



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 599**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03733803 .5**

96 Fecha de presentación : **25.06.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1534855**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2005**

54 Título: **Método y kit para el diagnóstico de colitis ulcerosa.**

30 Prioridad: **25.06.2002 SE 0201956**
25.06.2002 SE 0201954
15.07.2002 US 395629 P
15.07.2002 US 395631 P
18.07.2002 SE 0202256
18.07.2002 SE 0202252
18.07.2002 SE 0202251
04.09.2002 US 407713 P
04.09.2002 US 407682 P
10.09.2002 US 409213 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.04.2011

73 Titular/es: **INDEX DIAGNOSTICS AB. (publ)**
Scheeles Vag 1
171 77 Stockholm, SE

72 Inventor/es: **Dieckmann, Andreas;**
Löfberg, Robert;
Von Stein, Oliver y
Von Stein, Petra

74 Agente: **No consta**

ES 2 356 599 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método y kit para el diagnóstico de colitis ulcerosa.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a diagnóstico de enfermedades inflamatorias del intestino, y en particular a un método y un kit para la predicción y/o el diagnóstico de colitis ulcerosa. La invención da a conocer genes marcadores específicos cuyo cambio en el estado de expresión, o bien conjuntamente o bien un subconjunto de los mismos, es indicativo de colitis ulcerosa. La presente invención se refiere además a métodos relacionados con ADN mediante los que la cuantificación de los niveles de expresión de dichos genes marcadores asociados con la enfermedad directamente a partir de una biopsia proporciona una prueba de diagnóstico inmediata y precisa para determinar el tipo de enfermedad, y/o la evaluación del efecto de un régimen de tratamiento particular. La invención da a conocer además kits de diagnóstico para la detección de los niveles de expresión de dichos genes.

15 Antecedentes de la invención

Enfermedad inflamatoria del intestino (EII) es una expresión que abarca varios estados que implican inflamación crónica en el sistema gastrointestinal. Dos de las formas más debilitantes de EII son la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). Estas enfermedades afectan a personas jóvenes, con una aparición típica a la edad de 20-30 años, y el tratamiento de la enfermedad es un compromiso a largo plazo tanto para el paciente como para el médico, puesto que en la actualidad no existe cura para ninguno de los estados. Aproximadamente el 30% de los pacientes con EII se someten a cirugía durante su vida y los pacientes con EII de larga duración corren un riesgo considerable de desarrollar cáncer colorrectal. Tres de cada diez pacientes con EII no responden a la mejor terapia médica disponible hoy en día, incluso cuando se usan dosis altas, que provocan efectos secundarios considerables.

El tratamiento de los pacientes con CU activa está dirigido a reducir la inflamación y a promover la curación del colon y la recuperación de la mucosa. La causa subyacente de CU no se comprende, ni se sabe qué desencadena que la enfermedad se repita entre sus formas inactiva y activa. Sin embargo, el estadio activo de la enfermedad se caracteriza por una inflamación significativa de la mucosa, un aumento de la permeabilidad celular, una pérdida de proteína y fluidos. En estadios graves, la inflamación profunda de la pared intestinal puede desarrollarse con dolor con la exploración abdominal, taquicardia, fiebre y riesgo de perforación intestinal.

Un síntoma temprano de la colitis ulcerosa es estreñimiento con paso de sangre o mucosidad a las heces. Pueden pasar varios meses o años antes de que se desarrolle diarrea con dolor abdominal. Los síntomas tardíos incluyen fatiga intensa, pérdida de peso, pérdida del apetito, fiebre y ocasionalmente artralgia.

El camino hacia un diagnóstico de colitis ulcerosa establecido incluye con frecuencia un estudio meticuloso de la historia clínica del paciente, la exclusión de otros estados, así como varias pruebas, por ejemplo análisis de sangre, examen de las heces, rayos X con enema de bario, sigmoidoscopia, colonoscopia y biopsia. La biopsia puede realizarse como parte de un examen mediante sigmoidoscopia o colonoscopia.

Es obvio que una posibilidad de distinguir clínicamente CU de EC del colon en un estadio temprano proporcionaría enormes beneficios tanto para el paciente como para el médico. Permitiría diseñar regímenes de tratamiento precisos, evitar medicaciones innecesarias y reducir los costes del tratamiento. Aunque el cuadro clínico global en pacientes con EII pueda mostrar algunas diferencias clínicamente importantes entre los principales grupos de pacientes con CU y EC, existen similitudes sustanciales, haciéndose así difícil para el personal sanitario establecer un diagnóstico correcto.

50 Técnica anterior

La técnica anterior indica que los métodos disponibles para distinguir entre las formas de EII, y en particular la diferenciación entre CU y EC, aparte de los ejemplos dados anteriormente de diferentes procedimientos de examen, se han centrado en métodos basados en anticuerpos.

Por ejemplo, el documento WO 03/036262 describe un método y aparato para la diferenciación de enfermedad de Crohn de otras afecciones gastrointestinales, tales como colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable, usando la presencia de anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) fecales como marcador para la enfermedad de Crohn. El aparato incluye un inmunoensayo ligado a enzimas u otro inmunoensayo que utiliza anticuerpos específicos frente a inmunoglobulinas humanas para la medición de los ASCA endógenos totales en una muestra fecal humana. El método y aparato pueden usarse por los profesionales sanitarios para distinguir la enfermedad de Crohn de otras afecciones gastrointestinales, tales como colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable.

El documento WO 01/58927 describe métodos de diagnóstico para detectar enfermedades asociadas con una respuesta autoantigénica frente a hTM en tejido afectado, y en particular colitis ulcerosa.

Sigue existiendo una necesidad de métodos mejorados para el diagnóstico preciso, rápido y fiable de la colitis ulcerosa, en particular en el contexto de distinguir entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn en pacientes con EII.

Un objetivo de la presente invención es hacer disponibles tales métodos y kits para este fin. Un objetivo particular es hacer disponible un método y un kit que hagan posible alcanzar un diagnóstico fiable en un estadio temprano de la enfermedad. Otro objetivo es hacer posible distinguir entre EC y CU también en casos difíciles, en los que el cuadro clínico puede ser muy similar.

Objetivos adicionales que subyacen a la invención, así como las soluciones ofrecidas por la invención y las ventajas asociadas resultarán evidentes para un experto tras el estudio de la descripción, los ejemplos y las reivindicaciones.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la diferenciación entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn se hace posible mediante un enfoque de múltiples genes en el que se estudian los perfiles de expresión génica en muestras de biopsia obtenidas a partir de zonas inflamadas y opcionalmente también no inflamadas en los intestinos de un paciente.

La presente invención se basa en el descubrimiento de posibles genes marcadores que, o bien conjuntamente o bien en subgrupos, son indicativos del estado humano de colitis ulcerosa (CU). Los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que la cuantificación de los niveles de expresión de varios genes específicos puede utilizarse para diagnosticar de manera precisa y sencilla a partir de una biopsia, si el paciente está aquejado del estado de CU o, por ejemplo, enfermedad de Crohn.

Más específicamente, se proporcionan métodos que permiten la amplificación de ácido nucleico de siete (7) marcadores genéticos diferenciados o subgrupos de los mismos, usando cebadores específicos de gen preseleccionados que permiten la semicuantificación de los niveles de expresión de dichos marcadores genéticos. Se determinan los niveles de expresión de al menos dos de los marcadores genéticos seleccionados de SLC6A14, SLC26A2, GRO1, MMP-7, MAP-17, GISP y Vanin-1. Los cebadores específicos de gen están diseñados para hibridarse con cadenas opuestas del ADN que codifica para el marcador genético de interés de manera que a través de amplificación por PCR se produce una región definida del ADN codificante del gen de marcador genético. Se proporcionan un ensayo y un kit para la detección y monitorización del estado de expresión de dichos siete genes marcadores o subconjuntos de los mismos en una muestra biológica. El ensayo es un ensayo basado en PCR, no en cultivo, para la detección de dichos genes marcadores.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se describirá en mayor detalle en la siguiente descripción y ejemplos, con referencia a los dibujos en los que

La figura 1 muestra el análisis por RT-PCR del estado de expresión de siete genes marcadores en muestras de biopsia de pacientes aquejados de o bien colitis ulcerosa (CU) o bien de enfermedad de Crohn (EC). El protocolo experimental se resume en el ejemplo 6. (Claves: M, es un marcador de pares de bases, H, representa una biopsia de un individuo sano totalmente normal, I, representa una muestra de biopsia tomada de una zona inflamada, y N, representa una biopsia tomada de una zona no inflamada del mismo paciente. Los números en la parte inferior de la figura indican el número del paciente y las líneas negras verticales indican una muestra de biopsia N e I derivada del mismo paciente). Se usó gamma-actina como control de carga e indica el estado de expresión de un gen de mantenimiento usado comúnmente para demostrar una entrada de ARNm igual en todas las reacciones de RT-PCR.

Descripción detallada de la invención

Antes de darse a conocer y describirse la presente invención, ha de entenderse que un experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetivos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como aquellos objetivos, fines y ventajas inherentes al presente documento. Los presentes ejemplos, junto con los métodos, procedimientos, tratamientos, moléculas y compuestos específicos descritos en el presente documento son este momento representativos de realizaciones preferidas, son a modo de ejemplo, y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “cebador de ADN complementario” significa un oligonucleótido que se aparea con el molde de ARN en una orientación particular para permitir la síntesis de una cadena de ADN naciente en presencia de transcriptasa inversa en la muestra biológica en las condiciones descritas en el presente documento.

También tal como se usa en el presente documento, la “condición” en la que se sintetiza una cadena de ADN incluyen la presencia de nucleótidos, cationes y agentes de tamponamiento apropiados en cantidades y a temperaturas tales que el molde de ARN y el cebador de ADN se aparearán y se incorporarán oligonucleótidos a una cadena de ADN sintetizada si no se inhibe la transcriptasa inversa por el fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa. Se exponen condiciones a modo de ejemplo en los ejemplos a continuación. Las condiciones descritas se han optimizado a partir de otros protocolos de síntesis de RT/ADNc conocidos. Generalmente se sabe que pueden establecerse otras condiciones para la optimización de una reacción de transcriptasa inversa particular basándose en protocolos bien conocidos por un experto habitual en la técnica.

ES 2 356 599 T3

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “par de cebadores” se refiere a dos cebadores, denominándose uno directo y denominándose el otro inverso con respecto a sus orientaciones respectivas en una molécula de ADN bicatenaria que consiste en una secuencia sentido y antisentido, de manera que en las condiciones de amplificación descritas en el presente documento, el cebador directo se aparee con y ceba la amplificación de la secuencia sentido y el cebador inverso se aparee con y ceba la amplificación de la secuencia antisentido. Pueden seleccionarse cebadores para su uso en la reacción de amplificación basándose en, que tengan complementariedad mínima con otros cebadores en la reacción (para minimizar la formación de dímeros de cebadores) y que tengan valores de T_m con el intervalo de temperaturas de reacción apropiadas para el método de amplificación, preferiblemente PCR. Además, pueden seleccionarse cebadores para aparearse con regiones específicas del molde de ARN de manera que el tamaño del producto de amplificación de ADN resultante oscile desde 100 hasta 500 pares de bases de longitud, y lo más preferiblemente alrededor de 300 pares de bases de longitud.

Por ejemplo, en las condiciones descritas anteriormente, el par de cebadores puede consistir en el oligonucleótido de SEQ ID NO: 13 como cebador directo y el oligonucleótido de SEQ ID NO: 14 como cebador inverso.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “detectar” o “detección” del ADN amplificado se refieren a determinar cualitativa o cuantitativamente la presencia de la cadena de ADN amplificada, que sólo se sintetiza si la transcriptasa inversa es resistente al fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa añadido a la mezcla de ensayo. La amplificación del ADN sintetizado puede detectarse mediante cualquier método para la detección de ADN conocido en la técnica. Por ejemplo, la detección del ADN amplificado puede tener lugar mediante un ensayo de hibridación mediante transferencia de tipo Southern, mediante visualización de productos de amplificación de ADN de peso molecular específico en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, mediante la medición de la incorporación de nucleótidos radiomarcados en la cadena de ADN sintetizado mediante autorradiografía o medición de centelleo.

El método de detección preferido es mediante electroforesis en gel de agarosa usando tinción con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV.

Los principios de la PCR y las condiciones para la amplificación y detección de ácidos nucleicos diana se conocen bien en la técnica y pueden encontrarse en numerosas referencias conocidas por el experto, incluyendo, por ejemplo, los documentos U.S. 4.683.195; U.S. 4.683.202 y U.S. 4.965.188; todas concedidas a Mullis *et al.* En resumen, se calienta una muestra que se sospecha que contiene un ácido nucleico diana para desnaturalizar el ácido nucleico bicatenario en presencia de dos cebadores de oligonucleótido que son complementarios a las secuencias diana que flanquean la región que va a amplificarse. Los cebadores se aparean con las cadenas dianas separadas y se extienden desde cada extremo hidroxilo 3' mediante un agente de polimerización tal como una polimerasa termoestable. Puede amplificarse ADN bicatenario o monocatenario mediante PCR. ARN también puede servir como diana mediante transcripción inversa de ARN en ADNc.

Las etapas de desnaturalización, apareamiento de cebadores y síntesis de ADN se llevan a cabo a temperaturas diferenciadas, y ciclos repetidos dan como resultado una acumulación exponencial del ácido nucleico diana. El recipiente para PCR es generalmente una bolsa o una cubeta o un recipiente de plástico con tapón tal como se describe en el documento U.S. 5.229.297. Los reactivos para la amplificación por PCR se mezclan normalmente en un único recipiente, y generalmente incluyen cebadores, nucleósidos trifosfato (generalmente dATP, dCTP, dGTP y dTTP o dUTP), ADN polimerasa termoestable, tampón que contiene magnesio, y ácido nucleico diana. Los reactivos y condiciones para la PCR se conocen bien por un experto habitual en la técnica, y pueden encontrarse, por ejemplo, en Guatelli *et al.* (1989) Clin. Microbiol. Rev. 2:217. Para la amplificación de dianas de ARN, puede utilizarse una transcriptasa inversa además de o en lugar de la ADN polimerasa termoestable. Las transcriptasas inversas termoestables son particularmente útiles, ya que son ADN polimerasas termoestables que tienen actividad de transcriptasa inversa. Un experto habitual en la técnica conoce métodos para la amplificación por PCR de dianas de ARN y éstos se describen, por ejemplo, en los documentos U.S. 5.176.995, 5.310.652 y 5.322.770.

La detección del ADN amplificado mediante la PCR se lleva a cabo generalmente de manera que el ADN se somete a electroforesis usando gel de agarosa, gel de acrilamida o similares, y entonces se somete a tinción con reactivos de tinción específicos para ácidos nucleicos. En el caso de la detección de ADN bicatenario, habitualmente se deja que entre un reactivo fluorescente tal como bromuro de etidio entre las dos cadenas del ADN y entonces se excita el reactivo fluorescente mediante una fuente de luz ultravioleta. Debido a que el bromuro de etidio que entra entre las dos cadenas del ADN emite fluorescencia, la detección se realiza por medio de captura de fluorescencia con una cámara CCD o similar.

El objeto de la presente invención se logra mediante la amplificación, por PCR, de siete genes marcadores específicos o subconjuntos de los mismos y posterior separación mediante electroforesis de los productos de esta amplificación, seguido de técnicas de coloración apropiadas que permiten una visualización adecuada del ADN en el gel incluyendo, pero sin limitarse a: coloración con sales de plata, radioisótopos y enzimas combinadas con sustratos que permiten su detección.

Un objeto de ciertas realizaciones de la presente invención es proporcionar un método de llevar a cabo reacciones de amplificación de ácido nucleico en una única cámara de reacción mediante lo cual se hibridan pares de cebadores internos con regiones opuestas de dichos genes de marcador genético diana, y la amplificación se produce mediante reacción en cadena de la polimerasa.

ES 2 356 599 T3

Se diseñaron pares de cebadores de control interno para hibridarse con cadenas opuestas de un gen de mantenimiento de control adecuado de manera que pueden realizarse comparaciones semicuantitativas. Un gen de mantenimiento preferido de este tipo puede ser actina, GADPH, o factores de elongación. Midiendo la intensidad de la señal de control interno y comparándola con las señales proporcionadas por dichos genes de marcador genético, puede determinarse el grado de cambio de expresión de dicho gen de marcador genético a partir de los niveles de expresión normales (es decir aquellos niveles en los que no está presente ningún estado patológico).

En el método de la presente invención, la amplificación por PCR se logra incubando previamente todos los reactivos de PCR y una muestra que contiene un ácido nucleico diana en presencia de cebadores específicos de gen apropiados y una enzima polimerasa termoestable. La mezcla de reacción resultante se calienta cíclicamente en condiciones que permiten la formación y amplificación de productos de extensión de cebador.

Los expertos en la técnica conocen los reactivos requeridos para la PCR, y generalmente incluyen al menos dos cebadores de oligonucleótido que son suficientemente complementarios a las regiones conservadas del ácido nucleico diana para hibridarse con las mismas, cuatro nucleósidos trifosfato diferentes, un agente de polimerización termoestable y cualquier cofactor requerido para el agente de polimerización. Nucleósidos trifosfato preferidos son los desoxirribonucleósidos trifosfato dATP, dCTP, dGTP y dTTP o dUTP, denominados conjuntamente dNTP. Nucleósidos trifosfato se encuentran comercialmente disponibles.

Los cebadores incluyen oligonucleótidos que se producen de manera natural o producidos de manera sintética que pueden aparearse con el ácido nucleico diana y que actúan como el punto de iniciación de síntesis de ácido nucleico en condiciones apropiadas, es decir, en presencia de nucleósidos trifosfato, un agente de polimerización, tampón, pH y temperatura adecuados. Los cebadores tienen secuencias suficientemente complementarias al ácido nucleico diana para hibridarse con el mismo, y son de longitud suficiente, normalmente desde 10-60 nucleótidos, para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia de un agente de polimerización. Los cebadores pueden producirse sintéticamente mediante síntesis automatizada mediante métodos bien conocidos para un experto habitual en la técnica.

En la técnica se conocen bien consideraciones de diseño para los cebadores. Los cebadores se seleccionan para que sean sustancialmente complementarios a las secuencias de las cadenas del ácido nucleico específico que va a amplificarse, de manera que el producto de extensión sintetizado a partir de un cebador, cuando se separa de su complemento, puede servir como molde para el producto de extensión del otro cebador. Preferiblemente, los cebadores son exactamente complementarios con la región diana. Se destaca que los pares de cebadores dados en la presente memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones pueden sustituirse por cebadores funcionalmente equivalentes, que muestren especificidad para los genes marcadores, sin apartarse del alcance de la invención.

Los inventores han identificado inesperadamente siete (7) genes marcadores cuyos cambios específicos en el estado de expresión, conjuntamente o en subconjuntos, es indicativo del estado de la enfermedad inflamatoria del intestino, CU. Esto brinda la posibilidad de un protocolo de detección rápida a nivel molecular diseñado para ayudar al médico que examina a afirmar correctamente el tipo de enfermedad.

El perfil de expresión en tejido inflamado y no inflamado se muestra a modo de ejemplo en la figura 1 y en la tabla 1 a continuación.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Perfiles de expresión en tejido inflamado y no inflamado

Gen marcador	Tejido inflamado		Tejido no inflamado	
	Colitis ulcerosa	Enfermedad de Crohn	Colitis ulcerosa	Enfermedad de Crohn
SLC6A14	X	-	-	X
SLC26A2	-	X	XX	X
GRO1	X	-	-	X
MMP-7	XX	-	X	-
MAP-17	X	-	-	X
GISP	XX	X	X	XX
Vanin-1	X	(X)	-	X
Gamma-actina (control)	X	X	X	X
X y XX indican el grado de expresión; (X) indica un resultado que es posible que se desprecie a la luz de la imagen global; - indica falta de expresión				

Los marcadores genéticos son familia 6 de portadores de solutos, miembro 14 (SLC6A14), familia 26 de portadores de solutos, miembro 2 (SLC26A2), oncogén alfa relacionado con el crecimiento quimiocina CXC (Gro-alfa) o (CXCL-1), matrilisina también conocida como metaloproteínasa 7 de matriz (MMP-7), proteína secretora gastrointestinal (GISP) también conocida como gen regenerador de tipo IV (Reg IV), proteína 17 asociada a la membrana (MAP-17), y vanin-1. Véase la tabla 2.

TABLA 2

Genes de marcador genético diana

SEQ.ID.NO.1 (n.º de registro de GeneBank NM-007231)

SEQ.ID.NO.2 (n.º de registro de GeneBank NM-000112)

SEQ.ID.NO.3 (n.º de registro de GeneBank NM-001511)

SEQ.ID.NO.4 (n.º de registro de GeneBank BC003635)

SEQ.ID.NO.5 (n.º de registro de GeneBank NM-005764)

SEQ.ID.NO.6 (n.º de registro de GeneBank BC017089)

SEQ.ID.NO.7 (n.º de registro de GeneBank NM-004666)

Los agentes de polimerización son compuestos que funcionan para lograr la síntesis de los productos de extensión de cebador. Los agentes de polimerización son termoestables, es decir, no se inactivan permanentemente cuando se calientan durante breves periodos hasta las temperaturas usadas normalmente en la PCR para la desnaturación de las cadenas de ADN, por ejemplo, 93-95°C, y preferiblemente son activos a alta temperaturas. En una realización preferida el agente de polimerización es una ADN polimerasa termoestable, incluyendo, por ejemplo, ADN polimerasa obtenida de bacterias termófilas tales como, *Thermococcus litoralis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Methanothermus fervidus*, *Thermus aquaticus*, *T. filiformis*, *T. flavus*, *T. lacteus*, *T. ruhens*, *T. ruber* y *T. thermophilus*;

ES 2 356 599 T3

o de arqueobacterias termófilas tales como *Desulfurococcus mobilis*, *Methanobacterium thermoautotrophilicum*, *Sulfolobus solfataricus*, *S. acidocaldarius* y *Thermoplasma acidophilum*. En una realización más preferida, el agente de polimerización es polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq), polimerasa de *T. thermophilus* (Tth) o polimerasa de *Thermococcus litoralis*. También se contemplan como agentes de polimerización transcriptasa inversa termoestable y ADN polimerasas que tienen actividad de transcriptasa inversa.

Las polimerasas termoestables pueden obtenerse comercialmente o mediante métodos conocidos en la técnica. En particular, Taq polimerasa se encuentra comercialmente disponible de forma recombinante y nativa (Perkin Elmer-Cetus) o puede producirse mediante el método descrito por Lawyer *et al.*, (1989) o en el documento U.S. 4.889.818. Tth polimerasa se encuentra comercialmente disponible de Finnzyme Co., Finlandia y de Toyobo Co., Japón. La polimerasa de *Thermococcus litoralis* se encuentra comercialmente disponible de New England Biolabs y puede producirse mediante el método descrito en el documento U.S. 5.322.785.

Pueden incluirse anticuerpos específicos para los agentes de polimerización termoestables en la etapa de amplificación previa para inhibir el agente de polimerización antes de la amplificación. Pueden producirse anticuerpos mediante métodos conocidos por un experto habitual en la técnica y que se encuentran, por ejemplo, en Harlowe *et al.* (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY. Según la presente invención, el término anticuerpos incluye anticuerpos monoclonales y policlonales producidos mediante metodologías convencionales, anticuerpos producidos de manera recombinante, y fragmentos de anticuerpos producidos de manera química o recombinante, tales como los fragmentos Fab. En una realización preferida, los anticuerpos son monoclonales.

En una realización preferida el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal frente a Taq polimerasa, Tth polimerasa, o polimerasa de *Thermococcus litoralis*. En una realización más preferida, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal frente a Taq polimerasa. En la técnica se conocen anticuerpos monoclonales frente a Taq polimerasa y se describen, por ejemplo, en el documento U.S. 5.338.671. Según la presente invención, anticuerpos definidos como específicos para agente de polimerización son aquellos anticuerpos que pueden inhibir la actividad enzimática del agente de polimerización a temperaturas de desde aproximadamente 20-40°C. Los anticuerpos de la invención se inactivan a las temperaturas elevadas usadas durante los ciclos térmicos de la PCR. La capacidad de los anticuerpos para inhibir la actividad enzimática de la puede determinarse mediante ensayos conocidos por un experto habitual en la técnica, tal como se describe, por ejemplo, por Sharkey *et al.*, (1994).

La presente descripción proporciona un método para la amplificación de un ácido nucleico diana, y opcionalmente, la detección posterior del ácido nucleico, en una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana. La muestra puede ser cualquier muestra que se sospecha que contiene un ácido nucleico diana, incluyendo, por ejemplo, una muestra de tejido, sangre, pelo, fluido corporal, bacterias, virus, hongos, célula infectada por bacterias, célula infectada por virus, etc. El ácido nucleico diana puede ser ADN o ARN. Debe conocerse un número suficiente de bases a ambos extremos de la secuencia que va a amplificarse con el fin de diseñar cebadores que pueden hibridarse con las diferentes cadenas del ácido nucleico diana en posiciones adecuadas para la amplificación por PCR. El ácido nucleico diana puede extraerse o extraerse parcialmente de la muestra de tejido antes de la PCR, por ejemplo, eliminando proteínas o material celular de la muestra. Un experto habitual en la técnica conoce métodos para extraer ácidos nucleicos de las muestras y éstos pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, (1989) y Saiki *et al.*, (1985).

En una realización preferida, se prefieren particularmente con fuente de material biopsias resecaadas del sistema gastrointestinal y de una zona que se cree que presenta signos de la enfermedad.

En el método de amplificación, se pone en contacto la muestra o una preparación de ácidos nucleicos extraídos de la muestra con los reactivos usados normalmente para la PCR, incluyendo al menos dos cebadores de oligonucleótido modificados para que contengan al menos un enlace fosforotioato, cuatro nucleósidos trifosfato diferentes, un agente de polimerización termoestable, y un tampón apropiado, y adicionalmente con una exonucleasa para formar una mezcla de reacción. En otra realización, se incluye en la mezcla un anticuerpo específico para el agente de polimerización.

Los reactivos para PCR convencionales, incluyendo cebadores, nucleósidos trifosfato, agente de polimerización, y tampón apropiado se utilizan a concentraciones generalmente apropiadas para la PCR y conocidas por un experto habitual en la técnica. En una realización preferida, los nucleósidos trifosfato son dATP, dCTP, dGTP y dTTP. En una realización preferida el agente de polimerización es una ADN polimerasa termoestable. ADN polimerasas preferidas son Taq polimerasa, Tth polimerasa y polimerasa de *Thermococcus litoralis*. Se prefiere particularmente Taq polimerasa.

El método de amplificación se lleva a cabo preferiblemente de manera continua, automatizada. El experto habitual conoce bien la instrumentación apropiada para la PCR automatizada y ésta se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 4.965.188, 5.089.233 y 5.229.297. El experto también puede detectar fácilmente el producto amplificado, por ejemplo, separando los productos de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa y visualizando mediante tinción con bromuro de etidio, o detectando mediante hibridación con una sonda marcada que puede hibridarse con el ácido nucleico amplificado o una variedad de otros métodos de detección bien conocidos por un experto habitual en la técnica.

Por tanto, una realización de la invención es un método para la diferenciación entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn basándose en el análisis de perfiles de expresión génica en muestras de biopsia obtenidas a partir de zonas

ES 2 356 599 T3

inflamadas y no inflamadas en los intestinos de un paciente, en el que se determinan los niveles de expresión de al menos dos de varios genes marcadores, seleccionándose dichos al menos dos genes marcadores de SEQ.ID.NO. 1, SEQ.ID.NO. 2, SEQ.ID.NO. 3, SEQ.ID.NO. 4, SEQ.ID.NO. 5, SEQ.ID.NO. 6, y SEQ.ID.NO. 7.

5 Otra realización de la invención es un método en el que se determinan los niveles de expresión de SEQ.ID.NO. 1 y SEQ.ID.NO. 2 y en el que la expresión de SEQ.ID.NO. 1 en tejido inflamado y la falta de expresión en tejido no inflamado, junto con la falta de expresión de SEQ.ID.NO. 2 en tejido inflamado se considera una indicación de colitis ulcerosa.

10 Una tercera realización de la invención es un método en el que se determinan los niveles de expresión de SEQ.ID.NO. 1, SEQ. ID.NO. 2 y SEQ. ID.NO. 3, y en el que la expresión de SEQ.ID.NO. 1 en tejido inflamado y la falta de expresión en tejido no inflamado, junto con la falta de expresión de SEQ.ID.NO. 2 en tejido inflamado, y la expresión de SEQ. ID.NO. 3 en tejido inflamado y la falta de expresión en tejido no inflamado, se considera una indicación de colitis ulcerosa.

15 Una cuarta realización es un método en el que se determinan los niveles de expresión de SEQ.ID.NO. 1, SEQ.ID.NO. 2 y SEQ. ID.NO. 4, y en el que la expresión de SEQ.ID.NO. 1 en tejido inflamado y la falta de expresión en tejido no inflamado, junto con la falta de expresión de SEQ.ID.NO. 2 en tejido inflamado, y la expresión de SEQ.ID.NO. 4 en tejido inflamado y la falta de expresión en tejido no inflamado, se considera una indicación de colitis ulcerosa.

20 Una quinta realización es un método en el que se determinan los niveles de expresión de SEQ.ID.NO. 1 a 7, y en el que la expresión de SEQ.ID.NO. 1, 3, 4, 5, 6 y 7 en tejido inflamado y la falta de expresión en tejido no inflamado, junto con la falta de expresión de SEQ. ID. NO. 2 en tejido inflamado, se considera una indicación de colitis ulcerosa.

25 Según una realización preferida, el método según una cualquiera de las realizaciones anteriores incluye una etapa en la que se determina el nivel de expresión de cada gen marcador a través de amplificación de ácido nucleico de dichos genes usando cebadores específicos de gen, y determinación de los resultados de amplificación. La amplificación de ácido nucleico se realiza preferiblemente usando PCR y los cebadores específicos de gen preferiblemente seleccionados de SEQ.ID.NO. 13-26.

La determinación de los resultados de amplificación se realiza preferiblemente usando tinción con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV.

35 La presente descripción proporciona además un kit para PCR que comprende, en el mismo recipiente o recipientes separados, un agente de polimerización termoestable, y pares de cebadores diseñados para permitir la amplificación por PCR de dichos genes diana. También pueden proporcionarse recipientes adicionales para la inclusión de, por ejemplo, anticuerpos adicionales específicos para el agente de polimerización de PCR y reactivos para PCR, incluyendo, por ejemplo, nucleósidos trifosfato, cebadores y tampones.

40 En consecuencia, la presente invención hace disponible un kit para la diferenciación entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn basándose en el análisis de perfiles de expresión génica en muestras de biopsia obtenidas a partir de zonas inflamadas y no inflamadas en los intestinos de un paciente, incluyendo dicho kit pares de cebadores específicos de gen dirigidos a al menos dos genes marcadores seleccionados de SEQ.ID.NO. 1, SEQ.ID.NO. 2, SEQ.ID.NO. 3, SEQ.ID.NO. 4, SEQ.ID.NO. 5, SEQ.ID.NO. 6 y SEQ.ID.NO. 7.

Dichos pares de cebadores específicos de gen se seleccionan preferiblemente de SEQ.ID.NO. 13 y SEQ.ID.NO. 14; SEQ.ID.NO. 15 y SEQ.ID.NO. 16; SEQ.ID.NO. 17 y SEQ.ID.NO. 18; SEQ.ID.NO. 19 y SEQ.ID.NO. 20; SEQ.ID.NO. 21 y SEQ.ID.NO. 22; SEQ.ID.NO. 23 y SEQ.ID.NO. 24; y SEQ.ID.NO. 25 y SEQ.ID.NO. 26.

50 Según una realización de la invención, dichos cebadores específicos son SEQ.ID.NO. 13 y SEQ.ID.NO. 14; SEQ.ID.NO. 15 y SEQ.ID.NO. 16; y SEQ.ID.NO. 17 y SEQ.ID.NO. 18.

55 Según otra realización de la invención, dichos cebadores específicos son SEQ.ID.NO. 13 y SEQ.ID.NO. 14; SEQ.ID.NO. 15 y SEQ.ID.NO. 16; y SEQ.ID.NO. 19 y SEQ.ID.NO. 20.

60 El kit según la invención preferiblemente comprende además un agente de polimerización termoestable y cofactor(es) requerido(s). En una realización preferida el agente de polimerización es una ADN polimerasa. En una realización más preferida la polimerasa es Taq polimerasa, Tth polimerasa, o polimerasa de *Thermococcus litoralis*. Se prefiere particularmente Taq polimerasa. El anticuerpo preferido es un anticuerpo monoclonal específico para Taq polimerasa.

65 Los cebadores de oligonucleótido preferiblemente son de 19-25 nucleótidos de longitud y están diseñados como pares de cebadores que en condiciones convencionales se aparearán con el ADN diana de dichos genes de marcador genético. En este caso se proporcionan siete pares de cebadores que permitirán la amplificación satisfactoria de dichos siete genes de marcador genético. Los cebadores específicos usados se presentan en la tabla 3.

ES 2 356 599 T3

TABLA 3

Pares de cebadores

5	SLC6A14 (dir.) 5'-GTG CTG AGA TTA CAG GTG TGA GCC-3' (SEQ.ID.NO.13)
	SLC6A14 (in.) 5' -CCC TTC ACA CCT CCC CCA ATT AGA-3' (SEQ.ID.NO.14)
	SLC26A2 (dir.) 5'-GTG GAG AGA GGG AAA GAA TGT TGC-3' (SEQ.ID.NO.15)
10	SLC26A2 (in.) 5'-CCA GTT TAG GAC AGA TTC CAT GGG-3' (SEQ.ID.NO.16)
	GRO1 (dir.) 5'-GTG CCT AAT GTG TTT GAG CAT CGC-3' (SEQ.ID.NO.17)
15	GRO1 (in.) 5'- GCC CCT TTG TTC TAA GCC AGA AAC-3' (SEQ.ID.NO.18)
	MMP7 (dir.) 5'-CAG GCA GAA CAT CCA TTC ATT CAT TC-3' (SEQ.ID.NO.19)
	MMP7 (in.) 5'- GAC ATC TAC CCA CTG CAA GTA TAG-3' (SEQ.ID.NO.20)
20	MAP17 (dir.) 5'-CCG TCG GAA ACA AGG CAG ATG GAG-3' (SEQ.ID.NO.21)
	MAP17 (in.) 5'-GAA GGA CGT GTG AGC AGG ATG GGA-3' (SEQ.ID.NO.22)
	GISP (dir.) 5'- GGT GGG AAC AAG CAC TGT GCT GAG-3' (SEQ.ID.NO.23)
25	GISP (in.) 5'- GGC TGG AGA TGC ACT CTT CTA GAC-3' (SEQ.ID.NO.24)
	Vanin1 (dir.) 5'- GCC AGC AAA ACA TCA TTT TGA GAC-3' (SEQ.ID.NO.25)
30	Vanin1 (in.) 5'- GCC TAT CAC CAA CAC ATC AAT ATG-3' (SEQ.ID.NO.26)

Los marcadores genéticos dados a conocer son, familia 6 de portadores de solutos, miembro 14 (SLC6A14), tal como se facilita mediante SEQ.ID.NO.1, familia 26 de portadores de solutos, miembro 2 (SLC26A2) tal como se facilita mediante SEQ.ID.NO. 2, oncogén alfa relacionado con el crecimiento quimiocina CXC (Gro-alfa) o (CXCL-1) tal como se facilita mediante SEQ.ID.NO. 3, matrilisina también conocida como metaloproteínasa 7 de matriz (MMP-7) tal como se facilita mediante SEQ.ID.NO. 4, proteína 17 asociada a la membrana (MAP-17) tal como se facilita mediante SEQ.ID.NO. 5, proteína secretora gastrointestinal (GISP) también conocida como gen regenerador de tipo IV (Reg IV) tal como se facilita mediante SEQ.ID.NO. 6 y Vanin-1 tal como se facilita mediante SEQ.ID.NO. 7. Véase la tabla 2, citada anteriormente.

En los métodos ilustrados mediante los ejemplos se usaron varias secuencias basadas en el método. Éstas se presentan en la tabla 4.

TABLA 4

Secuencias basadas en el método

50	(SEQ. ID. NO. 8.)	5'-TAG TCT ATG ATC GTC GAC GGC TGA TGA AGC GGC CGC TGG AGT TTT TTT TTT TTT TTT TTV-3'
	(SEQ. ID. NO. 9)	5'-TGA TGA AGC GGC CGC TGG-3'
55	(SEQ. ID. NO. 10)	5'-TTC ATC AGC CGT CGA CGA TC-3'
	(SEQ. ID. NO. 11)	5'-CGT AAG CTT GGA TCC TCT AGA GC-3'
60	(SEQ. ID. NO. 12)	5'-TGC AGG TAC CGG TCC GGA ATT CC-3'

Las proteínas portadoras de solutos (SLC) están comprendidas por una familia muy grande de moléculas de transporte dependiente de la energía y tienen papeles fisiológicos críticos en el transporte de nutrientes y pueden utilizarse como mecanismo para aumentar la absorción de fármacos. Sin embargo, existe una comprensión limitada de estas proteínas a nivel molecular debido a la ausencia de estructuras cristalinas de alta resolución.

ES 2 356 599 T3

En total, el 1-2% de los adultos y el 6-8% de los niños que padecen de cálculos renales tienen cistinuria, un defecto en el transporte de aminoácidos que conduce a altas concentraciones de cistina en la orina. Se ha implicado a dos genes, familia 3 de portadores de solutos transportador de aminoácidos (cistina, básicos y) neutros, miembro 1 (SLC3A1) que codifican para la proteína relacionada con el sistema de transportador de aminoácidos, y familia 7 de portadores de solutos, miembro 9 (SLC7A9). Se cree que estos dos portadores de solutos están implicados en la formación de cálculos que en última instancia pueden conducir infección de las vías urinarias y, finalmente, insuficiencia renal.

El portador de solutos SLC6A14 se identificó y se clonó por primera vez por Sloan *et al.*, 1999 en glándula mamaria de seres humanos. Sloan *et al.* mostraron una fuerte expresión en el pulmón y glándulas salivares y en menor medida en el útero, próstata, estómago, glándula mamaria e hipófisis. En este punto el gen se conocía todavía como transportador hATB⁰⁺. SLC6A14 (o hATB⁰⁺) es un transportador de aminoácidos catiónicos y neutros dependiente de Na⁺ y Cl⁻ (Bode, 2001). En el documento WO 2002/014500, SLC6A14 se identifica en el colon humano (véase la tabla 2 y 3A, SEQ ID NO. 738).

El gen de portador de solutos SLC26A2 (también denominado DTDST) se clonó por Hästbacka, 1996 y se dio a conocer su función como transportador de sulfato. En Rossi, 2001, se dan a conocer mutaciones en SLC26A2 y su participación en estados de displasia ósea. En Haila *et al.* se identificó la expresión del gen SLC26A2, con el nombre DTDST, en el epitelio de la cripta superior de la mucosa del colon.

Los inventores han identificado los dos portadores de solutos conocidos (SLC6A14 y SLC26A2) cuya expresión se ve significativamente alterada en la EII. Según saben los inventores, esta es la primera notificación de la posible participación de los portadores de solutos en enfermedades inflamatorias del intestino. Por tanto, es un hallazgo novedoso que los portadores de solutos puedan contribuir a la patología de la EII.

El oncogén alfa relacionado con el crecimiento quimiocina CXC (Gro-alfa también conocido como GRO1) es tal como se describe una citocina y como tal puede alterar las respuestas migratorias de numerosos tipos de células en zonas localizadas de inflamación. Se ha descrito que se sobreexpresa en córneas inflamadas humanas (Spandau *et al.*, 2003) y además, se ha mostrado que ratas que se han inducido químicamente para presentar inflamación del intestino muestran niveles regulados por incremento de GRO1 (Hirata *et al.*, 2001). Usando un enfoque de micromatriz de ADNc, Heller *et al.*, 1997 describe la participación novedosa de la quimiocina Gro alfa en la artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria del intestino, sin embargo la invención presentada en el presente documento, según saben por primera vez los inventores, que GRO1, aunque se sobreexpresa en estados de CU, se regula por disminución en estados de EC. Aunque en Isaacs *et al.*, 1992, se describe que la expresión de GRO1 en CU es mayor que la observada en EC, en este caso se ha demostrado que existe una correlación inversa de CU frente a EC con respecto a los niveles de expresión de GRO1. Por último, Lawrence *et al.*, 2001 describe la identificación de que GRO1 se regula por incremento en CU, pero el diseño del estudio fue tal que las muestras de biopsia se reunían antes del análisis, por tanto no fue posible saber si GRO1 se regulaba por incremento en más de 1 paciente.

Matrilisina o (metaloproteinasa 7 de matriz) se descubrió por primera vez en el útero de rata en involución; se ha conocido también como metaloproteinasa uterina, metaloproteinasa putativa (Pump-1), y metaloproteinasa 7 de matriz (MMP-7). Es el miembro más pequeño (28 kDa) de una familia de 15 MMP que juntas pueden degradar la mayoría de las macromoléculas de la matriz extracelular. Esta familia se revisa brevemente; todos los miembros son metaloproteinasas de zinc que aparecen en forma de zimógeno con el sitio activo de zinc bloqueado por cisteína. La matrilisina puede degradar una amplia gama de gelatinas, proteoglicanos y glicoproteínas de la matriz y pueden activar varias MMP distintas incluyendo colagenasa (revisado en Woessner, 1996).

Se expresa frecuentemente en diversos tipos de cáncer incluyendo cánceres de colon, estómago, próstata y cerebral. Estudios previos han sugerido que la matrilisina desempeña papeles importantes en la progresión y la metástasis del cáncer de colon. Recientemente se ha descrito por Newell *et al.*, 2002 que existe un aumento en la expresión de matrilisina en diferentes fases de neoplasia asociada con CU. Sin embargo, este trabajo no determina si tal aumento de expresión es un resultado de CU o si más bien se debe a la presencia de neoplasia.

Se han determinado expresiones de MAP 17 (también conocido como DD96) a niveles significativos sólo en una única población de células epiteliales, las células epiteliales tubulares proximales del riñón. También se expresaba de manera difuminada en diversos carcinomas que se originaban en riñón, colon, pulmón y mama. En tejidos normales, MAP 17 se expresa en cantidades significativas sólo en el riñón, donde se localizaba en el ribete en cepillo de células epiteliales tubulares proximales. Sin embargo, MAP17 se expresa abundantemente en carcinomas que surgen de riñón, colon, pulmón y mama, en algunos casos con una distribución glandular apical asociada a la membrana (Kocher, 1996). También se ha mostrado que el gen se expresa en queratinocitos humanos y que podría estar implicado en la fisiología y patología epidérmica (Jaeger, 2000). No se ha mostrado ninguna conexión con la inflamación o la EII.

Proteína secretora gastrointestinal (GISP, tal como se mencionó anteriormente conocida también como RegIV), tiene un patrón de expresión restringido, con expresión destacada en el sistema gastrointestinal. También se ha mostrado que RegIV se regula por incremento significativamente mediante lesión en la mucosa a partir de enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa activa (Hartupée *et al.*, 2001). Hartupée *et al.* no da a conocer ninguna diferencia en la expresión en -las dos enfermedades. El nivel de expresión de GISP se ha identificado también como un marcador para el cáncer de estómago (documento JP2002-209600) comparándose el nivel de GISP en una muestra biológica con un nivel umbral y correlacionándose con el riesgo de desarrollar cáncer de estómago.

ES 2 356 599 T3

La panteteinasa (EC 3.5.1.) es una enzima ubicua que se ha demostrado que *in vitro* recicla ácido pantoténico (vitamina B5) y produce cisteamina, un potente antioxidante. La enzima se codifica por el gen Vanin-1 y se expresa ampliamente en tejidos de ratón. Vanin-1 es una panteteinasa anclada a GPI, y en consecuencia una ectoenzima. Se ha sugerido que Vanin/panteteinasa podrían estar implicados en la regulación de algunas funciones inmunitarias, quizás en el contexto de la respuesta al estrés oxidativo (Pitari *et al.*, 2000).

Según saben los inventores, esta es la primera descripción del posible papel Vanin-1 en la EII.

Aunque la presente invención se ha descrito con especificidad según algunas de sus realizaciones preferidas, los siguientes ejemplos pretenden sólo ilustrar la invención y no limitar la misma. Aunque son típicos de métodos y etapas de método que podrían usarse, pueden adoptarse otros conocidos por los expertos en la técnica sin recurrir a experimentación indebida.

15 Ejemplos

Ejemplo 1

20 *Recogida de material de biopsia*

Las biopsias se tomaron de pacientes que se seleccionaron basándose en evidencias clínicas y patológicas de tener el estado inflamatorio de EC o CU. Se recogieron un total de tres biopsias en un sitio inflamado del colon, junto con tres muestras de biopsia de una región no inflamada de un solo paciente individual. Esto se realizó para un total de 16 pacientes diferentes de los que a ocho se les diagnosticó EC (paciente 1-8) y a ocho CU (paciente 9-16). El grupo de pacientes con CU comprendía 2 mujeres y 6 hombres, siendo el intervalo de edades de 29-77 años. El grupo de edades con EC, de manera correspondiente, 3 mujeres y 5 hombres, intervalo de edades 27-59.

Se reunieron las biopsias de cada sitio anatómico de un paciente y se aisló el ARN total usando el kit Rneasy de Quiagen y un homogeneizador Pellet Pestel Motor según el protocolo del fabricante. De este modo se aislaron 32 muestras de ARN total, dos muestras por paciente: inflamado (diana) y no inflamado (control).

Ejemplo 2

35 *Realización de la síntesis de ADNc del ARN*

Se usaron dos microgramos de cada muestra de ARN (32 en total) para una síntesis de la primera cadena de ADNc usando 10 pM del oligo-dT-cebador dT-unión (5'-TAG TCT ATG ATC GTC GAC GGC TGA TGA AGC GGC CGC TGG AGT TTT TTT TTT TTT TTT TTV-3' (SEQ. ID. NO. 8.) introduciendo en cada molécula de ADNc sintetizada tres sitios de corte de enzima de restricción: SalI, NotI y BpmI. El tampón, los desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y la enzima transcriptasa inversa (Superscript II) se adquirieron de Gibco BRL y las reacciones se realizaron según las directrices del fabricante. La mezcla de reacción para la síntesis de la primera cadena excluyendo la enzima se preincubó durante 5 min. a 65°C en una máquina para PCR (PCR sprint de Hybaid), se enfrió en hielo, y entonces se precalentó hasta 42°C, antes de añadirse la enzima Superscript II y se incubó durante 1 h a 42°C en una máquina para PCR (PCR sprint de Hybaid).

Para la síntesis de la segunda cadena, se añadieron 41 μ l de tampón para la segunda cadena a las reacciones según el protocolo proporcionado (Gibco BRL) y 4 μ l de Polimerasa I de *E. coli* (New England Biolabs), 1,5 μ l de ADN ligasa de *E. coli* (New England Biolabs) y 0,7 μ l de Rnase H (Gibco BRL) en un volumen total de 160 μ l. Se incubaron las reacciones durante 2,5 h a 16°C en la máquina para PCR PCR sprint y entonces se purificó usando el kit de purificación para PCR de Quiagen según el protocolo proporcionado. Se eluyó cada muestra (32 en total) con 32 μ l de tampón de elución y se usaron 26 μ l de cada muestra para las etapas siguientes.

55 Ejemplo 3

Amplificación de los extremos terminales 3' de los ADNc

Debido a las cantidades limitadas de material obtenido de tales biopsias, fue necesaria una etapa de amplificación previa. Para la amplificación *in vitro* del extremo 3' de los ADNc, se digirieron 26 μ l de ADNc de cada muestra con 10 U de la enzima de restricción DpnII en un volumen de 30 μ l durante 3 h a 37°C. Se purificaron los ADNc cortados una vez más usando el kit de purificación para PCR de Quiagen y se eluyeron los ADNc en 47 μ l de tampón de elución. Se realizó la siguiente etapa de ligación circular en un volumen de 50 μ l que incluían 44 μ l del ADNc cortado con DpnII y 2000 U de ADN ligasa de T4 (New England Biolabs). Se incubaron estas mezclas de reacción a 22°C durante 1 h, se inactivaron por calor mediante 65°C durante 10 min. y se usaron 25 μ l de cada mezcla de reacción para la etapa de amplificación. Se reunió una mezcla para 5 reacciones por muestra (5 x 50 μ l = 250 μ l en total) que contenía 25 μ l de ADNc (cortado con DpnII y ligado de manera circular), 25 μ l de tampón para PCR Advantage 2 PCR 10x (Clontech), 5 μ l de cebador unión-Not (10 pmol/ μ l; 5'-TGA TGA AGC GGC CGC TGG-3' (SEQ. ID. NO. 9)), 5 μ l de cebador

ES 2 356 599 T3

unión-Sal (10 pmol/ μ l; 5'-TTC ATC AGC CGT CGA CGA TC-3' (SEQ. ID. NO. 10), 5 μ l de mezcla de dNTP 10 mM y 5 μ l de Taq-Polimerasa Advantage 2 50x (Clontech). Para cada muestra se distribuyó la mezcla en 5 tubos de reacción para PCR y se realizó la PCR en las siguientes condiciones: 1 min. a 94°C entonces 16x (20 s a 94°C, 20 s a 55°C, 1 min. a 72°C).

5 Se retiraron cuatro de las reacciones por muestra y se colocaron en hielo y se determinó el número de ciclos óptimo con una de las reacciones por muestra. Se determinó que el número de ciclos óptimo era de 18 ciclos para las 32 muestras, por tanto para las cuatro reacciones restantes por muestra se realizaron dos ciclos adicionales [2x (20 s a 94°C, 20 s a 55°C, 1 min. a 72°C)]. Posteriormente se purificaron las 4 reacciones de PCR por muestra usando el kit de purificación para PCR de Quiagen. Para la purificación, se reunieron las cuatro reacciones por muestra (total de 200 mi) y entonces se eluyeron con 34 μ l de tampón de elución. Las reacciones purificadas fueron el material de partida para la identificación del protocolo de genes que se expresan de manera diferencial.

15 Ejemplo 4

Aislamiento del ADNc expresado de manera diferencial (protocolo sustracción) a partir de biopsias humanas

20 Se realizó el aislamiento de ADNc expresados de manera diferencial según el protocolo resumido en (von Stein O. D., 2001) con modificaciones minoritarias al protocolo.

Ejemplo 5

25 *Selección de los genes que se expresan de manera diferencial*

Tras la construcción de una biblioteca de ADNc, se sembraron en placa 2.000 clones a partir de cada sustracción en una placa de agar de 22 cm². A partir de esta placas se recogieron 384 colonias y se colocaron en placas de 384 pocillos con 70 μ l de medio LB/pocillo (véase Maniatis *et al.*, Molecular cloning laboratory book, apéndice A.1) (+ ampicilina 100 mg/ml) usando la máquina BioPick de BioRobotics (Cambridge, RU). Se incubaron los clones bacterianos durante la noche a 37°C y entonces se usaron para la PCR de las colonias. Esta PCR se realizó en placas para PCR de 384 pocillos en un volumen-de 20 μ l por muestra. Una reacción de PCR incluía: 2 μ l de tampón para PCR 10x, 0,4 μ l de cebador Sport-Not (10 pmol de 5'-CGT AAG CTT GGA TCC TCT AGA GC-3' (SEQ. ID. NO. 11), 0,4 μ l de cebador Sport-Sal (10 pmol 5'-TGC AGG TAC CGG TCC GGA ATT CC-3' (SEQ. ID. NO. 12)), 1,6 μ l de mezcla de dNTP (25 mM cada uno), 0,4 μ l de azul de bromofenol al 0,1% y 0,5 μ l de Taq-polimerasa DynAzyme (2 U/ μ l; Finnzyme). Se preparó una mezcla madre para todas las reacciones, se distribuyó y entonces se inoculó con 384 réplicas en plástico. Los parámetros de los ciclos de la PCR fueron: 2 min. a 94°C, 37 veces (30 s a 94°C; 30 s a 50°C, 1 min. a 72°C) y 5 min. a 72°C.

40 Tras la amplificación, se colocaron por puntos las reacciones de PCR sobre una membrana Hybond N+ (Amersham) usando Microgrid TAS de BioRobotics. Se colocaron por puntos todos los clones por duplicado y se usó ADN genómico como puntos guía. En un filtro se situaron 384 genes de las cuatro sustracciones. Se realizaron 24 duplicados para los análisis mediante hibridación con sondas de ADNc radioactivas diferentes.

45 Entonces se hibridaron estos filtros con los ADNc sustraídos marcados de manera radioactiva de los ocho pacientes. Se usaron dieciséis filtros en 16 experimentos de hibridación diferentes. Para esto se usaron 1 μ l de los ADNc para el mareaje con polimerasa de Klenow. El protocolo de hibridación fue el del protocolo de Church tal como se resume en (Maxam y Gilbert 1984).

50 Se usaron el aparato para obtención de imágenes Phospho-imager Fuji film BAS 1800II con el programa BAS 1800 III R y Array visión versión 6.0 (Imaging Research Inc) para determinar el grado de expresión de manera diferencial. Se secuenciaron los genes que se expresaron de manera diferencial en al menos tres de los ocho pacientes con una tasa de inducción o reducción de tres veces y se realizó un análisis de BLAST para identificar estos genes expresados de manera diferencial aislados.

55

Ejemplo 6

Confirmación de la expresión diferencial verdadera

60 Varios genes mostraron una fuerte desregulación durante estos análisis. Para confirmar estos datos se realizaron RT-PCR usando oligonucleótidos específicos de gen y material de ADNc sin amplificar derivado de los mismos ocho pacientes. Aproximadamente, se tomaron 2 μ g de ARN total de tejido inflamado y no inflamado (el mismo que se usó para la sustracción) para una síntesis de la primera cadena de ADNc tal como se describió en el ejemplo 5. Tras la síntesis del ADNc se incubaron las muestras durante 3 min. a 96°C y entonces se diluyó 1:10 con agua destinada.

65

ES 2 356 599 T3

Se tomaron 10 μ l de diluciones 1:10 adicionales para una reacción de PCR de 50 μ l. La reacción de PCR incluía: 5 μ l de tampón para PCR 10x, 1 μ l de cebador directo (10 pmol/ μ l) y 1 μ l de cebador inverso (10 pmol/ μ l) de los genes específicos (SEQ. ID. NO. 1-7), 0,5 μ l de mezcla de dNTP (25 mM cada uno) y 0,5 μ l de Taq-polimerasa DynAzyme (2 U/ml; Finnzyme). Se preparó una mezcla madre menos el ADNc para las reacciones, se distribuyó y entonces se añadió el ADNc. Los parámetros de los ciclos de PCR fueron: 1 min. a 94°C, 26-35 veces (30 s a 94°C; 30 s a 55°C, 1 min. a 72°C) y 5 min. a 72°C. El número de ciclos dependía de qué fragmentos de genes se amplificaban. Los pares de cebadores fueron los mostrados en la tabla 3.

Estos análisis conducen a la identificación de siete (7) marcadores genéticos cuyo cambio en el estado de expresión, conjuntamente o en subconjuntos, en comparación con tejido normal permitiría una tasa predicación correcta por encima del 90% con respecto a CU. Para confirmar estos hallazgos, los marcadores se seleccionaron adicionalmente frente a una recogida de muestras mayor de biopsias.

15 Ejemplo 7

Selección de alto rendimiento

Para confirmar los resultados preliminares de la RT-PCR usando el ADNc de ocho pacientes con CU y tres pacientes con EC (véase el ejemplo 6), se decidió analizar la expresión de todos los genes aislados a gran escala. Para este fin, se colocaron por puntos todos los genes que pudieron aislarse a partir de la selección sobre una membrana Hybond N+ (Amersham) usando el Microgrid TAS (BioRobotics). Tal como se describió en el ejemplo 5 los genes se amplificaron a través de una PCR de las colonias para la colocación por puntos.

Entonces se sintetizó esta membrana de filtro madre 240 veces y se hibridó con ADNc marcado de manera radioactiva y que se derivaba de biopsias de 50 pacientes con CU individuales y 50 pacientes con EC individuales. Se tomaron las biopsias de la zona inflamada y no inflamada de los pacientes en el lado izquierdo del colon. Como control de referencia se reunieron las biopsias que se derivaban del lado izquierdo del colon de cinco personas sanas.

30 Ejemplo 8

Verificación a través de un estudio ciego

Para proporcionar un mayor peso estadístico, fue necesario realizar análisis de expresión de los siete marcadores genéticos en muestras "ciegas" de biopsia, mediante lo cual no se sabía si la biopsia se derivaba de un paciente que padecía CU o EC. Tal como se describió anteriormente, se realizó el análisis por RT-PCR de dichos marcadores genéticos y combinando el cuadro total de los patrones de expresión que resultaron de dichos marcadores genéticos fue posible determinar con más del 90% de certeza la forma correcta de EII.

El análisis de los resultados (estudio ciego) muestra que ya la combinación de SEQ. ID. NO. 1 y 2 proporciona un resultado fiable, mientras que la combinación de las SEQ. ID. NO. 1, 2 y 3 o la combinación de las SEQ. ID. NO. 1, 2, y 4 proporciona un resultado mejorado adicional. Los resultados preliminares indican que se alcanzó una precisión de aproximadamente el 90% usando la combinación de las SEQ. ID. NO. 1, 2, 3 y 4. Se mostró que el uso del conjunto completo de las SEQ. ID. NO. 1 a 7 dio como resultado una precisión de más del 90%.

Bibliografía

50 **Bode BP** (2001). Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J Nutr. Sep*; 131 (supl. 9): 2475S-85S; discusión 2486S-7S.

Breuning MH, Hamdy NA (2003). From gene to disease; SLC3A1, SLC7A9 and cystinuria. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 147:245-7.

55 **Guatelli JC, Gingeras TR, Richman DD** (1989). Nucleic acid amplification *in vitro*: detection of sequences with low copy numbers and application to diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Microbiol Rev.* 2: 217-26.

60 **Haila S, Saarialho-Kere U, Karjalainen-Lindsberg ML, Lohi H, Airola K, Holmberg C, Hästbacka J, Kere J, Höglund P.** (2000). The congenital chloride diarrhea gene is expressed in seminal vesicle, sweat gland, inflammatory colon epithelium, and in some dysplastic colon cells. *Histochem Cell Biol.* Abril; 113 (4):279-86.

Harlowe E y Lane D (1989). Antibodies. *A laboratory manual, Cold Spring Harbour, NY.*

65 **Hartupee JC, Zhang H, Bonaldo MF, Soares MB, Dieckgraefe BK.** (2001). Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel member of the human regenerating protein family: Reg IV. *Biochim Biophys Acta.* 16 de abril; 1518(3): 287-93.

ES 2 356 599 T3

Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Woolley DE, Davis RW (1997). Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 2150-5.

Hirata I, Murano M, Nitta M, Sasaki S, Toshina K, Maemura K, Katsu K (2001). Estimation of mucosal inflammatory mediators in rat DSS-induced colitis. Possible role of PGE(2) in protection against mucosal damage. *Digestión. Supl.* 63 1: 73-80.

Hästbacka J, Superti-Furga A, Wilcox WR, Rimoin DL, Cohn DH, Lander ES. (1996). Sulfate transport in chondrodysplasia. *Ann N Y Acad Sci.* 8 de junio; 785: 131-6.

Isaacs KL, Sartor RB, Haskill S (1992). Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. *Gastroenterology.* 103: 1587-95.

Jaeger C, Schaefer BM, Wallich R, Kramer MD (2000). The membrane-associated protein pKe#192/MAP17 in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* Sept.; 115 (3): 375-80.

Kocher O, Cheresch P, Lee SW (1996). Identification and partial characterization of a novel membrane-associated protein (MAP17) up-regulated in human carcinomas and modulating cell replication and tumor growth. *Am J Pathol.* Agosto; 149(2): 493-500.

Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S (2001). Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet.* 10: 445-56.

Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo K, Drummond R, Gelfand DH (1989). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem.* 264: 6427-37.

Newell, K.J., Matrisian, L.M., Driman, D.K. (2002). Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) expression in ulcerative colitis-related tumorigenesis. *Mol Carcinog.* 34: 59-63.

Pitari, G., Malergue F, Martin F, Philippe JM, Massucci MT, Chabret C, Maras B, Dupre S, Naquet P, Galland (2000). Pantetheinase activity of membrane-bound Vanin-1: lack of free cysteamine in tissues of Vanin-1 deficient mice. *FEBS Lett.* 83: 149-54.

Rossi A, Superti-Furga A (2001). Mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter (DTDST) gene (SLC26A2): 22 novel mutations, mutation review, associated skeletal phenotypes, and diagnostic relevance. *Hum Mutat.* Marzo; 17(3): 159-71.

Saiki, R.K., Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology.* 1992; 24: 476-80.

Sambrook, J., Russell DW, Sambrook J (1989). *Molecular cloning, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY*

Sharkey, D.J., Scalice ER, Christy KG Jr, Atwood SM, Daiss JL (1994). Antibodies as thermolabile switches: high temperature triggering for the polymerase chain reaction. *Biotechnology (N Y).* 12: 506-9.

Sloan JL, Mager S (1999). Cloning and functional expression of a human Na (+) and Cl(-)-dependent neutral and cationic amino acid transporter B(O+). *J Biol Chem.* 20 de agosto; 274(34): 23740-5.

Spandau, U.H, Toksoy A, Verhaart S, Gillitzer R, Kruse FE. High expression of chemokines Gro-alpha (CXCL-1), IL-8 (CXCL-8), and MCP-1 (CCL-2) in inflamed human corneas *in vivo*. *Arch Ophthalmol.* Junio de 2003; 121(6): 825-31.

von **Stein, O.D.,** Isolation of differentially expressed genes through subtractive suppression hybridization. *Methods Mol Biol* 2001; 175: 263-78.

Woessner, J.F. Jr., Regulation of matrilysin in the rat uterus. *Biochem Cell Biol.* 1996; 74(6): 777-84.

REIVINDICACIONES

1. Método para la diferenciación entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn basándose en el análisis de perfiles de expresión génica en una o más muestras de biopsia obtenidas a partir de tejido inflamado de los intestinos de un paciente, **caracterizado** porque se determinan los niveles de expresión de al menos dos de varios genes marcadores, seleccionándose dichos al menos dos genes marcadores de SLC6A14, SLC26A2, GRO1, MMP-7, MAF-17, GISP y Vanin-1 y en el que

- en relación con SLC6A14, la expresión de dicho gen marcador en tejido inflamado se considera una indicación de colitis ulcerosa,
- en relación con SLC26A2, la falta de expresión de dicho gen marcador en tejido inflamado se considera una indicación de colitis ulcerosa,
- en relación con GRO1, la expresión de dicho gen marcador en tejido inflamado se considera una indicación de colitis ulcerosa,
- en relación con MMP-7, la expresión de dicho gen marcador en tejido inflamado se considera una indicación de colitis ulcerosa,
- en relación con MAP-17, la expresión de dicho gen marcador en tejido inflamado se considera una indicación de colitis ulcerosa,
- en relación con GISP, la expresión preferente de dicho gen marcador en tejido inflamado se considera una indicación de colitis ulcerosa,
- en relación con Vanin-1, la expresión de dicho gen marcador en tejido inflamado se considera una indicación de colitis ulcerosa.

2. Método según la reivindicación 1, en el que:

- en relación con SLC6A14, la falta de expresión de dicho gen marcador en tejido inflamado se considera una indicación de enfermedad de Crohn,
- en relación con SLC26A2, la expresión de dicho gen marcador en tejido inflamado se considera una indicación de enfermedad de Crohn,
- en relación con GRO1, la falta de expresión de dicho gen marcador en tejido inflamado se considera una indicación de enfermedad de Crohn,
- en relación con MMP-7, la falta de expresión de dicho gen marcador en tejido inflamado se considera una indicación de enfermedad de Crohn,
- en relación con MAP-17, la falta de expresión de dicho gen marcador en tejido inflamado se considera una indicación de enfermedad de Crohn,
- en relación con GISP, la expresión no preferente de dicho gen marcador en tejido inflamado se considera una indicación de enfermedad de Crohn,
- en relación con Vanin-1, la falta de expresión de dicho gen marcador en tejido inflamado se considera una indicación de enfermedad de Crohn.

3. Método según la reivindicación 1, en el que también se obtiene una muestra a partir de tejido no inflamado de los intestinos del paciente y en el que:

- en relación con SLC6A14, la falta de expresión de dicho gen marcador en tejido no inflamado se considera una indicación de colitis ulcerosa,
- en relación con SLC26A2, la expresión preferente de dicho gen marcador en tejido no inflamado se considera una indicación de colitis ulcerosa,
- en relación con GRO1, la falta de expresión de dicho gen marcador en tejido no inflamado se considera una indicación de colitis ulcerosa,

ES 2 356 599 T3

- en relación con MMP-7, la falta de expresión de dicho gen marcador en tejido no inflamado se considera una indicación de colitis ulcerosa,
- en relación con MAP-17, la falta de expresión de dicho gen marcador en tejido no inflamado se considera una indicación de colitis ulcerosa,
- en relación con GISP, la expresión no preferente de dicho gen marcador en tejido no inflamado se considera una indicación de colitis ulcerosa,
- en relación con Vanin-1, la falta de expresión de dicho gen marcador en tejido no inflamado se considera una indicación de colitis ulcerosa.

4. Método según la reivindicación 1, en el que se determinan los niveles de expresión de SLC6A14 y SLC26A2 y en el que la expresión de SLC6A14 en tejido inflamado junto con la falta de expresión de SLC26A2 en tejido inflamado, se considera una indicación de colitis ulcerosa.

5. Método según las reivindicaciones 1 y 3, en el que se determinan los niveles de expresión de SLC6A14 y SLC26A2 y en el que la expresión de SLC6A14 en tejido inflamado y la falta de expresión en tejido no inflamado, junto con la falta de expresión de SLC26A2 en tejido inflamado o la expresión preferente en tejido no inflamado, se considera una indicación de colitis ulcerosa.

6. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra de biopsia, y se determinan los niveles de expresión de SLC6A14, SLC26A2 y GRO1, y en el que la expresión de SLC6A14 en tejido inflamado junto con la falta de expresión de SLC26A2 en tejido inflamado, y la expresión de GRO1 en tejido inflamado, se considera una indicación de colitis ulcerosa.

7. Método según las reivindicaciones 1 y 3, en el que se determinan los niveles de expresión de SLC6A14, SLC26A2 y GRO1, y en el que la expresión de SLC6A14 en tejido inflamado y la falta de expresión en tejido no inflamado, junto con la falta de expresión de SLC26A2 en tejido inflamado, o la expresión preferente en tejido no inflamado, y la expresión de GRO1 en tejido inflamado y la falta de expresión en tejido no inflamado, se considera una indicación de colitis ulcerosa.

8. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra de biopsia, y se determinan los niveles de expresión de SLC6A14, SLC26A2 y MMP-7, y en el que la expresión de SLC6A14 en tejido inflamado, junto con la falta de expresión de SLC26A2 en tejido inflamado, y la expresión de MMP-7 en tejido inflamado, se considera una indicación de colitis ulcerosa.

9. Método según las reivindicaciones 1 y 3, en el que se determinan los niveles de expresión de SLC6A14, SLC26A2 y MMP-7, y en el que la expresión de SLC6A14 en tejido inflamado y la falta de expresión en tejido no inflamado, junto con la falta de expresión de SLC26A2 en tejido inflamado, o la expresión preferente en tejido no inflamado, y la expresión de MMP-7 en tejido inflamado y la falta de expresión en tejido no inflamado, se considera una indicación de colitis ulcerosa.

10. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra de biopsia, y se determinan los niveles de expresión de SLC6A14, SLC26A2, GRO1, MMP-7, MAP-17, GISP y Vanin-1, y en el que la expresión de SLC6A14, GRO1, MMP-7, MAP-17, GISP y Vanin-1 en tejido inflamado o la expresión preferente en tejido inflamado, junto con la falta de expresión de SLC26A2 en tejido inflamado, se considera una indicación de colitis ulcerosa.

11. Método según las reivindicaciones 1 y 3, en el que se determinan los niveles de expresión de SLC6A14, SLC26A2, GRO1, MMP-7, MAP-17, GISP y Vanin-1, y en el que la expresión de SLC6A14, GRO1, MMP-7, MAP-17, GISP y Vanin-1 en tejido inflamado o la expresión preferente en tejido inflamado, y la falta de expresión en tejido no inflamado, junto con la falta de expresión de SLC26A2 en tejido inflamado, o la expresión preferente en tejido no inflamado, se considera una indicación de colitis ulcerosa.

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de expresión de cada gen marcador se determina a través de amplificación de ácido nucleico de dichos genes usando cebadores específicos de gen, y determinación de los resultados de amplificación.

13. Método según la reivindicación 12, en el que la amplificación de ácido nucleico se realiza usando PCR y los cebadores específicos de gen seleccionados de SEQ.ID.NO. 13-26.

14. Kit para la diferenciación entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn basándose en el análisis de perfiles de expresión génica en muestras obtenidas a partir de los intestinos de un paciente, **caracterizado** porque dicho kit incluye pares de cebadores específicos de gen dirigidos a al menos dos genes marcadores seleccionados de SLC6A14, SLC26A2, GRO1, MMP-7, MAP-17, GISP y Vanin-1 y en el que dichos pares de cebadores específicos de gen se seleccionan de SEQ.ID.NO. 13 y SEQ.ID.NO. 14; SEQ.ID.NO. 15 y SEQ.ID.NO. 16; SEQ.ID.NO. 17 y SEQ.ID.NO. 18; SEQ.ID.NO. 19 y SEQ.ID.NO. 20; SEQ.ID.NO. 21 y SEQ.ID.NO. 22; SEQ.ID.NO. 23 y SEQ.ID.NO. 24; y

ES 2 356 599 T3

SEQ.ID.NO. 25 y SEQ.ID.NO. 26 o pares de cebadores funcionalmente equivalentes específicos para los mismos genes marcadores.

5 15. Kit según la reivindicación 14, en el que dichos cebadores específicos son SEQ.ID.NO. 13 y SEQ.ID.NO. 14; SEQ.ID.NO. 15 y SEQ.ID.NO. 16; y SEQ.ID.NO. 17 y SEQ.ID.NO. 18.

16. Kit según la reivindicación 14, en el que dichos cebadores específicos son SEQ.ID.NO. 13 y SEQ.ID.NO. 14; SEQ.ID.NO. 15 y SEQ.ID.NO. 16; y SEQ.ID.NO. 19 y SEQ.ID.NO. 20.

10 17. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 14-16, que comprende además un agente de polimerización termoestable y cofactor(es) requerido(s).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

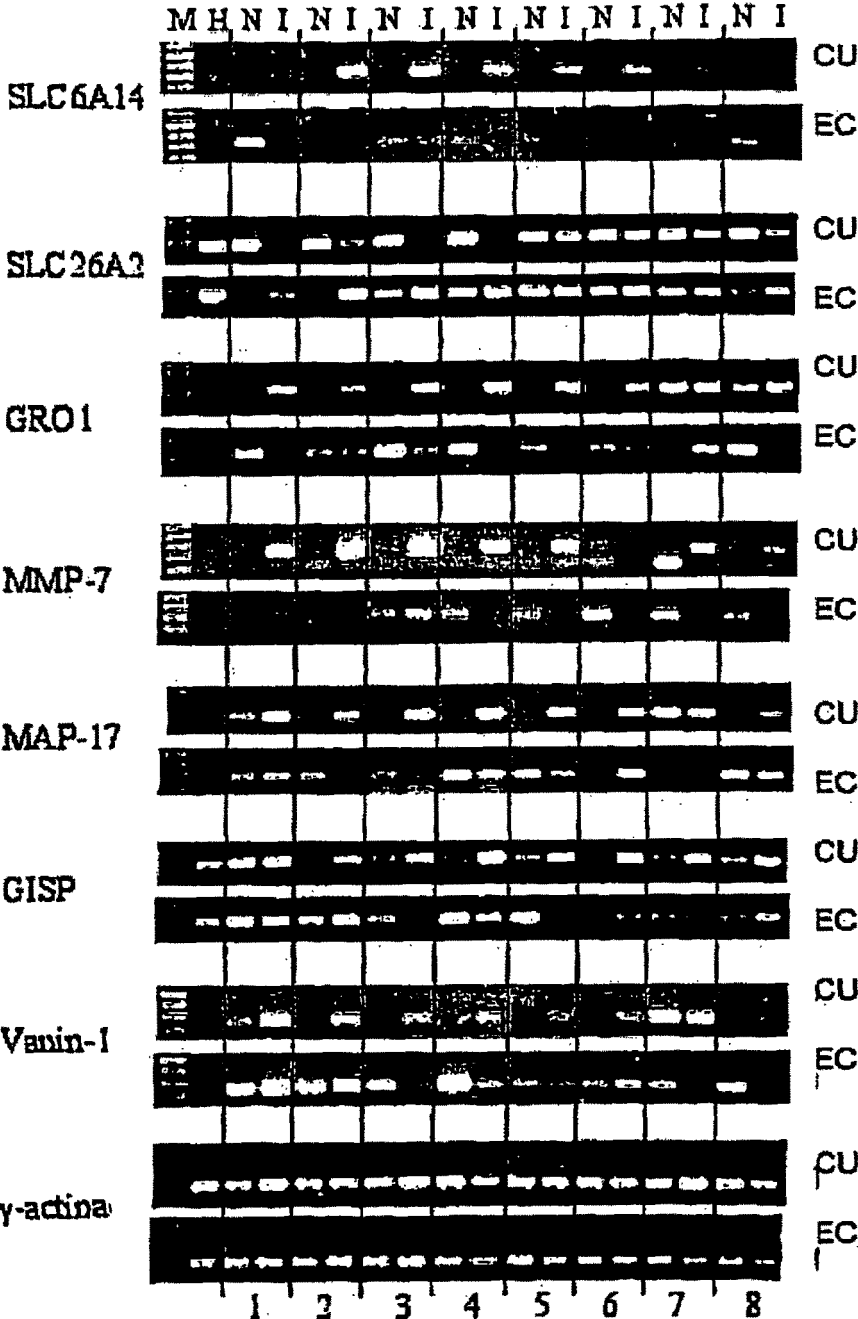


Fig. 1