro del kit incluyen, pero no se limitan a, solución tampón, solución de lisis, material estéril (jeringuillas, hisopos, torundas, pinzas, etc.), agua destiladas, alcoholes (etanol), etc. Adicionalmente, el kit puede contener instrucciones o indicaciones que guíen al experto en la materia en la administración del péptido de la invención.

15 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
20 invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 Figura 1.- Análisis mediante PCR a tiempo real de la expresión de *PTGDR* en un modelo crónico de asma alérgica en ratón.

Figura 2.- Representación de la curva ROC para los niveles de expresión de *PTGDR* y el diagnóstico de alergia.

30

EJEMPLOS

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

35

Los resultados que se presentan se obtuvieron a partir de un estudio observacional, analítico, de tipo caso-control en el que se analizó la relación entre la variable nivel de expresión del gen *PTGDR* en sangre periférica y el desarrollo de distintas manifestaciones clínicas en pacientes alérgicos. Todos los participantes recibieron la información de la posibilidad de participar en el estudio y se les solicitó su consentimiento informado; se siguieron las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética de la Investigación del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Los individuos seleccionados para el estudio acudieron a las consultas del Servicio de Inmunoalergia del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca y cumplieron con todos los criterios de inclusión que se detallan a continuación.

El Servicio de Inmunoalergia del Hospital Universitario de Salamanca dispone de una base de datos y una genoteca con muestras de más de 3.000 pacientes con una completa caracterización clínico-biológica de los mismos. Entre estos pacientes se seleccionaron 400 individuos. De ellos, 200 pacientes alérgicos diagnosticados por un Facultativo Especialista del Servicio de Inmunoalergia. Dichos pacientes presentaron sintomatología respiratoria alérgica y pruebas de hipersensibilidad inmediata positivas para algún aeroalérgeno de una batería adaptada al medio local.

Estos individuos se han comparado con 200 individuos del grupo control que siguen estrictamente los siguientes criterios: (i) ausencia de síntomas e historia clínica compatible con alergia; (ii) sin síntomas o historia clínica compatible con asma o rinitis, (iii) sin síntomas o historia clínica de enfermedades respiratorias; (iv) test cutáneos negativos frente a la misma batería de aeroalérgenos comunes; (v) sin historia familiar de asma ni rinitis (parentesco de primer grado); y (vi) sin historia familiar de alergia (parentesco de primer grado). Este grupo tan bien caracterizado fue muy difícil de obtener y resultó esencial para la identificación de marcadores en estudios caso-control. Los datos clínicos y biológicos se recogieron en un protocolo detallado realizado a partir de las historias clínicas, la anamnesis y el examen directo de los pacientes. El protocolo incluye tanto datos ambientales como datos clínicos y de laboratorio para permitir una completa caracterización de la población (Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2014 [cited 2015 Enero 26; Bousquet J, et al. 2008. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 Update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). Allergy. 2008 Apr; 63(86) (8-160): p. 63 (86): 8-160; Brozek

J, et al. 2010. J Allergy Clin Immunol. 2010 Sep; 126(3)(466-476)). Los niveles de IgE fueron determinados mediante enzimoimmunoanálisis ImmunoCAP Total IgE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EEUU). Los test cutáneos se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (Clinical SCoSTotEAoAa. Skin tests used in type I allergy testing Position paper. Allergy. 1989; 44(10) (1-59)) El modelo estadístico para el análisis de las variables se llevó a cabo entre otros por un análisis multivariante incluyendo correlación canónica.

El análisis de expresión génica de *PTGDR* se llevó a cabo mediante PCR a tiempo real. Se procedió a la extracción de ARN total a partir de muestras de sangre periférica de los individuos objeto de estudio. La extracción se llevó a cabo con el kit comercial Ribopure-Blood (Ambión). La calidad y cantidad de las muestras de ARN se analizó mediante espectrometría y en un Bioanalizador Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). Posteriormente las muestras de ARN fueron analizadas y sometidas a retrotranscripción mediante el kit SuperScript III (Thermo Fisher Scientific). El ADNc se utilizó como base en los experimentos de RT-qPCR que se llevaron a cabo en un equipo LightCycler 480 II (Roche). Para cada muestra los resultados se analizaron por triplicado. En todos los experimentos se analizaron de forma conjunta pacientes y controles para evitar posibles sesgos experimentales. Los resultados se analizaron mediante el método Livak (Livak K, 2001. Methods. 25(4) (402-408): p. 25: 402-408; Livak K, Schmittgen T. 2004. Guide to Performing Relative Quantification of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR.) y se normalizaron con genes constitutivos cuidadosamente seleccionados basándonos en experimentos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio utilizando el sistema Real Time ready Human Reference Gene Panel (Roche), entre los cuales destacan *GAPDH* y *TBP* por su estabilidad y reproducibilidad (ver Tabla 1). Todos los experimentos de análisis de la expresión se llevaron a cabo siguiendo las normas MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) que tienen como objetivos fomentar la fiabilidad de los resultados para ayudar a asegurar la integridad de la literatura científica, promover la coherencia entre los laboratorios, y aumentar la transparencia experimental (Bustin S, Benes V, Garson J, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009 April; 55(4)(611-622):p. 55(4): 611-622).

35

Tabla 1

Gen / Nº de acceso	Cebador	Secuencia (SEQ ID NO:)
<i>GAPDH</i> P04406	Directo	5'-CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC-3' (SEQ ID NO: 3)
	Reverso	5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3' (SEQ ID NO: 4)
<i>TBP</i> P20226	Directo	5'-GAACATCATGGATCAGAACAACA-3' (SEQ ID NO: 5)
	Reverso	5'-ATAGGGATTCCGGGAGTCAT-3' (SEQ ID NO: 6)
<i>PTGDR</i> U31332	Directo	5'-GGCATGAGGCCCTAAAAATGAG-3' (SEQ ID NO: 7)
	Reverso	5'-CCTTGACATCCTTAAATGCTCC-3' (SEQ ID NO: 8)

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo empleando el programa SPSS versión 19.0. (Chicago, Illinois, USA) para analizar la posible asociación existente entre el nivel de expresión del gen *PTGDR* y la enfermedad alérgica. Este análisis estadístico nos permitió concluir que existe una asociación estadísticamente significativa entre el aumento de los niveles de expresión del gen *PTGDR* y la presencia del fenotipo alérgico (media de expresión en pacientes alérgicos: 0,915, media en controles no alérgicos: 0,682, $p=0,001$, poder estadístico=95%). Esta asociación se mantuvo en todos los subfenotipos de alergia observados en los pacientes que incluyen tanto sensibilización a distintos alérgenos como distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad (rinitis alérgica, asma alérgica, etc.).

Paralelamente se procedió a corroborar los resultados obtenidos mediante la determinación de los niveles de expresión del gen *PTGDR* en un modelo murino (Marqués-García F, Marcos-Vadillo E. 2016. Mouse Models Applied to the Research of Pharmacological Treatments in Asthma. *Methods Mol Biol.*1434:239-53. doi: 10.1007/978-1-4939-3652-6_17. PubMed PMID: 27300543). El grupo de investigación de los inventores ha desarrollado modelos de asma alérgica en ratón mediante la estimulación con OVA (ovoalbúmina) y el posterior tratamiento de la enfermedad con dexametasona para evaluar el comportamiento del biomarcador objeto de estudio en distintas situaciones (ratones control, ratones sensibilizados o "alérgicos", ratones no sensibilizados y ratones sensibilizados tratados con dexametasona). Tras analizar mediante PCR a tiempo real la expresión relativa del gen *PTGDR* (Table 2), se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas condiciones experimentales (Kruskal-Wallis $p=0,013$).

Tabla 2

gen	Cebador	Secuencia (SEQ ID NO:)
<i>GAPDH ratón</i>	Directo	5'-CGACTTCAACAGCAACTCCCACTCTTCC-3' (SEQ ID NO: 9)
	Reverso	5'-TGGGTGGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT-3' (SEQ ID NO: 10)
<i>PTGDR ratón</i>	Directo	5'-GACGGTCACCGACTTGCTGG-3' (SEQ ID NO: 11)
	Reverso	5'-AGCCCAAAGAAGGACATCAGGAA-3' (SEQ ID NO: 12)

Los ratones sensibilizados al igual que los pacientes alérgicos presentaron un aumento generalizado de los niveles de *PTGDR* con respecto a los de los grupos control. Al analizar el efecto de la dexametasona sobre este modelo animal se comprobó que *PTGDR* responde al tratamiento corticoideo. En este caso se observó una disminución significativa de los niveles de *PTGDR* tras el tratamiento con el dexametasona, que podría estar relacionada con el papel de los corticoides en el tratamiento de la alergia (Figura 1).

Tanto entre los dos grupos control como entre los dos grupos de ratones asmáticos, se comprobó que el tratamiento con dexametasona provocó una disminución de los niveles de *PTGDR*. Así, los ratones control tratados con dexametasona presentaron una mediana inferior, 1,02 (RI=0,89), a la mostrada por los controles no tratados, 2,17 (RI=3,24). Sin embargo, el poder estadístico en este caso fue muy bajo, del 21,5%. Finalmente, también se observó una disminución de la expresión de *PTGDR* en los ratones asmáticos y tratados con dexametasona respecto a los ratones estimulados con OVA pero que no recibieron tratamiento con el corticoide. Las medianas obtenidas fueron 36,08 (RI=26,32) frente a 84,45 (RI=77,96), respectivamente, aunque en este caso el poder estadístico fue incluso menor, del 9,3 %.

Para analizar el potencial de aplicación clínica en el diagnóstico de alergia de los niveles de expresión de *PTGDR*, se procedió a realizar una curva ROC (Figura 2) y se obtuvo un área bajo la curva de 0,654, con un IC 95 % (0,588-0,721) y un error estándar de 0,034. El análisis de dicha curva proporciona un posible punto de corte para la expresión de *PTGDR* de 0,51 para el cual se obtiene un 81,4% de sensibilidad y un 42,3% de especificidad. El valor predictivo positivo para este punto de corte es del 72% y el valor predictivo negativo del 55%. A la luz de estos resultados, se puede concluir que se ha obtenido un marcador más sensible para el diagnóstico de la sensibilidad alérgica que los existentes en la actualidad.

REIVINDICACIONES

1. Método in vitro para diagnosticar sensibilización alérgica en un sujeto que comprende
- 5 (a) cuantificar los niveles de expresión del gen que codifica el receptor de la prostaglandina D (gen PTGDR) en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, y
(b) comparar el nivel de expresión previamente obtenido con la expresión de dicho gen en una muestra control,
- 10 en donde si los niveles de expresión del gen PTGDR están incrementados con respecto a los niveles de expresión de dicho gen en la muestra control, entonces el sujeto padece sensibilidad alérgica.
2. Método para evaluar la eficacia de un tratamiento contra la alergia administrado a un sujeto que comprende
- 15 (a) cuantificar los niveles de expresión del gen PTGDR en una muestra biológica aislada de dicho sujeto antes y después de la administración del tratamiento, y
(b) comparar el nivel de expresión obtenido antes del tratamiento con el nivel de expresión obtenido después del tratamiento,
- 20 en donde un nivel de expresión del gen PTGDR después del tratamiento menor que el nivel de expresión de dicho gen antes del tratamiento, es indicativo de que el tratamiento administrado está siendo eficaz contra la alergia.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que la muestra biológica es una muestra de sangre periférica, esputo u orina.
- 25
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cuantificación de los niveles de expresión del gen PTGDR comprende la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de dicho gen, o un fragmento de dicho ARNm, el ADN complementario (ADNc) de dicho gen, o un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.
- 30
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la cuantificación de los niveles de expresión se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, un array de ADN o ARN, o RNA-Seq.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la cuantificación de los niveles de expresión del gen PTGDR comprende la cuantificación de los niveles de proteína codificada por dicho gen o un fragmento de dicha proteína.
- 5 7. método según la reivindicación 6, en el que la proteína codificada por el gen PTGDR es la proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 2.
8. Método según la reivindicación 6 o 7, en el que la cuantificación de los niveles de proteína se realiza mediante Western blot, ELISA, un array de proteínas o un estudio de binding.
- 10
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la sensibilización alérgica o alergia se selecciona del grupo que consiste en alergia al polen, alergia a los ácaros, alergia al epitelio de los animales y alergia a los hongos.
- 15
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el gen PTGDR comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad del 100% con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1.
- 20
11. Un kit para diagnosticar sensibilidad alérgica en un sujeto, o para evaluar si un tratamiento contra la alergia está siendo efectivo que comprende una pareja de cebadores que comprenden la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.
- 25
12. Uso in vitro de un kit según la reivindicación 11 para diagnosticar sensibilidad alérgica en un sujeto, o para evaluar si un tratamiento contra la alergia está siendo efectivo
- 30
13. Uso según la reivindicación 12, en donde la sensibilización alérgica o alergia se selecciona del grupo que consiste en alergia al polen, alergia a los ácaros, alergia al epitelio de los animales y alergia a los hongos.

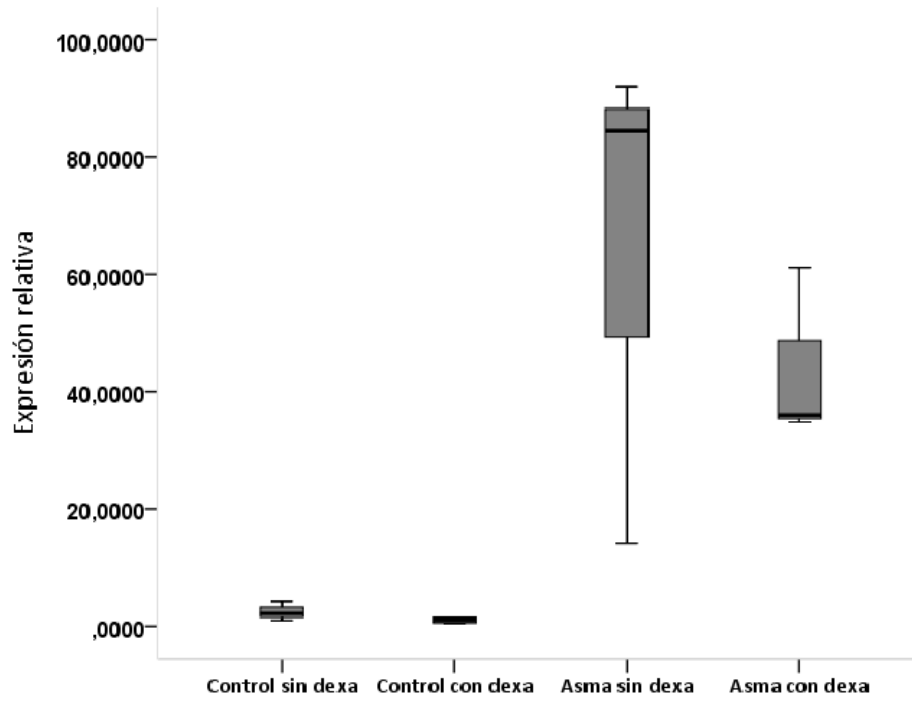


FIG. 1

Curva ROC

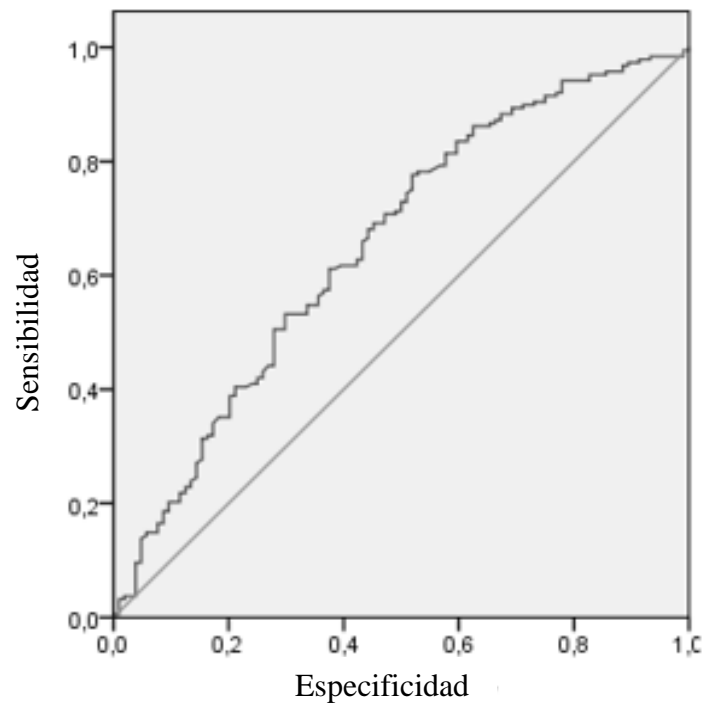


FIG. 2



- ②① N.º solicitud: 201631690
②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.12.2016
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	San Segundo Val, Ignacio. EL GEN <i>PTGDR</i> EN LA ALERGIA: ESTUDIO DE GENOTIPADO Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA. Tesis doctoral. Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico. Universidad de Salamanca, 2015 [en línea][Recuperado el 15/11/2017]. Recuperado de Internet <URL: https://gredos.usal.es/jspui/handle/10366/128805 >. (todo el documento)	1-13
X	Fernández Parra, Beatriz. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES; <i>PTGDR</i> , <i>LTC4S</i> Y <i>CYSLTR1</i> EN PACIENTES CON RINITIS ALÉRGICA POR HIPERSENSIBILIDAD A PÓLENES. Tesis doctoral. Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico. Universidad de Salamanca, 2015 [en línea][Recuperado el 15/11/2017]. Recuperado de Internet <URL: https://gredos.usal.es/jspui/handle/10366/129325 >. (todo el documento)	1-13
X	Isidoro-García, M. et al. <i>PTGDR</i> GENE IN ASTHMA: A FUNCTIONAL, GENETIC, AND EPIGENETIC STUDY. Allergy, 2011, Vol. 66, Páginas 1553-1562 (todo el documento)	1-13
X	Davila I. J. et al. THE TCCTG HAPLOTYPE (-613C>T, -549T>C, -441C>T, -197T>C AND -95G>T) OF <i>PTGDR</i> GENE IS ASSOCIATED WITH ALLERGIC SENSITIZATION. J Allergy Clin Immunol, 02/2011, Vol. 127, N° 2, Supplement, Páginas AB5 (todo el documento)	1-13

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
20.11.2017

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201631690

②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.12.2016

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 02/081628 A2 (RIBOZYME PHARM INC) 17/10/2002, (todo el documento)	1-13
A	WO 2014/113814 A1 (ALLERGAN INC) 24/07/2014, (todo el documento)	1-13

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
20.11.2017

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
2/6

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.11.2017

Declaración

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

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	San Segundo Val, Ignacio. EL GEN <i>PTGDR</i> EN LA ALERGIA: ESTUDIO DE GENOTIPADO Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA. Tesis doctoral. Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico. Universidad de Salamanca	2015
D02	Fernández Parra, Beatriz. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES; <i>PTGDR</i> , <i>LTC4S</i> Y <i>CYSLTR1</i> EN PACIENTES CON RINITIS ALÉRGICA POR HIPERSENSIBILIDAD A PÓLENES. Tesis doctoral. Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico. Universidad de Salamanca	2015
D03	Isidoro-García, M. et al. <i>Allergy</i> , Vol. 66, Páginas 1553-1562	2011
D04	Davila I. J. et al. <i>J Allergy Clin Immunol</i> , Vol. 127, Nº 2, Supplement, Páginas AB5	02/2011
D05	WO 02/081628 A2	17.10.2002
D06	WO 2014/113814 A1	24.07.2014

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

D01 afirma que se observa un claro incremento en los niveles de expresión de *PTGDR* en los pacientes alérgicos.

D02 expone que el gen *PTGDR* es responsable de algunas de las funciones efectoras de PGD2 en asma y otras afecciones relacionadas, como rinitis alérgica y dermatitis atópica.

D03 explica que PGD2 es el metabolito del ácido araquidónico que se produce de forma más abundante en respuesta a los alérgenos ambientales.

D04 evalúa la posible asociación entre el gen *PTGDR* y la sensibilización alérgica.

D05 anticipa composiciones, así como métodos para el diagnóstico y tratamiento, de condiciones relacionadas con los niveles de factores involucrados en los procesos alérgicos, como es el receptor *PTGDR*.

D06 divulga compuestos que son antagonistas de *PTGDR* y su uso en el tratamiento de los procesos alérgicos.

NOVEDAD (ART. 6.1 LP 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (ART. 8.1 LP11/1986)

D01 afirma que se observa un claro incremento en los niveles de expresión de *PTGDR* en los pacientes alérgicos, diferencias que se mantenían tanto para el caso de la monosensibilización como de la polisensibilización. Demuestra que la elevación de los niveles del ARNm de *PTGDR* en los pacientes se observa en todos los patrones de sensibilización, si bien los niveles parecen ser superiores en los pacientes alérgicos exclusivamente a pólenes y, además, aunque se ha identificado una asociación de los polimorfismos 1289G>A, -1122T>C y -549T>C del gen *PTGDR* y la enfermedad alérgica, dicha asociación es menos intensa que la asociación con los niveles de expresión del gen. Así mismo, indica que la determinación de los niveles de expresión del gen *PTGDR* podría constituir un marcador biológico de la enfermedad, al ser un marcador sanguíneo con una buena sensibilidad y por su valor predictivo positivo.

D02 expone que el gen *PTGDR* es responsable de algunas de las funciones efectoras de PGD2 en asma y otras afecciones relacionadas, como rinitis alérgica y dermatitis atópica, y que los SNP -197T>C y -613C>T se asocian significativamente con el asma alérgica y con la alergia al polen y a los ácaros, respectivamente. Establece que el polimorfismo -197T>C se asocia con la rinitis alérgica por hipersensibilización a pólenes, en concreto con la polisensibilización, mientras que el polimorfismo -441 se asocia con la monosensibilización. Las asociaciones detectadas permiten identificar un aumento en el riesgo de padecer rinitis alérgica con sensibilización a pólenes en los individuos portadores de algunas variantes génicas en la región promotora del gen *PTGDR*. Este riesgo podría ser debido a las modificaciones que las variantes polimórficas inducen en la unión de los factores de transcripción determinantes de la expresión del gen *PTGDR*, lo que refuerza la propuesta de esta región promotora como posible diana terapéutica.

D03 explica que PGD2 es el metabolito del ácido araquidónico que se produce de forma más abundante en respuesta a los alérgenos ambientales, de modo que la exposición a alérgenos incrementa la producción de PGD2 en los pacientes alérgicos, ejerciendo sus funciones a través de dos receptores específicos: PTGDR y DP. El objetivo de este estudio es desarrollar un enfoque holístico, que incluya el análisis genético, epigenético y de expresión para estudiar el gen del receptor de prostaglandina D2 (*PTGDR*) en pacientes asmáticos. Los resultados demuestran que los polimorfismos 197T>C y 613C>T están significativamente asociados con el asma alérgica y con la alergia al polen y a los ácaros, respectivamente. Considerando los cuatro polimorfismos estudiados, la asociación con la alergia al polen y a los ácaros fue observada también para haplotipo y diplotipo. Así mismo, menciona que se está considerando a los antagonistas de PTGDR en el tratamiento de la alergia en aquellos individuos que tienen sobreexpresado el gen *PTGDR*.

D04 evalúa la posible asociación entre el gen *PTGDR* y la sensibilización alérgica. Encuentra que el haplotipo TCCTG está significativamente asociado con la alergia al polen y a los ácaros y, así mismo, que el haplotipo CCT podría determinar una alta expresión de *PTGDR*. También describe la combinación de SNPs asociada a la sensibilización alérgica.

D05 anticipa composiciones, así como métodos para el diagnóstico y tratamiento de condiciones relacionadas con los niveles de factores involucrados en los procesos alérgicos, como es el receptor PTGDR. Dichas composiciones pueden comprender moléculas de ácido nucleico, por ejemplo siRNA, cuyo fin es disminuir o inhibir la expresión del gen que codifica el receptor *PTGDR* y así tratar tales enfermedades alérgicas. Las moléculas de ácido nucleico divulgadas también pueden utilizarse para llevar a cabo ensayos con el fin de realizar el diagnóstico de la enfermedades mencionadas.

Los documentos citados anticipan todas las características de las reivindicaciones 1 a 10 y, por tanto, dichas reivindicaciones no son nuevas ni presentan actividad inventiva. Respecto a las reivindicaciones 11 a 13, el objeto de las mismas es anticipado en el documento D01 en el cual se divulgan las secuencias SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 utilizadas para estudiar la expresión de *PTGDR* y que son objeto de la presente solicitud (Tabla 14, página 78 del documento), por lo que dichas reivindicaciones 11 a 13 carecen de novedad y, por tanto, no presentan actividad inventiva. Respecto a los documentos D02-D05, afectarían a la actividad inventiva de dichas reivindicaciones 11 a 13.