

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 027 732**

21 Número de solicitud: 202331044

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

C12Q 1/6851 (2008.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

15.12.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.06.2025

71 Solicitantes:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (84.50%)

Avenida de la Constitución 18

41071 Sevilla (Sevilla) ES y

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (15.50%)

72 Inventor/es:

GARCÍA ARANDA, Marilina;

REDONDO BAUTISTA, Maximino;

BARRAGÁN MALLOFRET, María Isabel y

MARTÍNEZ GÁLVEZ, Beatriz

74 Agente/Representante:

SAN MARTÍN ALARCIA, Esther

Observaciones:

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

54 Título: ***KLRB1* como biomarcador de pronóstico en pacientes con COVID-19**

57 Resumen:

Uso in vitro de los niveles de expresión de *KLRB1*, en muestras previamente aisladas de la mucosa nasofaríngea, como biomarcador para predecir y/o pronosticar la evolución de pacientes con COVID-19.

ES 3 027 732 A1

DESCRIPCIÓN

***KLRB1* como biomarcador de pronóstico en pacientes con COVID-19**

CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se enmarca en el campo de la Medicina y concretamente en la
5 previsión de la evolución de pacientes con COVID-19 y el pronóstico del deterioro clínico o el fallecimiento de estos, de forma que sea posible identificar a los distintos grupos de pacientes en función de su riesgo y así anticipar sus necesidades clínicas. En concreto se basa en el uso de biomarcadores génicos para la identificación de los distintos grupos de pacientes en función de su pronóstico.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La pandemia de la Enfermedad por Coronavirus 2019 (COVID-19) causada por el
Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2) ha provocado una
crisis sanitaria, social y económica sin precedentes en todo el mundo. La mayoría de los
pacientes sintomáticos presentaban una infección leve (40%) o moderada (40%) de las vías
15 respiratorias, caracterizada por fiebre, tos, fatiga y pérdida del gusto y el olfato; el 15% desarrolló enfermedades graves que requirieron soporte de oxígeno, y el 5% experimentó una enfermedad crítica potencialmente mortal con complicaciones como sepsis shock séptico, tromboembolismo, fallo multiorgánico, linfopenia y síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) causado por niveles elevados de citoquinas proinflamatorias, también
20 conocido como síndrome de tormenta de citoquinas, que representa una de las principales causas de muerte de los pacientes.

Uno de los problemas fundamentales de la pandemia de COVID-19 ha estado determinado por el alto porcentaje de pacientes infectados por SARS-CoV-2 que presentaban deterioro clínico rápido y que les hacía necesitar cuidados en unidades de críticos. En un esfuerzo por
25 gestionar mejor los recursos económicos y humanos, se ha hecho hincapié en estratificar a los pacientes con SARS-CoV-2 en función de los factores de riesgo que los predisponen a resultados adversos como la hospitalización, el ingreso en la unidad de cuidados intensivos (UCI), la necesidad de asistencia ventilatoria o la muerte.

Numerosas pruebas respaldan que las personas de edad avanzada, en particular las que
30 padecen afecciones médicas subyacentes, se enfrentan a un mayor riesgo de sufrir manifestaciones graves de COVID-19. El sexo biológico, la presencia de andrógenos en los varones, las enfermedades respiratorias preexistentes y diferentes comorbilidades como la

enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la dislipidemia, la hipertensión, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, la obesidad y la insuficiencia cardíaca también se han identificado como factores de riesgo de resultados adversos, incluida la mortalidad hospitalaria y el ingreso en la UCI. Otros predictores de deterioro clínico propuestos incluyen
5 la presión arterial de oxígeno, los niveles de marcadores de inflamación (procalcitonina, lactato deshidrogenasa, proteína C reactiva), las alteraciones del hemograma, el hábito tabáquico, el estado inflamatorio y polimorfismos genéticos de un solo nucleótido, aunque ninguno de ellos se ha validado aún como biomarcador para predecir el pronóstico de los pacientes hospitalizados con COVID-19.

- 10 Por tanto, existe controversia a la hora de determinar cuáles son los mejores predictores de deterioro clínico de los pacientes con COVID-19.

En este sentido, no se han validado hasta la fecha biomarcadores pronósticos génicos que estén relacionados con el deterioro clínico y el fallecimiento del paciente, por lo que existe gran interés en identificar biomarcadores para este fin.

- 15 Un estudio basado en una pequeña cohorte de 37 pacientes ha propuesto como una estrategia potencial para monitorizar a los pacientes hospitalizados y discriminar a aquellos en riesgo de progresión de la enfermedad la presencia de características inflamatorias de las células Natural Killer (NK) en casos graves de COVID-19, particularmente durante las fases iniciales de la enfermedad. Niveles elevados de interferón gamma (IFN- γ), interleucina
20 IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) determinados mediante ELISA en el plasma, se han propuesto como biomarcadores asociados a la tormenta de citocinas y a una peor respuesta frente a inmunomoduladores o fármacos de precisión [1].

- Los niveles elevados de IL-17 en la saliva determinados mediante ELISA también se han propuesto como un biomarcador potencial para identificar a los individuos en riesgo de
25 desarrollar COVID-19 grave, dada su asociación con la gravedad de la enfermedad, incluida la necesidad de ventilación mecánica y el aumento del riesgo de muerte en 29 días [2].

- Teniendo en cuenta que la principal vía de transmisión del SARS-CoV-2 es la aérea, y su impacto primario en las mucosas del tracto respiratorio superior, diferentes estudios han destacado la importancia de la inmunidad local de las mucosas para limitar la patología
30 vírica a la nasofaringe en individuos asintomáticos o con síntomas leves-moderados, sugiriendo que la alteración de la inmunidad antivírica en el epitelio nasal contribuye a la COVID-19 grave [3].

La mucosa nasal está formada principalmente tanto por células epiteliales como por distintas poblaciones de células inmunitarias residentes, predominantemente células T, en particular células CD8+ que expresan el ligando 5 de la quimiocina con motivo C-C (CCL5), interferón-gamma (INF- γ), factor de necrosis tumoral (TNF), perforina, granzimas y receptores de tipo 5 killer implicados en la función efectora de las células T y en la actividad antiviral.

Cabe destacar que las muestras nasales de individuos hospitalizados con COVID-19 aguda muestran un aumento de células Natural Killer (NK), granulocitos, monocitos, células efectoras CD4+T y CD11c+ [4], lo que pone de relieve el impacto de la infección por SARS-CoV-2 en la inmunidad nasal y la importancia de estas células durante la infección.

10 Aunque estudios anteriores han examinado las diferencias en la expresión génica durante la respuesta del huésped utilizando perfiles de secuenciación de ARN shotgun de hisopos nasofaríngeos [5], y observado la presencia de genes con expresión desregulada en pacientes con COVID-19, hasta la fecha no se ha propuesto utilizar la expresión génica como biomarcador de pronóstico de la evolución de la enfermedad en pacientes ya 15 infectados.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Como fruto del estudio de la expresión del ARN mensajero (ARNm) de diferentes genes asociados a la respuesta inflamatoria e inmunitaria en la mucosa nasal, la presente invención propone un método no invasivo para pronosticar el deterioro clínico de los 20 pacientes con COVID-19 que puede suponer la derivación del paciente a la unidad de cuidados intensivos, o su fallecimiento. Este método además permite obtener los resultados de forma rápida y asequible dado que la metodología para llevar a cabo la medición de estos niveles de expresión se basa en la PCR de transcripción inversa (RT-PCR), técnica de referencia en el diagnóstico de la COVID-19 y que, a diferencia de otras metodologías como 25 ELISA o RNAseq, está ampliamente implantada en el sector sanitario.

Concretamente, la invención se basa en la utilización de los niveles de expresión relativa del ARNm del gen *KLRB1* (Killer Cell Lectin-Like Receptor B1) en el exudado nasofaríngeo como biomarcador pronóstico de dicho deterioro clínico.

El gen *KLRB1*, también conocido como *CD161*, *CLEC5B*, *hNKR-PIA*, *NKR*, *NKR-P1* o *NKR-30 P1A*, codifica la glicoproteína transmembrana de clase II CD161, miembro de la superfamilia de lectinas dependientes de iones de calcio (Ca⁺²) (tipo C). Esta lectina desempeña un papel crucial en los procesos de reconocimiento de célula a célula mediante la unión a epítomos de carbohidratos virales específicos, como Gal-alfa/1,3Gal (alfa-Gal), presente en

el escudo de glicanos del SARS-CoV-2, y la N-acetil lactosamina (LAcNAc, o epítipo CD75), aumentando así la capacidad de las células inmunitarias para limitar eficazmente la infección por dicho virus [6]. Tanto gen *KLRB1* como su producto, se expresan principalmente en las células NK, las células T CD4+ con memoria, incluidas las células T helper 17 (Th17), las células T invariantes asociadas a la mucosa (MAIT) y las CD8+ no MAIT [7,8].

Se cree que las células NK presentes en las secreciones nasales desempeñan un papel importante en la inmunidad de las mucosas, contribuyendo a la regulación de las infecciones víricas respiratorias en individuos con una función respiratoria normal y afecciones respiratorias preexistentes [9]. Las células NK producen rápidamente citocinas inmunomoduladoras como el IFN- γ y las interleucinas IL-17 e IL-6 tras la estimulación de su receptor de células T (TCR), lo que contribuye tanto a la regulación de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa, como a la lisis directa de las células infectadas diana mediante la secreción de perforina y granzimas durante las primeras fases de la enfermedad.

Aunque las células NK CD161+ constituyen un **subconjunto de células NK proinflamatorias** eficaz para limitar la infección por SARS-CoV-2, **se ha informado de que la expresión de CD161 actúa como receptor inactivador de la citotoxicidad de las células NK** [6].

Estudios recientes han puesto de relieve **el impacto del SARS-CoV-2 en las células NK, comprometiendo su eficacia antiviral**, alterando su interacción con otros componentes del sistema inmunitario innato y **desencadenando la tormenta de citocinas responsable de los síntomas COVID-19 graves** durante la progresión de la enfermedad [10]. En particular, los pacientes con COVID-19 grave presentan una desregulación inmunitaria significativa caracterizada por un **recuento reducido de células NK en plasma sanguíneo que además presentan una función y actividad citolítica comprometidas** [11], lo que contribuye a una disminución más lenta de la carga viral [12], y se asocia a daños tisulares e inmunopatología que conducen a un deterioro clínico [13], en contraste con los individuos sanos con un recuento normal de células NK.

Cada vez hay más pruebas a este respecto que revelan que **la infección por SARS-CoV-2 en las células infectadas puede aumentar la regulación de la transcripción tipo lectina 1 (LLT1), ligando del receptor CD161/KLRB1** codificado por el gen de la familia 2 de dominios de lectina de tipo C miembro D (*CLEC2D*) [6,14]. **LLT1 actúa como un ligando inhibidor del receptor CD161 en las células NK, lo que resulta en la inhibición de la**

citotoxicidad de las células NK y la secreción de IFN- γ [15,16] a través de la activación de las esfingomielinasas y la generación de N-acil-esfingosina (ceramida), un segundo mensajero con funciones en la apoptosis, la proliferación y la diferenciación [17], lo que puede explicar la alteración de la función de las células NK observada durante la infección por SARS-CoV-2.

Por tanto, no se trata tanto de que la infección por SARS-CoV-2 reduzca la expresión de la proteína CD161 en las células NK si no de que el virus induce un aumento de la expresión de su receptor LLT1 en las células epiteliales infectadas, lo que inhibe la acción de las células NK al unirse a CD161, resultando finalmente en la inhibición de la citotoxicidad de las células NK.

Aparte de su papel como receptor inactivador de la citotoxicidad de las células NK [18], la proteína **CD161/KLRB1 puede exhibir una función activadora en otras células inmunitarias dependiendo del tipo celular específico implicado**, como en el caso de la interacción de CD161/KLRB1 y LLT1/CLEC2D junto con el receptor de células T (TCR) [19].

Por tanto, el papel de la expresión de la proteína CD161 en los distintos tipos celulares resulta contradictorio.

La proteína LLT1/CLEC2D se expresa en linfocitos B y T activados, monocitos y células dendríticas, y su expresión puede ser inducida en células presentadoras de antígeno por IFN- γ y en células B tras una infección viral como el virus de Epstein-Barr o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [20].

La señalización CD161/KLRB1 promueve la proliferación de células T, la producción de IFN- γ [20] y la activación Th17, contribuyendo así a la expansión de las células T [19]. Además, CD161/KLRB1 se relaciona sistemáticamente con un fenotipo de memoria en diversas poblaciones de células T de la circulación adulta [21], incluidas las células T gamma-delta (células T $\gamma\delta$), que sirven de puente entre los sistemas inmunitarios innato y adaptativo. Estas células T $\gamma\delta$ desempeñan un papel en la activación de la proteína quinasa B (PKB/AKT1) y la proteína ribosomal S6 quinasa alfa-1 (RPS6KA1/RSK1), lo que conduce a una mayor proliferación de células T en respuesta a la estimulación CD3 [16]. La importancia de las células T en el contexto de la infección por SARS-CoV-2 se ve subrayada por la disminución de los recuentos de células T CD3+, CD4 y CD8+ en los casos moderados y graves de COVID-19 [22] y la fuerte activación de las células T y las respuestas inmunitarias adaptativas inducidas por las vacunas COVID-19, que han

desempeñado un papel fundamental en la determinación del resultado clínico, la eficacia de la vacuna y el control del virus [23].

Cabe señalar que estudios previos que han analizado la respuesta inmunitaria adaptativa inducida por las vacunas COVID-19 han observado que la respuesta específica de los
5 linfocitos T frente a SARS-CoV-2, estimulada por la vacuna, está asociada positivamente con el porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ que expresan CD161 y una reducción del porcentaje de linfocitos T CD8+CD161+ en sangre periférica en pacientes con COVID-19 severo [24]. También se ha valorado como afecta la vacunación a la población de linfocitos T de la mucosa nasal, observándose un aumento de linfocitos T CD4+CD161+CCR6+ y Trm
10 CD8+ tras la administración de las dos dosis de la vacuna BTN162b2 desarrollada por Pfizer-BioNTech [25].

Así pues, **un aumento de los niveles de expresión de CD161 en los distintos tipos celulares puede resultar bien en la activación o bien en la inactivación de dichas células inmunitarias dependiendo del tipo celular específico implicado, ya que esta**
15 **proteína puede actuar como receptor inactivador (como en células NK) o como activador (como en los linfocitos T).**

En la presente invención ha sido objeto de estudio el nivel de expresión de *KLRB1* en la mucosa nasofaríngea, como variable independiente del estado de vacunación y otros factores, como predictor de la evolución de pacientes con COVID-19.

20 Primeramente, cabe destacar que el objeto de la presente invención es el **estudio del nivel de expresión de *KLRB1* medido como ARNm** y no como la traducción a la proteína CD161. Si bien puede suponerse una relación entre ambos productos del gen *KLRB1*, la utilidad del nivel de expresión de ARNm para determinar la abundancia relativa de proteínas es en la actualidad controvertida y está insuficientemente validada [26].

25 Una de las cuestiones que se debe tener en cuenta en este sentido, y también a la hora de valorar los resultados obtenidos, es que los análisis de los niveles de proteína realizados hasta la fecha se centraban en la expresión de la proteína CD161 en células concretas del sistema inmune, mientras que en la presente invención los niveles de expresión, en este caso ARNm, no se limitan a una población concreta de células del sistema inmune sino que
30 se miden en una muestra compleja como es el exudado obtenido de la mucosa nasofaríngea, formada por tanto por células epiteliales como por distintas poblaciones de células inmunitarias residentes. Así pues, se mide el nivel de expresión de ARNm de *KLRB1* en el total de la muestra aislada y no en una población celular en concreto. En los estudios

previos anteriormente citados se han utilizado técnicas de citometría de flujo que permiten la caracterización de las células inmunitarias, bien de la sangre periférica [24] o bien de la mucosa [25], en función de la expresión de CD161. Por el contrario, la presente invención mide el ARNm total expresado en la mucosa nasofaríngea. Es ese valor total de expresión el
 5 que se propone como biomarcador predictivo de la evolución de la enfermedad en pacientes con COVID-19. Cabe recordar que esta mucosa constituye la primera barrera con la que se encuentra el virus SARS-CoV-2 a la hora de penetrar en el cuerpo del individuo.

A pesar de las complejas interacciones entre la inmunidad innata y adaptativa, otra cuestión a considerar es que las medidas de los niveles de expresión de este marcador génico
 10 tomadas en muestras aisladas de mucosa nasofaríngea dan cuenta de la inmunidad innata temprana del individuo, al ser ésta la primera línea de defensa contra los patógenos inhalados, mientras que los valores de expresión de marcadores génicos medidos en sangre periférica ofrecen una información más amplia de la respuesta inmune adaptativa, más tardía y que incluye células T y B, y que se produce como resultado a la exposición al virus o
 15 vacunas. Por tanto, los valores de expresión de marcadores génicos en células inmunitarias de la sangre periférica no tienen por qué corresponderse con los que se detectan en muestras aisladas de la mucosa nasofaríngea.

La relevancia de los niveles de expresión de ARNm de *KLRB1* en la mucosa para dar cuenta de la inmunidad innata de los individuos de forma previa a su contacto con el virus se
 20 hace evidente en la cohorte de descubrimiento, donde ninguno de los pacientes había sido vacunado, y se ve respaldada por los datos de la cohorte de validación que incluye tanto a pacientes vacunados como no vacunados. Aunque en análisis univariante se observa una asociación entre los niveles de expresión de ARNm de *KLRB1* detectados en las muestras obtenidas de la mucosa y el estado de vacunación del individuo (**Tabla 5**), solo el nivel de
 25 expresión del ARNm de *KLRB1* explica de forma independiente el pronóstico de los pacientes, tal y como se muestra más adelante en el análisis multivariante realizado (**Tabla 6**). Es decir, el nivel de expresión del ARNm de *KLRB1* es un biomarcador indicador del pronóstico de la evolución de pacientes con COVID-19, reflejo de inmunidad innata el individuo, que si bien puede ver aumentada su expresión tras la exposición al virus
 30 (vacunación), no depende del estado de vacunación a la hora de determinar su valor pronóstico.

A la luz de los resultados de la presente invención, **la mayor expresión del gen *KLRB1* en muestras de exudado nasofaríngeo obtenidas mediante hisopado** se interpreta como un

factor protector frente al deterioro clínico o la muerte en pacientes hospitalizados con COVID-19 (**Tabla 3**).

Los resultados se basan en dos cohortes independientes como ya hemos mencionado:

I) Cohorte descubrimiento: 149 pacientes hospitalizados con COVID-19 durante 2020 en el Hospital Costa del Sol de Marbella, abarcando la primera, segunda, tercera y cuarta ola de la pandemia, antes de la comercialización de las primeras vacunas. Se realizó un estudio observacional prospectivo de la expresión de un panel de 594 genes relacionados con la respuesta inflamatoria e inmune a partir de exudados nasofaríngeos procedentes de los excedentes diagnósticos de pacientes ingresados por SARS-CoV-2 utilizando la plataforma nCounter de NanoString®, la cual ofrece lecturas multiplexadas a tiempo real de gran sensibilidad, reproducibilidad y robustez técnica. El estudio de expresión diferencial entre los pacientes con resultado final alta vs ingreso en UCI/*exitus* realizado con el software nCounter integrado en la propia plataforma, dio como resultado la identificación de 4 genes con expresión diferencial candidatos a biomarcadores de pronóstico: *KLRAP1*, *KLRB1*, *IRF8*, *TCF4* (**Tabla 1**). El análisis estadístico convencional reveló únicamente la expresión del gen *KLRB1* como biomarcador pronóstico independiente (**Tabla 3**).

II) Cohorte validación: 168 pacientes hospitalizados en el Hospital Costa del Sol de Marbella durante el año 2022, y que incluyó a 87 pacientes no vacunados y 81 pacientes vacunados. Se realizó un estudio observacional prospectivo de la expresión relativa del gen *KLRB1* y del gen de referencia *GAPDH* basada en el valor Ct (abreviatura del término en inglés *cycle threshold*), que indica el ciclo de la prueba RT-PCR a partir del cual se comienza a detectar fluorescencia, por lo que ciclos de Ct menores se asocian a mayores cantidades de material genético. Posteriormente se obtuvo el correspondiente valor de variación relativa de la expresión de *KLRB1* en cada una de las muestras, con respecto al gen de referencia (ΔCt).

El análisis de regresión lineal bivalente (**Tabla 5**) reveló una asociación significativa entre la expresión relativa del gen *KLRB1* con respecto al gen de referencia *GAPDH* (ΔCt) tanto con el estado de vacunación ($p=0,001$), como con el deterioro clínico del paciente (ingreso en UCI o fallecimiento) ($p=0,035$). No se observó correlación alguna con el sexo biológico del paciente, la edad, el hábito tabáquico o la comorbilidad.

Sin embargo, el análisis de regresión logística multivariante posterior confirmó que ***KLRB1* ΔCt** ($p=0,039$, OR 1,135, IC 1.006-1.280) **y la edad** ($p=0,015$, OR 1,033, IC 1.006-1.061) **son los únicos factores pronósticos independientes para el ingreso en la unidad de cuidados intensivos o la muerte (Tabla 6)**, quedando descartados otros factores

estudiados y variables que en la bibliografía existente se han relacionado con el peor pronóstico de los pacientes con COVID-19, como la pluripatología, el estado vacunal, el hábito tabáquico y el sexo biológico, así como el resto de genes identificados inicialmente como candidatos.

- 5 Estos resultados, en concreto el valor 1,135 del OR del análisis (Odds Ratio o proporción de probabilidades) se traduce en que por cada **unidad de incremento de ΔCt , el riesgo de mala evolución aumenta en un 13,5%**. Cabe señalar que valores de OR por encima de 1 indican que hay una asociación entre las variables, siendo ésta más fuerte a mayor número.

Uno de los puntos fuertes del presente estudio es el uso de una cohorte inicial de casos
10 confirmados de COVID-19 durante las primeras fases de la pandemia, cuando predominaban las variantes *Alfa* y *Beta* y antes de que estuvieran disponibles las primeras vacunas, así como de una cohorte de validación independiente formada por pacientes reclutados durante la prevalencia de la variante *Omicron*, y que incluye tanto a pacientes vacunados como no vacunados.

- 15 Por otro lado, además de examinar los antecedentes médicos de los pacientes, el estudio ha tenido en cuenta otros posibles factores con un impacto negativo sobre la función de la mucosa nasal, la función citotóxica de las células NK y la susceptibilidad a los virus respiratorios como el tabaquismo, la comorbilidad o la edad avanzada.

Un **primer aspecto** de la invención describe el uso *in vitro* del nivel de expresión del ARNm
20 del gen *KLRB1*, en muestras previamente aisladas de la mucosa nasofaríngea, como biomarcador para predecir y/o pronosticar la evolución de pacientes con COVID-19.

En el contexto de la presente invención, ***KLRB1*** se define como las moléculas de ácido nucleico de secuencia **SEQ ID NO: 2**, que corresponde a la secuencia de referencia NCBI: 3820.

- 25 ***KLRB1*** se define también como las moléculas de ácido nucleico que se transcriben en la secuencia de ARNm **SEQ ID NO:1**, que corresponde a la secuencia de referencia NCBI: NM_002258.3.

ccttttgctg attttgcctc acagaattga gagtttgctc ttacacacaa gtttaatgcc accttctct gtctgccatg
gaccaacaag caatatatgc tgagttaaag ttaccacag actcaggccc agaaagtct tcacctcat ctcttctcg
30 ggatgtctgt caggggtcac ctggcatca attgccctg aaacttagct gtgctgggat tattctcctt gtcttggtg
ttactgggtt gagtggttca gtgacatcct taatacagaa atcatcaata gaaaaatgca gtgtggacat tcaacagagc
aggaataaaa caacagagag accgggtctc ttaaactgcc caatatattg gcagcaactc cgagagaaat gcttggtatt

ttctcacact gtcaaccctt ggaataacag tctagctgat tgtccacca aagaatccag cctgctgctt attcgagata
 aggatgaatt gatacacaca cagaacctga tacgtgacaa agcaattctg tttggattg gattaaatt ttattatca
 gaaaagaact ggaagtggat aaacggctct ttttaaatt ctaatgactt agaaattaga ggtgatgcta aagaaaacag
 ctgtatttcc atctcacaga catctgtgta ttctgagtag ttagtagac aaatcagatg gatctgccaa aaagaactaa
 5 cacctgtgag aaataaagtg tatcctgact ctgactatg aatcccatct caatttattt gcttccatt actgatctct
 gtactgttag ctgcacatac tattggtact acctaatagt gccacattta gtggcacaaa gtgaacaatt ctgagaattg
 acaactgtta tgaatcttac agaagttcat gttatcata ttattctat taaatgagga aacagagaca tagagaaaaa
 cgtgcatcgt ttaaagaaa cagtgatatt ctatggtgaa ggagtgaagg atgtccccga atatgccaga ttggtatatg
 attgtttgt gttaaaaca gtggagaaat ttagattca gaaagggaga gctgacctgt ctctccgc acgcggcaag
 10 ccgtgaagat tcctctggga gggctatccg agtcatacaa gggcaagaaa atagcttta tcgccagaga cctggaattg
 gatctgcaa tgaacctgaa taaagatact taataaacac ctatcttca cctattttac agccccgc aaccaatata
 tctcctagtg actccttag aaaatttatt gccctagcc agctttct catcctgtca tttctttca aattatcat tcttggtcta
 aaaagcataa aagcatcttg ctaggccac ttctatggat ttactctct tgcgagttcc tcatgtacat gcaaaacgaa
 taaaatgtgt atactttat ttgttca

15 Las muestras sobre las cuales se determina el nivel de expresión de *KLRB1* son aisladas de la mucosa nasofaríngea, un método mínimamente invasivo, rápido e indoloro. Dado que de forma rutinaria el diagnóstico de las infecciones por SARS-CoV-2 se realiza mediante pruebas que hacen uso de este tipo de muestras, cabe incluir en los protocolos hospitalarios y guías clínicas, el análisis de expresión del biomarcador *KLRB1* de forma simultánea a la
 20 prueba diagnóstica de referencia de forma que, además del diagnóstico de la enfermedad, se pueda obtener un pronóstico de la evolución de la misma en el mismo momento del ingreso hospitalario del paciente.

Según se deriva de los resultados que se describen más adelante en los ejemplos de realización de la invención, **la menor expresión de *KLRB1* se correlaciona con el**
 25 **deterioro clínico de los pacientes con COVID-19.**

En una realización preferida de la invención la determinación del nivel de expresión de *KLRB1* es relativo y se calcula como ***KLRB1* ΔCt**, siendo este el valor que resulta de la diferencia en los valores del Ct o umbral de ciclo para el gen *KLRB1* y un gen de referencia.

Entre los genes de referencia se pueden utilizar cualquiera de los siguientes genes incluidos
 30 en el panel nCounter: *B2M*, *ABCF1*, *ALAS1*, *EEF1G*, *G6PD*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1*, *OAZ1*, *POLR1B*, *POLR2A*, *PPIA*, *RPL19*, *SDHA*, *TBP*, *TUBB* y *GAPDH1*.

En una realización preferida de la invención, el gen de referencia es ***GAPDH1***.

Según se deriva de los resultados que se describen más adelante en los ejemplos de realización de la invención, **valores aumentados de *KLRB1* Δ Ct, indicativos de una menor expresión del gen, se correlacionan con el deterioro clínico de los pacientes con COVID-19.**

- 5 Un **segundo aspecto** de la invención describe un método *in vitro* de obtención de datos útiles para predecir y/o pronosticar la evolución de un paciente con COVID-19 que comprende medir el nivel de expresión de *KLRB1* en una muestra previamente aislada de la mucosa nasofaríngea del paciente. Preferiblemente, comprende además comparar el valor obtenido con el de una muestra de referencia obtenida de pacientes con COVID-19 que
10 finalmente han obtenido el alta y no han requerido ingreso en la unidad de cuidados intensivos.

En una realización preferida de la invención, el nivel de expresión de *KLRB1* se mide como *KLRB1* Δ Ct de forma relativa en relación con un gen de referencia, siendo preferentemente el gen de referencia *GAPDH*.

- 15 Un **tercer aspecto** de la invención describe método *in vitro* para predecir y/o pronosticar la evolución de un paciente con COVID-19 que comprende:

- a) medir el nivel de expresión relativa de *KLRB1* en una muestra previamente aislada de la mucosa nasofaríngea del paciente,
- b) comparar el valor obtenido con el de una muestra de referencia obtenida de
20 pacientes con COVID-19 que finalmente han obtenido el alta y que no han requerido ingreso en la unidad de cuidados intensivos, y
- c) clasificar al paciente en el grupo de pacientes que va a presentar deterioro clínico cuando el nivel de *KLRB1* se encuentra diferencialmente infraexpresado respecto a la muestra de referencia.

- 25 En una realización preferida de la invención, el nivel de expresión de *KLRB1* se mide como *KLRB1* Δ Ct de forma relativa en relación con un gen de referencia, siendo preferentemente el gen de referencia *GAPDH* y se clasifica al paciente en el grupo de pacientes que va a presentar deterioro clínico cuando el nivel de *KLRB1* Δ Ct se encuentra aumentado con respecto a la muestra de referencia.

- 30 En la presente invención se entiende por "pronóstico" la evolución esperada de una enfermedad y se refiere a la valoración de la probabilidad según la cual un sujeto padece

una enfermedad, así como a la valoración de su inicio, estado de desarrollo, evolución, o de su regresión, y/o el pronóstico del curso de la enfermedad en el futuro. Como entenderán los expertos en la materia, tal valoración, aunque se prefiere que sea, normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que se van a diagnosticar. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificar como que padecen la enfermedad o que tienen predisposición a la misma. Si una parte es estadísticamente significativa se puede determinar sin más por el experto en la materia usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de valores de 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 predecir correctamente la evolución de 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.

En el marco de la presente invención, la evolución de la enfermedad puede tener como resultado el deterioro clínico de los pacientes con COVID-19, que incluye tanto su ingreso en la UCI como su fallecimiento, o por el contrario, el alta del paciente.

Los métodos de la invención se pueden aplicar con muestras de pacientes de cualquier sexo, es decir, hombres o mujeres, y a cualquier edad.

El primer método de la invención implica la comparación del nivel de expresión de *KLRB1* con el nivel de *KLRB1* de una muestra de referencia o con un valor mediano de pacientes con COVID-19 que finalmente han obtenido el alta y no han requerido ingreso en la unidad de cuidados intensivos. En el contexto de la presente invención, se entiende por "muestra de referencia" la muestra que se usa para determinar la variación del nivel de expresión de *KLRB1* de la presente invención.

La detección de la cantidad de producto de expresión de *KLRB1* puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica.

El nivel de expresión va a dar un determinado "perfil de expresión". El término "nivel de expresión", también denominado "cantidad producto" o "cantidad de producto de expresión" se refiere al material bioquímico, en concreto ARNm.

La medida de la cantidad o la concentración de producto de expresión, tanto de manera
5 semi-cuantitativa o cuantitativa como cualitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de expresión, y está correlacionada directamente con el número de moléculas de ARN. Dicha señal (a la que también podemos referirnos como señal de intensidad) puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física
10 de dichos productos. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, "etiqueta" o productos de reacción enzimática).

El término "cantidad", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de los productos de expresión, así como a cualquier otro valor o
15 parámetro relacionado con los mismos o que pueda derivarse de éstos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de dichos productos de expresión obtenidos mediante medida directa. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida
20 descritos en otra parte del presente documento.

El término "comparación", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad del productos de expresión de *KLRB1* de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de los productos de expresión de *KLRB1* de una o varias muestras de referencia. La muestra de
25 referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema.

En la invención, el método para determinar el resultado, es decir, el nivel de expresión de *KLRB1*, no necesita estar particularmente limitado.

Los métodos de la invención preferentemente llevan a cabo la determinación del nivel de
30 expresión mediante:

- (i) un método que comprende PCR (reacción en cadena de la polimerasa), tal como PCR en tiempo real o RT-PCR o digital PCR (dPCR) y/o

- (ii) un micromatriz, y/o
- (iii) un Northern Blot y/o
- (iv) un inmunoensayo, como un método de inmunohistoquímica o un método basado en ELISA.

5 La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa en tiempo real (generalmente abreviada como RQ-PCR, RT-qPCR, rt-PCR o qPCR) es una técnica de cuantificación de la expresión de ARNm sensible y reproducible que se puede usar particularmente para perfilar la expresión de ARNm en células y tejidos. Se puede utilizar cualquier método para evaluar los resultados de la RT-PCR, y se puede preferir el método ΔC_t y el método $\Delta\Delta C_t$. El
 10 método $\Delta\Delta C_t$ se describe en detalle por Livak et al.. (C_t = Valores umbral de ciclo). El $\Delta\Delta C_t$ -method incluirá una 'muestra de control' y una 'muestra de sujeto'. La 'muestra de sujeto' es una muestra del sujeto a analizar. Típicamente, se utilizan varias réplicas para cada concentración diluida para derivar la eficiencia de amplificación. La eficiencia de la amplificación por PCR se puede definir como porcentaje de amplificación (de 0 a 1). Durante
 15 la reacción de qPCR, un software mide típicamente para cada muestra el número de ciclo en el que la fluorescencia (indicador de amplificación por PCR) cruza una línea arbitraria, el umbral. Este punto de cruce es el valor C_t .

Una micromatriz es una matriz sobre un sustrato sólido (generalmente una lámina de vidrio o una célula de película delgada de silicio) que analiza grandes cantidades de material
 20 biológico, en el presente caso una gran cantidad de ARNm o, preferiblemente, sus transcritos de ADN inversos, que son detectables mediante sondas específicas inmovilizadas sobre el sustrato sólido.

Una transferencia Northern implica el uso de electroforesis para separar muestras de ARN por tamaño y detección posterior con una sonda de hibridación complementaria a (parte de)
 25 la secuencia diana del ARN de interés.

El término "inmunoensayo", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de un anticuerpo con un antígeno. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: inmunoblot, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
 30 (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, x-map o chips de proteína. En otra realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno o anticuerpo) puede ser

inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador. Existen diferentes tipos de ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA sándwich. El término "compuesto marcador", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y cuantificación de la cantidad de anticuerpos frente a *KLRB1*. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ^{32}P o ^{35}S , fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, autoradiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

Preferentemente el método para determinar el nivel de expresión relativo de *KLRB1* medido como *KLRB1* ΔCt , es un método que comprende PCR (reacción en cadena de la polimerasa), tal como PCR en tiempo real o RT-PCR.

En el método de la presente invención, la expresión del ARNm puede normalizarse, preferiblemente en relación con la expresión de otra molécula de ARN. Existen métodos de normalización bien conocidos en el estado de la técnica.

Una vez que el nivel de expresión en relación con los valores de referencia se ha determinado, es necesario identificar si existen alteraciones en la expresión (aumento o disminución de la expresión). La expresión (y el nivel del producto de expresión del gen) se considera aumentada en una muestra de la materia objeto de estudio cuando los niveles de incremento con respecto a la muestra de referencia son al menos de un 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos el 20%, al menos un 25%, por lo menos 30%, por lo menos el 35%, por lo menos el 40%, por lo menos 45%, por lo menos el 50%, por lo menos el 55%, por lo menos el 60%, por lo menos el 65%, por lo menos el 70%, por lo menos el 75%, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, por lo menos 100%, por lo menos 110%, por lo menos 120%, por lo menos 130%, por lo menos 140%, por lo menos 150%, o más. Del mismo modo, la expresión se considerada disminuida cuando sus niveles disminuyen con respecto a la muestra de referencia en al menos un 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos el 20%, por lo menos el 25%, al menos un 30%, por lo menos el 35%, por lo menos el 40%, por lo

menos 45%, por lo menos el 50%, por lo menos el 55%, por lo menos el 60%), por lo menos el 65%, por lo menos 70%, por lo menos el 75%, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, por lo menos 100% (es decir, ausente).

La invención proporciona un método para asignar un paciente a uno de los dos grupos: el grupo 1, que comprende sujetos identificables por el método de la invención y el grupo 2, que representa los sujetos restantes. Los pacientes identificables por el método de la invención serían aquellos donde el nivel de expresión de *KLRB1* se encuentra infraexpresado. Este grupo de pacientes se catalogaría como el grupo de pacientes que va a presentar deterioro clínico, entendido como ingreso en la UCI o *exitus*.

10 Un **cuarto aspecto** de la invención describe un kit que comprende al menos uno o más oligonucleótidos capaces de hibridar con los ARNm de *KLRB1* en condiciones rigurosas.

En una realización preferida el kit o dispositivo de la invención comprende:

(a) medios para detectar en una muestra biológica, preferiblemente nasofaríngea, obtenida del paciente, el nivel de expresión de *KLRB1*.

15 En una realización más preferida el kit o dispositivo de la invención además comprende:

(b) medios para comparar el nivel de expresión (a) con una muestra de referencia.

En realizaciones particulares, el kit se selecciona de (a) un kit adecuado para PCR, (b) un kit adecuado para Northern Blot, (c) un kit adecuado para análisis de micromatrices y (d) un inmunoensayo. También se pueden combinar dos o más de estas realizaciones, de modo que el kit pueda comprender, por ejemplo, tanto (a) como (c).

En una realización preferida el kit o dispositivo que comprende al menos uno o más oligonucleótidos capaces de hibridar con *KLRB1*.

Se prefiere que dicho oligonucleótido(s) sea capaz de hacerlo en condiciones de astringencia. La astringencia es un término usado en experimentos de hibridación que refleja el grado de complementariedad entre el oligonucleótido y el ácido nucleico; cuanto mayor sea la astringencia, mayor porcentaje de homología entre la sonda y el ácido nucleico unido al filtro. El experto en la materia sabe bien que la temperatura y las concentraciones de sal tienen un efecto directo sobre los resultados que se obtienen. Se reconoce que los resultados de la hibridación están relacionados con el número de grados por debajo de la T_m (temperatura de fusión) del ADN en el que se realiza el experimento. A menudo, las condiciones rigurosas se definen como un lavado con 0.1X SSC (solución salina-citrato de

sodio (SSC) tampón a 65 °C. (SSC se proporciona generalmente como una solución madre 20X, que consiste en cloruro de sodio 3 M y citrato de trisodio 300 mM (ajustado a pH 7,0 con HCl)).

El kit o dispositivo de la invención puede comprender controles, instrucciones de programa e
5 información necesaria para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención.

Otro **aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención en el método de la invención en cualquiera de sus realizaciones, aunque su uso no está particularmente limitado.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador que comprende
10 instrucciones para realizar el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención.

En particular, la invención abarca programas de ordenador dispuestos sobre o dentro de una portadora. La portadora puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el programa. Como variante, la portadora podría ser un circuito integrado en el que va incluido
15 el programa y que se haya adaptado para ejecutar, o para ser utilizado en la ejecución de los procesos correspondientes.

Por ejemplo, los programas podrían estar incorporados en un medio de almacenamiento, como una memoria ROM, una memoria CD ROM o una memoria ROM de semiconductor, una memoria USB, o un soporte de grabación magnética, por ejemplo, un disco flexible o un
20 disco duro. Alternativamente, los programas podrían estar soportados en una señal portadora transmisible; por ejemplo, podría tratarse de una señal eléctrica u óptica que podría transportarse a través de cable eléctrico u óptico, por radio o por cualesquiera otros medios.

La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier
25 medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención. Los programas de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dicho procedimiento.

Otros aspectos de la invención se refieren al medio de almacenamiento legible y a la señal transmisible que comprende instrucciones de programa necesarias para la ejecución del
30 método de invención por un ordenador.

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 DETALLADA DE LA INVENCION

Se propuso realizar un análisis de la expresión de un panel de genes relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria de los pacientes hospitalizados por COVID-19 y estudiar su relación con el deterioro clínico (ingreso en UCI o fallecimiento).

Para ello se diseñó un estudio observacional prospectivo entre los pacientes dados de alta y
10 los que sufrieron deterioro clínico o fallecieron, con muestras de exudados nasofaríngeos a partir de excedentes diagnósticos de las pruebas de confirmación de la infección por SARS-CoV-2 (hisopos nasofaríngeos, muestras de esputo o broncoaspirados).

Se incluyeron en el estudio dos cohortes independientes de pacientes. La primera formada por 149 pacientes COVID-19 ingresados consecutivamente en el Hospital Costa del Sol
15 (Marbella, España), durante el año 2020 con diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 confirmado mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

Los resultados obtenidos se validaron posteriormente en una segunda cohorte independiente de 168 pacientes COVID-19 (87 no vacunados y 81 vacunados) ingresados
20 durante el año 2022 en el Hospital Costa del Sol con diagnóstico confirmado por RT-PCR.

Los criterios de inclusión incluían ingreso hospitalario, edad > 18 años, diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 confirmado por RT-PCR, síntomas respiratorios compatibles y consentimiento informado.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Costa del Sol y cumplió con la
25 Declaración de Helsinki y las guías de buena práctica clínica. Todos los pacientes fueron informados previamente de los objetivos del estudio y proporcionaron un consentimiento firmado para el análisis de sus excedentes diagnósticos de acuerdo con la normativa vigente. El análisis de los excedentes diagnósticos de los pacientes fallecidos fue aprobado por el mismo comité ético.

30 Las variables clínicas que se registraron de cada uno de los pacientes, para su posterior análisis, fueron:

- Edad al ingreso,

- Sexo biológico,

- Estado vacunal,

- Aumento de la demanda de oxígeno, clasificadas como nivel 1: cánula nasal, nivel 2: 5 máscara Venturi; nivel 3: cánula nasal de alto flujo, nivel 4: ventilación mecánica no invasiva, nivel 5: ventilación mecánica invasiva,

- Comorbilidad; entendida como más de dos patologías registradas en la historia clínica del paciente de entre las que se citan a continuación: hipertensión arterial, obesidad, angina, arritmia, fibrilación auricular, enfermedad valvular, infarto agudo de miocardio, insuficiencia 10 cardíaca, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, enfermedad pulmonar crónica leve, enfermedad pulmonar crónica moderada-grave, demencia, hemiplejía/paraplejía, otras enfermedades neurológicas, diabetes mellitus, diabetes mellitus con daño orgánico, otras enfermedades endocrinas, enfermedad hepática leve, hepatopatía moderada-grave, insuficiencia renal leve, insuficiencia renal moderada-grave, úlcera péptica, 15 hemorragia gastrointestinal, enfermedad inflamatoria intestinal, tumor maligno, linfoma, leucemia, tumor metastásico, sida, enfermedad reumática, coagulopatía, antecedentes de trombosis venosa profunda, tromboembolismo pulmonar, síndrome de apnea obstructiva del sueño, asma o enfermedad pulmonar intersticial).

Cohorte de descubrimiento: Identificación del biomarcador

20 De los 149 pacientes de la primera cohorte se analizaron 132 excedentes de diagnóstico de acuerdo con el protocolo publicado [27], de los que finalmente se obtuvieron datos de 95 muestras que cumplieron el estándar de análisis de la plataforma nCounter (concentración, pureza e integridad del ARNm extraído).

Brevemente, los excedentes de muestras, hisopos nasofaríngeos recogidos en tubos 25 estériles con 2-3 ml de medio de transporte viral, se mantuvieron a -80°C hasta su análisis.

Se llevó a cabo la inactivación de los posibles virus presentes en las muestras mediante tratamiento térmico, sometiendo a las muestras a 98 °C durante 2 minutos.

Tras la inactivación viral, se extrajo inmediatamente el ARN de forma automatizada para lo que se utilizó el robot MagCore (Magcore Lamination India Pvt. Ltd), con volúmenes 30 iniciales de muestra de 400 µl y un volumen final de eluido de 40 µl.

Se evaluó la calidad y concentración de las muestras eluidas tanto con el espectrofotómetro NanoDrop™2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts), como con Agilent 2100 System Bioanalyzer (Agilent Scientific Instruments Inc., Santa Clara, California) y finalmente, se optó por considerar la concentración obtenida con el Bioanalyzer por ser más
 5 realista y permitir seleccionar con precisión el segmento de ARN a medir, excluyendo el primer pico correspondiente al marcador de peso.

Las recomendaciones de entrada de NanoString estipulan relaciones específicas de absorbancia a 260 nm y 280 nm (A260/280) medidas con NanoDrop dentro del rango 1,80-2 nm. Debido a la disponibilidad limitada de material de ARN y a las bajas cantidades, se
 10 optimizó la concentración inicial a 100ng/μl en lugar de la recomendación habitual del protocolo de 200ng/μl para obtener resultados satisfactorios.

Tras la inactivación térmica y la extracción de ARN, los eluidos de ARN se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento.

Las muestras se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante y se diluyeron, en el
 15 caso de las muestras más concentradas, de modo que el volumen final de 5 μl por pocillo contuviera 150-200 ng de ARN total. Las muestras se hibridaron 22 horas a +65°C y se almacenaron a +4 °C hasta la lectura digital.

La cuantificación digital de ácidos nucleicos se realizó con el panel Human Immunology V2 CSO compuesto por 649 genes relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria en la
 20 plataforma Nano String nCounter, que está clínicamente validada para realizar la cuantificación de la expresión génica. Los resultados se obtuvieron con la estación de preparación nCounter y el analizador digital configurados a alta sensibilidad.

La expresión génica diferencial entre los distintos grupos (pacientes con deterioro clínico vs pacientes sin deterioro clínico, pacientes dados de alta vs pacientes fallecidos o ingresados
 25 en la unidad de cuidados intensivos) se analizó con el software de análisis nSolver™. Este análisis comparativo de la expresión diferencial génica observada condujo a la identificación de 4 genes candidatos a biomarcadores: *KLRAP1* (*Killer Cell Lectin Like Receptor A1*), *KLRB1* (*Killer Cell Lectin Like Receptor B1*, CD161), *IRF8* (*Interferon Regulatory Factor 8*) y *TCF4* (*Transcription Factor 4*) (**Tabla 1**).

30 **Tabla 1.** Análisis de expresión diferencial obtenidos con el programa informático nSolver Analysis entre los pacientes dados de alta y los pacientes que perecieron o fueron ingresados en la unidad de cuidados intensivos.

Nombre de la sonda	LogFC	Valor P	estadístico t	95% inferior	Superior 95%	FDR ajustado
<i>KLRAP1</i>	2.24	<0.001	4.84	1.61	3.12	0.03
<i>KLRB1</i>	1.98	<0.001	3.77	1.38	2.85	0.56
<i>IRF8</i>	-1.79	<0.001	-3.68	0.41	-1.31	0.56
<i>TCF4</i>	-1.59	<0.001	-3.45	0.48	-1.22	0.87

LogFC: Log-fold changes: cambios logarítmicos. Los valores LogFC positivos indican sobreexpresión del ARNm del gen en el grupo de pacientes dados de alta con respecto a los pacientes que perecieron o requirieron ingreso en la unidad de cuidados intensivos, mientras 5 que los negativos indican infraexpresión génica.

La distribución del estadístico t se calcula utilizando la ecuación de Welch-Satterthwaite para los grados de libertad en la estimación de los límites de confianza del 95% para la expresión diferencial observada entre grupos. El resultado de la prueba t es el valor p, cuanto más bajo sea el valor p, mayor será la evidencia de que los dos grupos tienen niveles de expresión 10 diferentes.

Tasa de falsos descubrimientos (FDR) del gen: Proporción de genes con valores al menos tan bajos como el gen en cuestión que se espera que sean falsos descubrimientos.

Según se muestra en la tabla 1, *KLRAP1* y *KLRB1* se encontraban sobreexpresados en pacientes dados de alta con respecto a los pacientes que perecieron o requirieron ingreso 15 en la unidad de cuidados intensivos mientras que *IRF8* y *TCF4* se encontraban infraexpresados.

Teniendo en cuenta los 4 genes candidatos identificados y las variables que en la literatura existente se han asociado al peor pronóstico de los pacientes con COVID-19 (**Tabla 2**), se realizó un análisis multivariante de regresión logística.

20 **Tabla 2.** Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes de la cohorte de descubrimiento de los que se obtuvieron las 95 muestras que cumplieron el estándar de análisis de la plataforma nCounter.

Variables		n	%
Sexo	Hombre	30	31.6
	Mujer	65	68.4
Edad	<65	49	51.6

	≥65	46	48.4
Comorbilidad	No	46	48.4
	Sí	49	51.6
Vacunación Sars-Cov-2	No	95	100
	Sí	0	0
Aumento de la demanda de oxígeno	No	54	56.8
	Sí	41	43.2
Estado de alta	Vivir sin UCI	68	71.6
	UCI y/o Exitus	27	28.4
Marcadores (Mediana IQR)	<i>KLRAP1</i>	6	6
	<i>KLRB1</i>	6	6
	<i>IRF8</i>	12	14
	<i>TCF4</i>	19	30

IQR: Interquartile Range (rango intercuartílico)

El análisis multivariante de regresión logística evidenció la **relevancia de la expresión de *KLRB1*** como biomarcador y de la variable edad como determinantes independientes **en la evolución de los pacientes con COVID-19. Mientras que la expresión aumentada de *KLRB1*** (p=0,037 Odds Ratio OR 0,5) **tendría una función protectora** (un valor de OR<1 indica una asociación “protectora”, lo que significa que es poco probable que ocurra el evento), tal y como se preveía en función de los resultados de la **Tabla 1**; la edad avanzada (p=0,016 Odds Ratio OR 3,3) estaría asociada el deterioro clínico o la muerte del grupo de 10 pacientes de la cohorte de descubrimiento (un valor de OR>1 indica que hay una asociación, siendo más fuerte cuanto mayor sea el número).

Tabla 3. Regresión Logística Multivariante para evaluar ingreso UCI y/o exitus.

Variable resultado: UCI y/o Exitus	β	p	Odds Ratio - Proporción de probabilidades	IC95%	
				Inferior	Superior
Edad >65	1,21	0,016	3,3	1,25	9
klrb1_normalizado	-0,68	0,037	0,5	0,27	0,96

Cohorte de validación: Validación del biomarcador

La cohorte de validación incluyó un total de 168 pacientes (87 no vacunados y 81 vacunados) reclutados entre el 20 de agosto de 2021 y el 26 de noviembre de 2022 hospitalizados con diagnóstico confirmado y sintomatología compatible de COVID-19 por RT-PCR en el Hospital Costa del Sol.

La expresión del gen *KLRB1* en los exudados nasofaríngeos se determinó mediante RT-PCR. Se aisló el ARN de las muestras nasofaríngeas como se ha descrito previamente [18] y se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR multiplexadas en un termociclador de 96 placas (Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR System) utilizando *KLRB1* (Hs00174469_m1, ThermoFisher Scientific TaqMan™ Assay) y *GAPDH* (PrimeTime Std® IDT Hs.PT.39a.22214836) como gen de referencia. Los niveles de expresión cualitativa del gen diana *KLRB1* y del gen de referencia *GAPDH1* se obtuvieron como valores Ct (umbral de ciclo).

Asumiendo que las eficiencias de amplificación tanto para el gen de referencia como para el gen diana de interés son aproximadamente iguales, se calculó posteriormente el pliegue relativo de expresión del gen *KLRB1* de cada muestra con respecto al gen de referencia, en este caso *GAPDH*, para su posterior análisis como ΔCt , entendido como la diferencia en los valores del Ct para el gen de interés y el gen de referencia.

Tabla 4. Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes de la cohorte de validación.

Variables		n	%
Sexo	Hombre	96	57.1
	Mujer	72	42.9
Edad	Media - DE	71.1	15.4
Hábito de fumar	No	150	89.3
	Sí	18	10.7
Comorbilidad	No	98	58.3
	Sí	70	41.7
Vacunación Sars-Cov-2	No	87	51.8
	Sí	81	48.2
KLRB1 ΔCt	Media - DE	10.2	2.8
Estado de alta	Vivos sin ingreso en UCI	110	65.5

	Vivos con ingreso en UCI	9	5.3
	<i>Exitus</i>	49	29.2

No se observó una correlación significativa entre la edad y el valor de *KLRB1* Δ Ct, como indica un coeficiente de correlación de Pearson (CCP) de 0,202 ($p=0,099$).

El análisis de regresión simple confirmó además que *KLRB1* Δ Ct no mostraba ninguna asociación con el sexo biológico, el hábito tabáquico o la comorbilidad del paciente.

Sin embargo, **el análisis sí reveló una asociación significativa del valor de *KLRB1* Δ Ct tanto con el estado de vacunación ($p=0,001$) como con el deterioro clínico o la muerte ($p=0,035$) (Tabla 5).** En este sentido, cabe señalar que valores aumentados de *KLRB1* Δ Ct son indicativos de una menor expresión del gen, es decir, de su infraexpresión.

10 **Tabla 5.** Análisis de regresión simple relacionado con *KLRB1* Δ Ct.

KLRB1 ΔCt				
		Media	SD	p
Sexo	Hombre	10.1	2.9	0.253
	Mujer	10.4	2.7	
Hábito de fumar	No	10.2	2.9	0.416
	Sí	10.3	1.7	
Comorbilidad	No	10.4	2.8	0.156
	Sí	9.9	2.8	
Vacunación Sars-Cov-2	No	9.6	2.9	0.001*
	Sí	10.9	2.6	
Estado de alta	Vivos sin ingreso en UCI	9.9	2.7	0.035*
	UCI y/o <i>Exitus</i>	10.7	2.9	

SD: Desviación estándar.

El análisis de regresión logística multivariante confirmó que, en la muestra analizada, sólo ***KLRB1* Δ Ct** ($p=0,039$ OR 1,135) y **la edad avanzada** ($p=0,015$ OR 1,033) explican de forma independiente el deterioro clínico del grupo de pacientes con ingreso en la unidad de cuidados intensivos o muerte (**Tabla 6**).

Tabla 6. Modelo de regresión logística multivariante con variable resultado ingreso en UCI y/o exitus.

Variables		β	p	Odds Ratio - Proporción de probabilidades	Intervalo de Confianza IC95	
					Baja	Superior
Sexo	Hombre			1.00		
	Mujer	-0.649	0.069	0.523	0.260	1.053
Edad (<65)		0.033	0.015*	1.033	1.006	1.061
Vacunación Sars-Cov-2	No			1.00		
	Sí	-0.686	0.078	0.503	0.234	1.081
KLRB1 Δ Ct		0.126	0.039*	1.135	1.006	1.280

Análisis estadístico

5 Los resultados de la cuantificación digital de los genes de las muestras de la cohorte de descubrimiento se analizaron con el software de análisis nSolverTM 4.0, que calcula el cociente entre la diferencia de las medias de los datos normalizados transformados logarítmicamente y la raíz cuadrada de la suma de las varianzas de las muestras de los dos grupos para ayudar a determinar si el cambio de pliegue calculado es estadísticamente

10 significativo.

nSolver proporciona diferentes métodos para determinar la significación de los cocientes, incluida la prueba t de dos colas que asume una varianza desigual y los métodos de tasa de falsos descubrimientos (FDR) [28].

La distribución del estadístico t se calcula utilizando la ecuación de Welch-Satterthwaite para

15 los grados de libertad en la estimación de los límites de confianza del 95% para la expresión diferencial observada entre grupos.

Se realizó un análisis descriptivo utilizando medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas, y distribución de frecuencias para las variables cualitativas. Tomando como variable de referencia la variable de interés, se realizó un análisis bivalente

20 mediante la prueba t de Student para contrastar las variables cualitativas, y el coeficiente de correlación de Pearson para la variable cuantitativa (edad).

El modelo de regresión logística multivariante se construyó tomando como variable de resultado el ingreso en la unidad de cuidados intensivos o la muerte durante la

hospitalización, incluyendo la variable de interés en un primer paso y el resto de variables independientes en un segundo paso con $p < 0,05$ y $p < 0,01$ como criterios de entrada y salida respectivamente. La Odds Ratio (OR) se describió con su respectivo Intervalo de Confianza del 95% (IC 95%). El análisis se realizó con el programa estadístico SPSS v28.

5 Referencias

1. Kashyap, A.; Sebastian, S.A.; Krishnaiyer NarayanaSwamy, S.R.; Raksha, K.; Krishnamurthy, H.; Krishna, B.; D'Souza, G.; Idiculla, J.; Vyas, N. Molecular markers for early stratification of disease severity and progression in COVID-19. *Biology Methods and Protocols* **2022**, 7, doi:10.1093/biomethods/bpac028.
- 10 2. Sharif-Askari, F.S.; Sharif-Askari, N.S.; Hafezi, S.; Mdkhana, B.; Alsayed, H.A.H.; Ansari, A.W.; Mahboub, B.; Zakeri, A.M.; Temsah, M.H.; Zahir, W.; et al. Interleukin-17, a salivary biomarker for COVID-19 severity. *PloS one* **2022**, 17, e0274841, doi:10.1371/journal.pone.0274841.
3. Flemming, A. Poor nasal immunity can lead to severe COVID-19. *Nature Reviews*
15 *Immunology* **2021**, 21, 547-547, doi:10.1038/s41577-021-00610-2.
4. Roukens, A.H.E.; Pothast, C.R.; König, M.; Huisman, W.; Dalebout, T.; Tak, T.; Azimi, S.; Kruize, Y.; Hagedoorn, R.S.; Zlei, M.; et al. Prolonged activation of nasal immune cell populations and development of tissue-resident SARS-CoV-2-specific CD8⁺ T cell responses following COVID-19. *Nature Immunology* **2022**, 23, 23-32, doi:10.1038/s41590-021-01095-w.
- 20 5. Lieberman, N.A.; Peddu, V.; Xie, H.; Shrestha, L.; Huang, M.-L.; Mears, M.C.; Cajimat, M.N.; Bente, D.A.; Shi, P.-Y.; Bovier, F. In vivo antiviral host transcriptional response to SARS-CoV-2 by viral load, sex, and age. *PLoS biology* **2020**, 18, e3000849.
6. Lenart, M.; Górecka, M.; Bochenek, M.; Barreto-Duran, E.; Szczepański, A.; Gałuszka-Bulaga, A.; Mazur-Panasiuk, N.; Węglarczyk, K.; Siwiec-Koźlik, A.; Korkosz, M. SARS-CoV-2
25 infection impairs NK cell functions via activation of the LLT1-CD161 axis. *Frontiers in Immunology* **2023**, 14, 1123155.
7. Karunathilaka, A.; Halstrom, S.; Price, P.; Holt, M.; Lutzky, V.P.; Doolan, D.L.; Kupz, A.; Bell, S.C.; Thomson, R.M.; Miles, J.J.; et al. CD161 expression defines new human $\gamma\delta$ T cell subsets. *Immunity & ageing : I & A* **2022**, 19, 11, doi:10.1186/s12979-022-00269-w.
- 30 8. Truong, K.-L.; Schlickeiser, S.; Vogt, K.; Boës, D.; Stanko, K.; Appelt, C.; Streitz, M.; Grütz, G.; Stobutzki, N.; Meisel, C.; et al. Killer-like receptors and GPR56 progressive

- expression defines cytokine production of human CD4⁺ memory T cells. *Nature Communications* **2019**, 10, 2263, doi:10.1038/s41467-019-10018-1.
9. Horvath, K.M.; Herbst, M.; Zhou, H.; Zhang, H.; Noah, T.L.; Jaspers, I. Nasal lavage natural killer cell function is suppressed in smokers after live attenuated influenza virus. *Respiratory Research* **2011**, 12, 102, doi:10.1186/1465-9921-12-102.
10. Ghasemzadeh, M.; Ghasemzadeh, A.; Hosseini, E. Exhausted NK cells and cytokine storms in COVID-19: Whether NK cell therapy could be a therapeutic choice. *Human immunology* **2022**, 83, 86-98, doi:10.1016/j.humimm.2021.09.004.
11. Osman M, Faridi RM, Sligl W, Shabani-Rad MT, Dharmani-Khan P, Parker A, Kalra A, Tripathi MB, Storek J, Cohen Tervaert JW, Khan FM. Impaired natural killer cell counts and cytolytic activity in patients with severe COVID-19. *Blood Adv.* **2020** Oct 27;4(20):5035-5039. doi: 10.1182/bloodadvances.2020002650.
12. Demaria, O.; Carvelli, J.; Batista, L.; Thibult, M.-L.; Morel, A.; André, P.; Morel, Y.; Vély, F.; Vivier, E. Identification of druggable inhibitory immune checkpoints on Natural Killer cells in COVID-19. *Cellular & molecular immunology* **2020**, 17, 995-997.
13. Hammer, Q.; Cuapio, A.; Bister, J.; Björkström, N.K.; Ljunggren, H.-G. NK cells in COVID-19—from disease to vaccination. *Journal of Leukocyte Biology* **2023**, qiad031.
14. Braud, V.M.; Meghraoui-Kheddar, A.; Elaldi, R.; Petti, L.; Germain, C.; Anjuère, F. LLT1-CD161 Interaction in Cancer: Promises and Challenges. *Front Immunol* **2022**, 13, 847576, doi:10.3389/fimmu.2022.847576.
15. Kirkham, C.L.; Carlyle, J.R. Complexity and Diversity of the NKR-P1:Clr (Klrb1:Clec2) Recognition Systems. *Frontiers in Immunology* **2014**, 5, doi:10.3389/fimmu.2014.00214.
16. UniProt. Q12918 · KLRB1_HUMAN. Available online: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q12918/entry> (accessed on June 22, 2023).
17. Pozo, D.; Valés-Gómez, M.; Mavaddat, N.; Williamson, S.C.; Chisholm, S.E.; Reyburn, H. CD161 (human NKR-P1A) signaling in NK cells involves the activation of acid sphingomyelinase. *The Journal of Immunology* **2006**, 176, 2397-2406.
18. Database, G.T.H.G. KLRB1 Gene - Killer Cell Lectin Like Receptor B1. Available online: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KLRB1> (accessed on July 23, 2023).

19. Kamishikiryo, J.; Fukuhara, H.; Okabe, Y.; Kuroki, K.; Maenaka, K. Molecular basis for LLT1 protein recognition by human CD161 protein (NKR P1A/KLRB1). *The Journal of biological chemistry* **2011**, *286*, 23823-23830, doi:10.1074/jbc.M110.214254.
20. Germain, C.; Meier, A.; Jensen, T.; Knapnougél, P.; Poupon, G.; Lazzari, A.; Neisig, A.;
5 Håkansson, K.; Dong, T.; Wagtmann, N.; et al. Induction of lectin-like transcript 1 (LLT1) protein cell surface expression by pathogens and interferon- γ contributes to modulate immune responses. *The Journal of biological chemistry* **2011**, *286*, 37964-37975, doi:10.1074/jbc.M111.285312.
21. Fergusson, J.R.; Fleming, V.M.; Klenerman, P. CD161-expressing human T cells. *Front*
10 *Immunol* **2011**, *2*, 36, doi:10.3389/fimmu.2011.00036.
22. Aljabr, W.; Al-Amari, A.; Abbas, B.; Karkashan, A.; Alamri, S.; Alnamnakani, M.; Al-Qahtani, A. Evaluation of the Levels of Peripheral CD3(+), CD4(+), and CD8(+) T Cells and IgG and IgM Antibodies in COVID-19 Patients at Different Stages of Infection. *Microbiology spectrum* **2022**, *10*, e0084521, doi:10.1128/spectrum.00845-21.
- 15 23. Moss, P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nature Immunology* **2022**, *23*, 186-193, doi:10.1038/s41590-021-01122-w.
24. Vitallé J, Pérez-Gómez A, Ostos FJ, Gasca-Capote C, Jiménez-León MR, Bachiller S, Rivas-Jeremías I, Silva-Sánchez MDM, Ruiz-Mateos AM, Martín-Sánchez MÁ, López-Cortes LF, Rafii-El-Idrissi Benhnia M, Ruiz-Mateos E. Immune defects associated with lower SARS-
20 CoV-2 BNT162b2 mRNA vaccine response in aged people. *JCI Insight*. **2022** Sep 8;7(17):e161045. doi: 10.1172/jci.insight.161045.
25. Ssemaganda, A., Nguyen, H.M., Nuhu, F. *et al.* Expansion of cytotoxic tissue-resident CD8⁺ T cells and CCR6⁺CD161⁺ CD4⁺ T cells in the nasal mucosa following mRNA COVID-19 vaccination. *Nat Commun* **2022** *13*, 3357 doi.org/10.1038/s41467-022-30913-4.
- 25 26. Ponomarenko, E.A.; Krasnov, G.S.; Kiseleva, O.I.; Kryukova, P.A.; Arzumanyan, V.A.; Dolgalev, G.V.; Ilgisonis, E.V.; Lisitsa, A.V.; Poverennaya, E.V. Workability of mRNA Sequencing for Predicting Protein Abundance. *Genes* **2023**, *14*, 2065. <https://doi.org/10.3390/genes14112065>.
27. García Aranda, M.; López-Rodríguez, I.; García-Gutiérrez, S.; Padilla-Ruiz, M.; de
30 Luque, V.; Hortas, M.L.; Diaz, T.; Álvarez, M.; Barragan-Mallofret, I.; Redondo, M. Laboratory protocol for the digital multiplexed gene expression analysis of nasopharyngeal swab

samples using the NanoString nCounter system. *F1000Research* **2022**, 11, 133, doi:10.12688/f1000research.103533.2.

28. Nanostring. nSolver™ 4.0 Analysis Software User Manual. **2018**.

REIVINDICACIONES

1. Uso *in vitro* del nivel de expresión del ARNm del gen *KLRB1* en muestras previamente aisladas de la mucosa nasofaríngea, como biomarcador para predecir y/o pronosticar la evolución de pacientes con COVID-19.
- 5 2. El uso *in vitro* del nivel de expresión de *KLRB1* según la reivindicación anterior caracterizado por que el nivel de expresión de *KLRB1* es relativo y se calcula como *KLRB1* Δ Ct, siendo este el valor que resulta de la diferencia en los valores del Ct o umbral de ciclo para el gen *KLRB1* y un gen de referencia.
3. El uso *in vitro* del nivel de expresión de *KLRB1* según la reivindicación anterior
10 caracterizado por que el gen de referencia es *GAPDH1*.
4. Un método *in vitro* de obtención datos útiles para predecir y/o pronosticar la evolución de un paciente con COVID-19, que comprende
 - a) medir el nivel de expresión de *KLRB1* en una muestra previamente aislada de la mucosa nasofaríngea del paciente, y
 - 15 b) comparar el valor obtenido con el valor de una muestra de referencia obtenida de pacientes con COVID-19 que finalmente han obtenido el alta y no han requerido ingreso en la unidad de cuidados intensivos.
5. El método *in vitro* de obtención datos útiles según la reivindicación anterior caracterizado por que el nivel de expresión de *KLRB1* se mide como *KLRB1* Δ Ct de forma relativa en
20 relación con un gen de referencia.
6. El método *in vitro* de obtención de datos útiles según la reivindicación anterior caracterizado por que el gen de referencia es *GAPDH*.
7. Un método *in vitro* para predecir y/o pronosticar la evolución de un paciente con COVID-19 que comprende el método de la reivindicación 4 y que además comprende:
 - 25 c) clasificar al paciente en el grupo de pacientes que va a presentar deterioro clínico, entendido como ingreso en la UCI o *exitus*, cuando el nivel de expresión de *KLRB1* se encuentra diferencialmente infraexpresado respecto al valor de la muestra de referencia.

8. El método *in vitro* para predecir y/o pronosticar la evolución de un paciente con COVID-19 que comprende el método según cualquiera de las reivindicaciones 5 – 6 y que además comprende:

c') clasificar al paciente en el grupo de pacientes que va a presentar deterioro clínico, entendido como ingreso en la UCI o *exitus*, cuando el nivel relativo de expresión de *KLRB1* medido como *KLRB1* Δ Ct se encuentra diferencialmente aumentado respecto al valor de la muestra de referencia.

9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 7, caracterizado porque los niveles de expresión se pueden obtener mediante:

10 (i) un método que comprende PCR (reacción en cadena de la polimerasa), tal como PCR en tiempo real o RT-PCR y/o

(ii) un micromatriz, y/o

(iii) un Northern Blot y/o

(iv) un inmunoensayo, como un método de inmunohistoquímica o un método basado en ELISA.

11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 5- 6 o 8, caracterizado porque los niveles de expresión se obtienen mediante: un método que comprende PCR (reacción en cadena de la polimerasa), tal como PCR en tiempo real o RT-PCR.

12. Un kit que comprende medios para cuantificar en una muestra nasofaríngea previamente aislada, el nivel de expresión de *KLRB1* de forma absoluta o de forma relativa respecto a otro gen de referencia, al menos uno o más oligonucleótidos capaces de hibridar con los ARNm de *KLRB1* en condiciones rigurosas, y medios para comparar el nivel de expresión de *KLRB1* obtenido con el valor de una muestra de referencia.

13. Uso del kit según la reivindicación anterior para llevar a cabo los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11.



- ②1 N.º solicitud: 202331044
②2 Fecha de presentación de la solicitud: 15.12.2023
③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. cl.: **C12Q1/6806** (2018.01)
C12Q1/6851 (2018.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2023323485 A1 (KHATRI PURVESH et al.) 12/10/2023, Tablas, ejemplos, figuras 1 y 5; párrafo [0110]	1-13
A	US 11045546 B1 (KELLY SCOTT et al.) 29/06/2021	1-13
A	LENART, M. et al. SARS-CoV-2 infection impairs NK cell functions via activation of the LLT1-CD161 axis. Frontiers in Immunology, mayo 2023, Nº 14, artículo nº:1123155 [en línea] [recuperado el 11/11/2024], ISSN 1664-3224 (electronic), <DOI:10.3389/fimmu.2023.1123155>	1-13
A	KWON, N. et al. Suitable primers for GAPDH reference gene amplification in quantitative RT-PCR analysis of human gene expression. Gene Reports, septiembre 2021, Vol. 24, artículo nº 101272 [en línea] [recuperado el 12/11/2024] <DOI: doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101272>	1-13
A	US 2022000919 A1 (KANG LIN et al.) 06/01/2022	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 <input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones <input type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº:		
--	--	--

Fecha de realización del informe 14.11.2024	Examinador A. Ugidos Valladares	Página 1/2
--	------------------------------------	---------------

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, INTERNET, XPESP, NPL y bases de texto TXT.