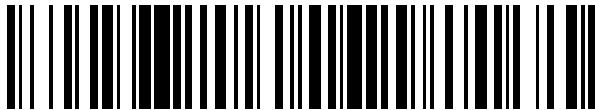


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 674 176**

(21) Número de solicitud: 201601099

(51) Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)

(12)

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación:

**22.12.2016**

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

**27.06.2018**

(71) Solicitantes:

**FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN  
MARQUÉS DE VALDECILLA (50.0%)**  
Avda. Cardenal Herrera Oria s/n  
39011 Santander (Cantabria) ES y  
**SERVICIO CÁNTABRO DE SALUD (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**PIPAÓN GONZÁLEZ, Carlos y  
YÁÑEZ SAN SEGUNDO, Lucrecia**

(54) Título: **Uso del Gen Prkaca para predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con un análogo de purina**

(57) Resumen:

Uso del gen PRKACA para predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con un análogo de purina. La presente invención describe un método para predecir la respuesta al tratamiento con un análogo de purina en un sujeto que padece síndrome linfoproliferativo de bajo grado, leucemias agudas secundarias, síndromes mielodisplásicos de alto grado o que va a recibir el trasplante de un órgano, que comprende la determinación de los niveles de expresión del gen PRKACA, en donde un nivel de expresión de dicho gen menor que un nivel de referencia es indicativo de que el tratamiento con un análogo de purina va a ser efectivo, o de que el sujeto es susceptible de ser tratado con un análogo de purina. Asimismo, también se describe el kit que comprende los componentes necesarios para poner en práctica dicho método.

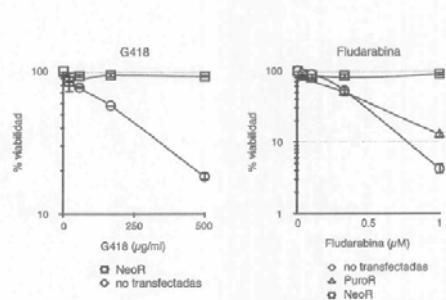


FIG. 1

Uso del gen PRKACA para predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con un análogo de purina

## DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se encuadra dentro del ámbito de la biotecnología y se refiere a un método para predecir la respuesta al tratamiento con un análogo de purina en un sujeto que padece síndrome linfoproliferativo de bajo grado, leucemias agudas secundarias, síndromes mielodisplásicos de alto grado o que va a recibir el trasplante 10 de un órgano, que comprende la determinación de los niveles de expresión del gen PRKACA.

## ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Los análogos de nucleósidos son compuestos con una estructura similar a la de los monómeros que constituyen los ácidos nucleicos, ampliamente empleados como agentes antivirales o anticancerígenos. Dichos compuestos se activan dentro de la célula por fosforilación a sus formas trifosfato y se integran en el ADN. Sus fórmulas incluyen modificaciones con respecto a los nucleótidos naturales que envenenan la 20 maquinaria de replicación del ADN, lo que da lugar a una terminación prematura de las cadenas nacientes y a la muerte celular.

Un nucleósido es una molécula formada por la unión de una base nitrogenada con una pentosa. Las bases nitrogenadas pueden ser de dos tipos: las tipo purina tienen una 25 estructura formada por dos anillos fusionados y sus derivados son la adenina y la guanina y las tipo pirimidina, cuya estructura está constituida por un solo anillo y sus derivados son la timina, el uracilo y la citosina.

30 La fludarabina (9-beta-D-arabinofuranosil-2-fluoroadenina 5-fosfato ó F-Ara-AMP) es el análogo de purinas más efectivo en el tratamiento de los desórdenes linfoproliferativos indolentes, entre los que se incluyen la leucemia linfática crónica (LLC) y ciertos linfomas de bajo grado. Asimismo, se ha mostrado eficaz en el tratamiento de 35 síndromes mielodisplásicos con rápida evolución a leucemias agudas por el efecto sinérgico con el arabinósido de citosina y en el acondicionamiento del trasplante alogénico por su efecto inmunosupresor.

- La fludarabina es administrada en su forma monofosfato, cuya carga electronegativa hace que necesite ser defosforilada antes de entrar en las células por transporte facilitado. Una vez dentro de la célula, es activada por re-fosforilación hasta su forma trifosfato (F-Ara-ATP) por la deoxicitidina kinasa (dCK). Varias enzimas involucradas en la síntesis del ADN son dianas de la acción de la fludarabina, entre las que se encuentran la ADN polimerasa y la ADN primasa, dado que la F-Ara-ATP compite con el nucleótido natural dATP. Además, la fludarabina se incorpora al ARN y al ADN, lo que provoca la terminación de la síntesis de las cadenas (5'->3'), y su localización en el extremo 3' impide que la ligasa I pueda unirla a la cadena de ADN adyacente. Además, en células que no se dividen, la fludarabina se incorpora al ADN utilizando los mecanismos de reparación del ADN, pero inhibe el proceso de reparación por escisión de nucleótidos (NER), provocando un daño irreparable.
- La citotoxicidad de este agente es radicalmente dependiente de la concentración intracelular de la forma activa trifosfato de la droga que pueda alcanzarse durante el tratamiento. Una deficiencia en dCK se ha relacionado con la generación de resistencias a nelarabina, otro análogo de las purinas (Yamauchi et al. BMC Cancer, 2014 vol. 14 p.547).
- La solicitud de patente US2013344168A1 describe un método para determinar los resultados clínicos de un tratamiento frente al cáncer que comprende la determinación de un marcador génico de expresión de la vía CREB y, adicionalmente, de la vía APC del ciclo celular.
- La solicitud de patente WO2009117153A1 divulga un método para identificar sujetos con leucemia mieloide aguda sensibles al tratamiento que comprende medir el nivel de fosforilación de un miembro de la vía de señalización de la proteína kinasa dependiente de AMP (AMPK) en la muestra. Sin embargo no hace referencia a la validez de este método como indicador para el tratamiento y prevención de otras enfermedades.
- La solicitud de patente US2015141470A1 describe un procedimiento para identificar sujetos con resistencia a terapias frente al cáncer o con riesgo de padecerlo, mediante la valoración de determinados marcadores génicos que activan la producción de

AMPc, entre ellos PRKACA. Se mencionan los tratamientos con inhibidores del factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEFs) e inhibidores de histona deacetilasas (HDACs), pero no los tratamientos con análogos de purinas.

- 5 Sin embargo, ninguno de estos métodos permite averiguar si el tratamiento con análogos de purina va a ser eficaz cuando es administrado a un individuo. Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar un método que permita averiguar si un sujeto va a responder de forma positiva al tratamiento con análogos de purina, evitando la pérdida de tiempo con tratamientos ineficaces que retrasan la  
10 curación del sujeto.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

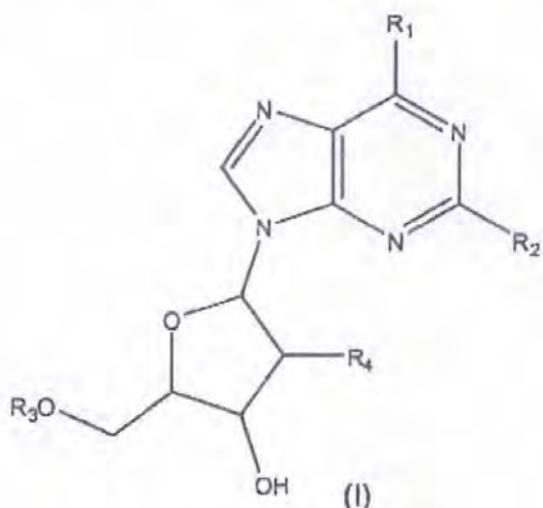
Los autores de la presente invención han observado que la determinación de los  
15 niveles de expresión del gen proteína kinasa dependiente de AMPc (gen PRKACA) en un sujeto permite la predicción de la respuesta de dicho sujeto al tratamiento con un análogo de purina. Esto resulta muy beneficioso en aquellas situaciones en las que la administración de análogos de purina es recomendable, como es el caso, por ejemplo, del tratamiento de enfermedades linfoproliferativas o la prevención de un rechazo  
20 injerto-huésped.

Durante el curso de experimentos con líneas celulares, los inventores observaron que la transfección estable de fibroblastos con plásmidos que contenían el gen procariota NeoR que codifica la proteína aminoglicósido-3'-fosfatasa-IIa (APH(3')-IIa), proveía un  
25 incremento de resistencia al análogo de purinas fludarabina (Ejemplo 1). Estudios cristalográficos revelaron una relación estructural de dicha proteína con algunas kinasas eucariotas tales como ERK y cAMPK (codificada por el gen PRKACA), por lo que los inventores llevaron a cabo experimentos adicionales que confirmaron que la transfección de fibroblastos con el gen PRKACA confiere resistencia a los análogos  
30 de purina (Figura 11). En base a este descubrimiento, se han desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán descritos en detalle a continuación.

#### **Método de la invención**

Tal como se ha mencionado previamente, la determinación de los niveles de expresión del gen proteína kinasa dependiente de AMPc (gen PRKACA) en un sujeto permite averiguar si dicho sujeto va a responder de forma positiva al tratamiento con análogos de purina, es decir, si el tratamiento va a ser efectivo, o averiguar si dicho sujeto es 5 susceptible de ser tratado con un análogo de purina.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con un compuesto de fórmula (I), o para seleccionar a un sujeto susceptible de ser tratado con un compuesto de 10 fórmula (I),



donde:

R<sub>1</sub> se selecciona de entre NH<sub>2</sub> o OCH<sub>3</sub>,

R<sub>2</sub> se selecciona de entre un halógeno o NH<sub>2</sub>,

15 R<sub>3</sub> se selecciona de entre H o PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>,

R<sub>4</sub> se selecciona de entre OH o un halógeno,

o cualquiera de sus isómeros o de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde el método comprende las siguientes etapas:

- (a) cuantificar los niveles de expresión del gen proteína kinasa dependiente de 20 AMPc (gen PRKACA) en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, y
- (b) comparar los niveles de expresión de dicho gen con un nivel de referencia, en el que un nivel de expresión de dicho gen menor que un nivel de referencia es indicativo de que el tratamiento con un compuesto de fórmula (I) va a ser efectivo, o de que el sujeto es susceptible de ser tratado con un compuesto de fórmula (I).

En la presente invención se entiende por "predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con un compuesto de fórmula (I)" a conocer a partir de un parámetro (en el presente contexto, los niveles de expresión del gen PRKACA) si el tratamiento con dicho compuesto de fórmula (I) va a ser efectivo, es decir, si la respuesta del sujeto al tratamiento es positiva. Se considera que un tratamiento es efectivo, o que la respuesta del sujeto es positiva, cuando como consecuencia de la administración del compuesto de fórmula (I) el sujeto o bien deja de sufrir la enfermedad o los síntomas asociados a dicha enfermedad desaparecen o disminuyen, o evita una enfermedad, como por ejemplo, el rechazo injerto-huésped. Así, en la presente invención se entiende por "tratamiento" o "tratar" a la administración tanto terapéutica como profiláctica (medida preventiva) del compuesto de fórmula (I), en el que el objeto es prevenir o frenar (reducir) un cambio fisiológico indeseado o trastorno. Como consecuencia de la administración del compuesto de fórmula (I), el sujeto va a obtener unos resultados clínicos beneficiosos.

Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, sin limitarse a, el no rechazar un trasplante de órgano o tejido, evitar el ataque inmunológico del órgano o tejido transplantado al receptor, alivio de síntomas, reducción de la extensión de la enfermedad, estado patológico estabilizado (concretamente no empeorado), retardo o freno de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico y remisión (tanto parcial como total), tanto detectable como no detectable. Los sujetos que necesitan de tratamiento incluyen tanto a aquellos sujetos que sufren ya la afección o trastorno, como a aquellos con tendencia a sufrir la afección o trastorno, o a aquellos en los que ha de prevenirse la afección o trastorno.

Así, basándose en los niveles de expresión del gen PRKACA, el método de la invención permite seleccionar a un sujeto susceptible de ser tratado con un compuesto de fórmula (I). El sujeto seleccionado mediante el método de la invención será aquel que presumiblemente responderá de forma positiva al tratamiento con un compuesto de fórmula (I).

En la presente invención se entiende por "sujeto" o "individuo" a cualquier ser humano, masculino o femenino, de cualquier raza o edad. En el contexto de la presente invención, el sujeto padece una enfermedad, en cuyo caso el tratamiento con el

compuesto de fórmula (I) sería profiláctico, o el sujeto va a recibir un trasplante, en cuyo caso el tratamiento sería preventivo, es decir, se va a prevenir la enfermedad injerto contra huésped. En una realización particular, el sujeto padece una enfermedad cuyo tratamiento y/o prevención comprende la administraciónn de análogos de purina,  
5 más en particular, análogos de purina que comprenden la fórmula (I).

Ejemplos de enfermedades tratadas con análogos de purina incluyen, sin limitarse a, neoplasias hematológicas mieloides (leucemia mieloide crónica, BCR-ABL positiva, leucemia neutrofílica crónica, policitemia vera, mielofibrosis primaria, trombocitopenia  
10 esencial, leucemia eosinofílica crónica, mastocitosis sistémica, neoplasias mieloproliferativas inclasificables, citopenia refractaria con displasia unilineal, anemia refractaria sideroblástica, citopenia refractaria con displasia multilínea, anemia refractaria con exceso de blastos, síndrome mielodisplásico con del (5q) aislada, síndrome mielodisplásico inclasificable, síndrome mielodisplásico infantil, leucemia  
15 mielomonocítica crónica, leucemia mieloide crónica atípica, BCR-ABL negativa, leucemia mielomonocítica juvenil, neoplasia mielodiplásica/mieloproliferativa inclasificable, Leucemia mielógena aguda (LMA, o en inglés *Acute myeloid leukemia* (AML)) con alteraciones genéticas recurrentes, LMA con cambios relacionados con mielodisplasia, LMA relacionadas con terapias previas, LMA sin características propias  
20 de las categorías anteriores, sarcoma mieloide, proliferaciones mieloides relacionadas con el Síndrome de Down, neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitoide y leucemias agudas de linaje ambiguo) neoplasias hematológicas linfoides (Neoplasias linfoides de células precursoras, neoplasias de células B maduras, neoplasias de células T y células NK maduras y linfoma de Hodgkin) y en la prevención de la  
25 enfermedad de injerto contra huésped.

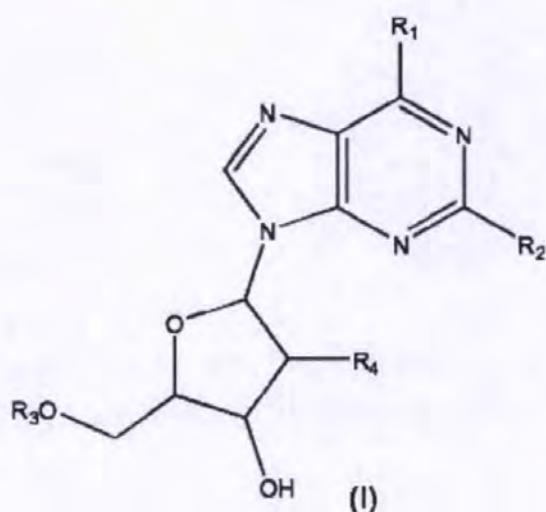
En una realización particular, el sujeto padece una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en síndrome linfoproliferativo de bajo grado, leucemias agudas secundarias y síndromes mielodisplásicos de alto grado, o el sujeto va a recibir un  
30 trasplante de un órgano o tejido. En una realización más particular, el síndrome linfoproliferativo de bajo grado es leucemia linfocítica crónica.

Los compuestos de fórmula (I) se engloban dentro de los compuestos considerados análogos de purina, en tanto en cuanto todos los análogos de purina comprenden una  
35 estructura química similar a la de una purina. Así, se entiende por "análogo de purina"

a un compuesto químico con una estructura similar a la purina que puede ser insertado en el ADN sustituyendo a ésta. Se entiende por "purina" a un compuesto orgánico heterocíclico aromático. La purina es una base nitrogenada precursora de las bases adenina y guanina, que forman parte de la estructura del ADN. Ejemplos de 5 análogos de purina incluyen, sin limitarse a, fludarabina, cladribina, clofarabina, mercaptopurina, nelarabina y tioguanina.

Los análogos de purina de la invención se seleccionan entre los compuestos de la fórmula (I)

10



donde:

- R<sub>1</sub> se selecciona de entre NH<sub>2</sub> o OCH<sub>3</sub>,
  - 15 R<sub>2</sub> se selecciona de entre un halógeno o NH<sub>2</sub>,
  - R<sub>3</sub> se selecciona de entre H o PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>,
  - R<sub>4</sub> se selecciona de entre OH o un halógeno,
  - o cualquiera de sus isómeros o de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 20 En la presente invención se entiende por "halógeno" a un átomo de bromo (Br), cloro (Cl), yodo (I) o flúor (F).

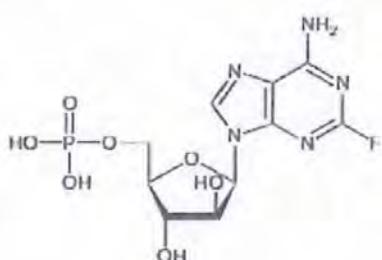
En una realización particular del método de la invención, R<sub>1</sub> del compuesto de fórmula (I) es un grupo NH<sub>2</sub>.

En otra realización particular, R<sub>2</sub> del compuesto de fórmula (I) es un grupo NH<sub>2</sub>, un F o un Cl.

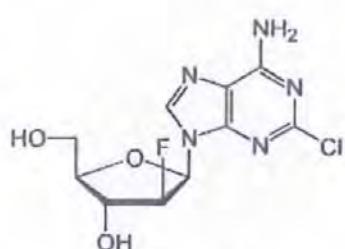
- 5 En otra realización particular, R<sub>4</sub> del compuesto de fórmula (I) es un grupo OH o un F.

En otra realización todavía más particular, el compuesto de fórmula (I) es fludarabin fosfato de fórmula (Ia) o clofarabina de fórmula (Ib):

10



(Ia)



(Ib).

- 15 En una primera etapa [etapa (a)], el método de la invención comprende cuantificar los niveles de expresión del gen PRKACA en una muestra biológica de dicho sujeto.

El gen PRKACA, también conocido como gen PKACA o gen PPNAD4 del inglés "*protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha*" es un gen que en humanos está situado en el cromosoma 19. Este gen codifica una de las subunidades catalíticas de la proteína kinasa A dependiente de AMPc (proteína cAMPK) que existe como una holoenzima. La fosforilación dependiente de AMPc de las proteínas por la proteína cAMPK tiene un importante papel en muchos procesos celulares, incluyendo la diferenciación, proliferación y apoptosis celular. Procesos alternativos de corte y empalme dan lugar a múltiple transcritos que codifican diferentes isoformas. En una realización particular, el gen PRKACA comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de, al menos, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con la secuencia SEQ ID NO: 1 (número de acceso a GeneBank NG\_029699.1).

- 30 En la presente invención se entiende por "identidad de secuencia" al grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos (o aminoácidos) obtenido mediante el

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

10

El experto en la materia entiende que las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de los genes que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan a su estructura global ni a su funcionalidad, 15 dando lugar a variantes de la proteína. Dichas variantes caen dentro del ámbito de la presente invención, es decir, aquellas variantes de la proteína cAMPK que presentan inserciones, delecciones o modificaciones de uno o más aminoácidos con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2. Así, en una realización particular, la proteína codificada por el gen PRKACA, es decir, la proteína cAMPK, comprende una secuencia de 20 aminoácidos con una secuencia de identidad de, al menos, un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 (GenBank NP\_002721.1).

## SEQ ID NO: 2

25 MGNAAAAKKG SEQESVKEFL AKAKEDFLKK WESPAQNTAH LDQFERIKTL GTGSFGRVML  
 VKHKETGNHY AMKILDKQKV VKLKQIEHTL NEKRILQAVN FPFLVKLEFS FKDNSNLYMV  
 MEYVPGGEMF SHLRRIGRFS EPHARFYAAQ IVLTFEYLHS LDLIYRDLKP ENLLIDQQGY  
 IQVTDGFAK RVKGRTWTLG GTPEYLAPEI ILSKGYNKAV DWWALGVLIY EMAAGYPPFF  
 ADQPIQIYEK IVSGKVRFPS HFSSDLKDLL RNLLQVDLTK RFGNLKNGVN DIKNHKWFAT  
 30 TDWIAIYQRK VEAPFIPKFK GPGDTSNFDD YEEEEIRVSI NEKCGKEFSE F

En la presente descripción, los términos "expresión" y "expresión génica" incluyen la transcripción y/o traducción del ácido nucleico. Por lo tanto, la cuantificación del nivel de expresión del gen PRKACA puede realizarse a partir del ARN resultante de la 35 transcripción de dicho gen (ARN mensajero o ARNm) ó a través de las síntesis de un ADN complementario (ADNc) del mismo. Por lo tanto, en una realización particular de

la invención, la cuantificación de los niveles de expresión del gen PRKACA comprende la cuantificación del ARN mensajero del gen PRKACA, o un fragmento de dicho ARNm, del ADN complementario del gen PRKACA, o un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.

5

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

10

Si la cuantificación de la expresión del gen PRKACA va a realizarse a partir del ADNc o ARNm, primero se procede a la extracción del ácido nucleico de la muestra biológica aislada del sujeto. Para este fin, la muestra biológica se puede tratar para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o célula liberando los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica para aislar y preparar los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se extraen mediante procedimientos conocidos para el experto en la materia (Sambrook *et al.* "Molecular cloning: a Laboratory Manual". 2012; Vol. 1-3) y disponibles comercialmente. Una vez extraído el ácido nucleico se procede a realizar la cuantificación de la expresión del gen PRKACA.

15

Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de ARNm codificados por el gen PRKACA o de su ADNc correspondiente. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de ARNm codificados por dicho gen pueden ser cuantificados mediante el empleo de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del ARNm y la cuantificación del producto de la amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante Southern blot y empleo de sondas apropiadas, northern blot y empleo de sondas específicas del ARNm del gen de interés (gen PRKACA) o de su ADNc correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-PCR, hibridación, microarrays, etc. Preferiblemente, el método de elección para cuantificar los niveles de expresión del gen PRKACA es una RT-qPCR (del inglés *quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction*), en la que tras obtener el ADNc a partir del ARNm mediante oligonucleótidos hexaméricos al azar, el gen PRKACA es amplificado con el empleo de los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO: 3 - 5' -GAGCAGGAGAGCGTGAAAGA-3' y  
SEQ ID NO: 4 - 5' -TCATGGCATAGTGGTTCCCG-3'.

Métodos convencionales de cuantificar los niveles de expresión pueden encontrarse,  
5 por ejemplo, en Sambrook *et al.* citado *ad supra*. Así, en una realización particular, la cuantificación de los niveles de expresión del gen PRKACA se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o un array de ADN o ARN.

Alternativamente, los niveles de expresión del gen PRKACA también pueden  
10 cuantificarse a través de los niveles de proteína cAMPK o un fragmento de la misma. Así, en otra realización particular, la cuantificación de los niveles de expresión del gen PRKACA comprende la cuantificación de los niveles de proteína codificada por dicho gen (proteína cAMPK) o de un fragmento de la misma.

15 En la presente invención se entiende por "fragmento de la proteína cAMPK" a la secuencia de aminoácidos de la proteína cAMPK que comprende uno o más aminoácidos ausentes de su extremo amino o carboxilo terminal. En particular, el fragmento de la proteína cAMPK es un fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 2.

20 Si la cuantificación de los niveles de expresión del gen PRKACA va a realizarse a partir de la proteína cAMPK (o un fragmento de la misma), entonces la muestra biológica aislada del sujeto tiene que ser tratada para extraer las proteínas. Métodos para extraer y aislar las proteínas son conocidos por el experto en la materia (Sambrook *et al.* citado *ad supra*) y están disponibles comercialmente.

25 El nivel de expresión de la proteína cAMPK puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra de un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de dicha proteína pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de 30 unirse a la proteína cAMPK y la posterior cuantificación de los complejos formados.

35 Se entiende por "anticuerpo" a una glicoproteína del tipo gamma globulina que forma parte del sistema inmunitario humorral que se une de forma específica a un antígeno.

El término anticuerpo tal como aquí se utiliza incluye sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')2, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados. Ejemplos de anticuerpos específicos de la proteína codificada por el gen PRKACA disponibles comercialmente incluyen, sin limitar a, PKA $\alpha$  cat Antibody (A-2): sc-28315 de Santa Cruz Biotechnology y Anti-PKA $\alpha$  alpha/beta/gamma antibody-C-terminal (ab211265) de ABcam. Los anticuerpos pueden estar marcados para permitir su detección después de su unión con el producto genético (antígeno). Los términos "marca" o "marcado" se refieren a una composición capaz de producir una señal detectable indicativa de la presencia de la molécula marcada. Algunas marcas adecuadas incluyen radioisótopos, cromóforos de nucleótidos, enzimas, sustratos, moléculas fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas, restos bioluminescentes, y similares. Como tal, una marca es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos.

Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoadsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar dicha proteína cAMPK, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc. No obstante, en una realización particular, la cuantificación de los niveles de proteína se realiza mediante western blot, ELISA o un array de proteínas. Cuando se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o reactivo que se sabe se une a la proteína cAMPK con alta afinidad para detectar la cantidad de la misma.

Para llevar a cabo la primera etapa del método de la invención, es necesario disponer de una muestra biológica aislada del sujeto en estudio. El término "muestra" o "muestra biológica" como se usa aquí, se refiere a cualquier muestra que se puede obtener del sujeto, tal como un tejido, una célula o un fluido (suero, saliva, semen, 5 esputo, líquido cefalorraquídeo (LCR), lágrimas, moco, sudor, leche y similares), y que puede albergar información sobre la dotación genética característica de una persona. En una realización particular, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica, suero, plasma y tejido. En el contexto de la presente invención el término "aislado" implica que la muestra biológica ha sido separada o 10 extraída del resto de componentes que la acompañan de forma natural.

En una segunda etapa [etapa (b)], el método de la invención comprende comparar los niveles de expresión del gen PRKACA obtenidos en la etapa (a) con un nivel de referencia.

15 En esta etapa (b), la determinación de los niveles de expresión del gen PRKACA necesita ser correlacionada con un valor de referencia que corresponde al nivel de expresión del gen PRKACA medido en muestras biológicas de una población de referencia. En general, dichas muestras biológicas se obtendrán de sujetos que están 20 clínicamente bien documentados, en donde dichos sujetos son sujetos sanos o sujetos que muestran una sensibilidad a fludarabina corroborada. En tales muestras, las concentraciones normales (de referencia) del biomarcador (gen PRKACA) se pueden determinar, por ejemplo, proporcionando la concentración media sobre la población de referencia. Al determinar la concentración de referencia del marcador se 25 toman en cuenta varias consideraciones. Entre tales consideraciones están la edad, peso, sexo, estado físico general del sujeto y similares. Por ejemplo, se toman como grupo de referencia cantidades iguales de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 a preferiblemente más de 1.000 sujetos, preferiblemente clasificados según las consideraciones anteriores, por ejemplo de varias categorías de edad.

30 Tras la comparación de los niveles de expresión del gen PRKACA con el valor de referencia, si el nivel de expresión del PRKACA en el sujeto es menor que el nivel de referencia, se puede concluir que el tratamiento con un compuesto de fórmula (I) va a ser efectivo o que el sujeto es susceptible de ser tratado con dicho compuesto de 35 fórmula (I).

En la presente invención se entiende por "nivel de expresión menor" o "niveles de expresión menores" a una disminución del nivel de expresión del gen en cuestión con respecto al valor de referencia. Dicha disminución del nivel de expresión puede ser de,

5 al menos, 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso mayor con respecto al valor de referencia.

#### Usos de la invención

10

La invención contempla como un segundo aspecto inventivo el uso *in vitro* de los niveles de expresión del gen PRKACA para predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con un compuesto de fórmula (I) descrito anteriormente en la presente descripción, o para seleccionar a un sujeto susceptible de ser tratado con dicho 15 compuesto de fórmula (I).

De forma análoga al método de la invención, un nivel de expresión del gen PRKACA menor que un nivel de referencia es indicativo de que el tratamiento con dicho compuesto de fórmula (I) va a ser efectivo, o de que el sujeto es susceptible de ser 20 tratado con dicho compuesto de fórmula (I).

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

25 En una realización particular, el sujeto padece una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en síndrome linfoproliferativo de bajo grado, leucemias agudas secundarias y síndromes mielodisplásicos de alto grado, o el sujeto va a recibir un trasplante de un órgano o tejido. En otra realización más particular, el sujeto padece leucemia linfocítica crónica.

30

Puesto que los niveles de expresión del gen PRKACA son indicativos de la eficacia del tratamiento con un compuesto de fórmula (I), entre los usos de la presente invención también se incluye el uso de los compuestos de fórmula (I) para tratar pacientes con unos niveles de expresión del gen PRKACA menores que un nivel de referencia. Por 35 lo tanto, en otro aspecto la invención se relaciona con el uso de un compuesto de

fórmula (I), en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en síndrome linfoproliferativo de bajo grado, leucemias agudas secundarias y síndromes mielodisplásicos de alto grado, o va a recibir un trasplante de un órgano o tejido, en 5 donde los niveles de expresión del gen PRKACA en dicho sujeto son menores que un nivel de referencia. En una realización más particular, el síndrome linfoproliferativo de bajo grado padecido por el sujeto es leucemia linfocítica crónica.

En la elaboración de la composición farmacéutica, el compuesto de fórmula (I) puede 10 ir acompañado de otros componentes tales como excipientes, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables, además de otros compuestos empleados en el tratamiento de las enfermedades arriba mencionadas. Dichos excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables, así como los compuestos empleados en el tratamiento de las enfermedades mencionadas, son ampliamente 15 conocidos en el estado de la técnica y cualquiera de ellos puede emplearse en el contexto de la invención.

En la presente invención, el término "excipiente" se refiere a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición de la presente 20 invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de proporcionar consistencia o de contribuir con sabores que la hagan más agradable. Así, los excipientes pueden tener la función de mantener cohesionados los componentes, tales como almidones, azúcares o celulosas, una función edulcorante, una función colorante, una función de protección frente a los 25 medicamentos tal como el aislamiento del aire y/o la humedad, la función de llenar un comprimido, cápsula u otra forma de presentación tal como, por ejemplo, fosfato de calcio dibásico, una función de desintegración para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir ningún otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término "excipiente" se define como el 30 material incluido en las formas galénicas, se añade a los ingredientes activos o sus asociaciones para facilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades fisicoquímicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y variaciones gramaticales de los mismos, en lo que se refiere a composiciones, soportes, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente e indican que los materiales son susceptibles de ser administrados a un sujeto sin la producción de efectos fisiológicos indeseables. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en el estado de la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

El sujeto a ser tratado con la composición farmacéutica se caracteriza porque comprende unos niveles de expresión del gen PRKACA menores que un nivel de referencia. Tal como se ha explicado en aspectos inventivos anteriores, los niveles de expresión del gen PRKACA pueden cuantificarse a partir del ARN, ADNc o la proteína codificada por dicho gen. Así, en una realización particular, los niveles de expresión del gen PRKACA comprenden los niveles de expresión del ARN mensajero de dicho gen, o un fragmento de dicho ARNm, del ADN complementario de dicho gen, o un fragmento de dicho ADNc, o de sus mezclas, o los niveles de proteína codificada por el gen PRKACA.

La puesta en práctica tanto del método como los usos arriba descritos requiere el empleo de un kit que comprenda los componentes mínimos necesarios para llevar a cabo la invención. Por lo tanto, en otro aspecto la presente invención se refiere al uso *in vitro* de un kit, de aquí en adelante "kit de la invención", que comprende

- (a) una pareja de cebadores que comprenden una secuencia de nucleótidos que hibrida de forma específica con la secuencia de nucleótidos el gen PRKACA,
- (b) una sonda que hibrida de forma específica con la secuencia de nucleótidos del gen PRKACA, y/o

(c) un anticuerpo que reconoce de forma específica la proteína codificada por el gen PRKACA,

para predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con un compuesto de fórmula (I), o para seleccionar a un sujeto susceptible de ser tratado con un compuesto de fórmula (I).

En la presente invención se entiende por "kit" a aquel producto que contiene los diferentes componentes o principios activos necesarios para poner en práctica la invención, es decir, aquellos componentes necesarios para cuantificar los niveles de expresión del gen PRKACA y, si procede, administrar al sujeto el compuesto de fórmula (I) descrito previamente. Entre los componentes necesarios para cuantificar los niveles de expresión del gen PRKACA se incluyen, pero no se limitan a, cebadores, sondas y/o anticuerpos.

En la presente invención se entiende por "cebador", "iniciador" o "*primer*" a la cadena de ácido nucleico que permite que la ADN polimerasa comience la síntesis de la nueva cadena de ADN. En la mayoría de replicaciones del ADN, el principal cebador para la síntesis de ADN es una cadena corta de ARN. Este ARN lo produce una ARN polimerasa (primasa) y luego una ADN polimerasa lo elimina y lo sustituye por ADN. Como entiende el experto en la materia, los cebadores comprendidos dentro del kit de la invención comprenderán una secuencia de nucleótidos que hibrida de forma específica con la secuencia de nucleótidos del gen PRKACA. En una realización particular, el gen PRKACA comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de, al menos, un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con la secuencia SEQ ID NO: 1.

En otra realización particular, los cebadores del kit de la invención comprenden una secuencia de nucleótidos que hibrida de forma específica con la secuencia SEQ ID NO: 1, que en otra realización más particular, al menos uno de los cebadores comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 ó SEQ ID NO: 4. En otra realización todavía más particular, la pareja de cebadores comprende un primer cebador que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 y un segundo cebador que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4.

En la presente invención se entiende que una secuencia de nucleótidos dada hibrida de forma específica con otra secuencia de nucleótidos cuando ambas secuencias comparten un grado de complementariedad en condiciones de moderada o alta astringencia. Las condiciones exactas que determinan el astringencia de la hibridación dependen no solamente de la fuerza iónica, temperatura y la concentración de agentes de desestabilización como la formamida, sino también de factores como la longitud de la secuencia del ácido nucleico, la composición base, el porcentaje de

desigualdad entre las secuencias de hibridación y la frecuencia de presencia de subseries de esa secuencia dentro de otras secuencias no idénticas. Variando las condiciones de hibridación desde un nivel de astringencia en el que no ocurre la hibridación a un nivel en el que se observa primero la hibridación, pueden

- 5 determinarse las condiciones que permitirán a una secuencia dada hibridar con otra secuencia. Así, las condiciones de astringencia alta o moderada pueden determinarse empíricamente, lo cual es práctica de rutina para el experto en la materia. En general, cuánto más alta es la temperatura de hibridación y más baja la concentración de sales en el tampón de hibridación, más alta es la astringencia y sólo se dará hibridación  
10 entre secuencias de nucleótidos muy similares, es decir, con un alto grado de complementariedad. En general, se considera que cualquier cebadores o sonda cuya secuencia de nucleótidos tenga una identidad de secuencia de, al menos, el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con la secuencia SEQ ID NO: 1, hibridará de forma específica con la SEQ ID NO: 1.

15

En la presente invención se entiende por "sonda" a un fragmento de ácido nucleico de pequeño tamaño usado como herramienta para detectar a una secuencia complementaria de ácido nucleico.

- 20 Como entiende el experto en la materia, tanto las sondas como los cebadores pueden ir marcados en sus extremos para facilitar su localización. Ejemplos de marcas han sido explicados anteriormente en la presente descripción.

Como alternativa, y en realizaciones adicionales de la invención, la expresión genética  
25 se puede cuantificar mediante análisis de proteína codificada por el gen PRKACA mediante el uso de uno o más anticuerpos específicos para uno o más epítotos de productos genéticos individuales (proteínas), o fragmentos proteolíticos de los mismos, en la muestra biológica procedente de un sujeto. Así, en una realización particular del kit de la invención, la proteína codificada por el gen PRKACA es la proteína que  
30 comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de, al menos, un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

El término "anticuerpo" ha sido definido previamente. Ejemplos de anticuerpos  
35 específicos de la proteína codificada por el gen PRKACA disponibles comercialmente

incluyen, sin limitar a, PKA $\alpha$  cat Antibody (A-2): sc-28315 de Santa Cruz Biotechnology y Anti-PKAc alpha/beta/gamma antibody-C-terminal (ab211265) de ABcam. Los anticuerpos pueden estar marcados para permitir su detección después de su unión con el producto genético (antígeno).

5

Algunas metodologías de detección adecuadas para uso en la práctica de la invención incluyen, pero no se limitan a, inmunohistoquímica de muestras que contienen células o tejidos, ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA) que incluyen

ensayos de sándwich de anticuerpos de muestras de tejidos que contienen células o

- 10 muestras de sangre, espectroscopía de masas e inmuno-PCR. Preferiblemente, la metodología empleada incluye western blot, ELISA o array de proteínas.

En otra realización particular, el kit de la invención comprende además una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) descrito aspectos inventivos

- 15 anteriores.

Los términos y expresiones empleados en el presente aspecto inventivo ya han sido definidos en aspectos inventivos anteriores.

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

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

- 30 invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35

La Figura 1. NeoR proporciona resistencia a Fludarabina. Curvas de viabilidad de fibroblastos transfectados establemente con un plásmido de expresión del gen de resistencia a Neomicina (NeoR) en concentraciones crecientes de G418 o Fludarabina, comparadas con las de controles sin transfectar.

5

Figura 2. Resistencia de fibroblastos transfectantes de NeoR a diferentes análogos de nucleósidos. Curvas de viabilidad de fibroblastos transfectados o no con NeoR en concentraciones crecientes de los análogos de nucleósidos indicados.

- 10 Figura 3. La combinación con Citarabina no incrementa el efecto de la Fludarabina sobre células transfectadas con APH(3')-Ila. A. Análisis de viabilidad por XTT de fibroblastos transfectados con el gen NeoR o no transfectados, tratados o no con 0,1 µM Citarabina (AraC) y dosis crecientes de Fludarabina. B. Viabilidad de las mismas células que en A, tratadas con una concentración fija de Fludarabina (0,1  
15 µM) y dosis crecientes de Citarabina.

- Figura 4. Análisis mutacional de la resistencia a Fludarabina por APH(3')-Ila (NeoR). A. Curvas de viabilidad de fibroblastos transfectados con NeoR agreste o diversos mutantes en respuesta a dosis crecientes de Geneticina (G418) o  
20 Fludarabina. B. Efecto de la adición del antibiótico procariota Kanamicina sobre la curva de viabilidad de fibroblastos transfectados con NeoR agreste (izquierda) o el mutante K50R (derecha), creciendo en concentraciones crecientes de Fludarabina.

- Figura 5. Protección contra Fludarabina mediada por NeoR y PRKACA en  
25 diferentes líneas celulares. Curvas representativas de viabilidad de líneas celulares de fibroblastos humanos, 293FT y MCF7, transfectadas con los mutantes del gen NeoR indicados o con el ANDc de PRKACA, en respuesta a dosis crecientes de Fludarabina. La expresión del ARNm de los genes transfectados se muestra en el panel de la derecha.  
30

Figura 6. Encaje de nucleósidos de purinas en el sitio de unión para nucleótidos de APH(3')-Ila.

La unión de ATP a APH(3')-Ila (1nd4.pdb) (gris oscuro) fue modelada utilizando como modelo la estructura de APH(2')-Ila (2hav.pdb) (gris claro)(A). Los residuos implicados  
35 en la unión del ATP están resaltados. La unión de nucleósidos de purinas se modeló

utilizando las coordenadas del ATP relativos a APH(3')-Ila. Fludarabina (B) y Clofarabina (C) presentan un grupo hidroxilo y fluoruro en la posición C2' del anillo de ribosa, respectivamente. Cladribina (D) carece de ningún radical en esa posición. La distancia al grupo carboxilo del Asp208 de APH(3')-Ila (guiones grises) del grupo hidroxilo de la Fludarabina y del ion fluoruro de Clofarabina es 2.7 .

**Figura 7. Efecto de kinasas eucariotas sobre la resistencia a Fludarabina.**  
 A. Curvas de viabilidad de una línea celular de fibroblastos transfectantes para ERK2 creciendo en concentraciones crecientes de Fludarabina, comparada con células control no transfectadas (UT). Un western blot mostrando la sobreexpresión de ERK2 se presenta a la derecha. B. Viabilidad de células 293FT y MCF7 transfectadas establemente con PRKACA, NeoR o no transfectadas, en concentraciones crecientes de Fludarabina. La expresión del mRNA de NeoR y PRKACA en cada caso se muestra debajo.

15

**Figura 8. Las células transfectadas con NeoR no incorporan Fludarabina.**  
 Curvas de viabilidad de fibroblastos sensibles a Fludarabina creciendo en medio condicionado por las líneas celulares indicadas crecidas durante 24 horas en 1 $\mu$ M Fludarabina. Se muestra la curva de los fibroblastos incubados en Fludarabina fresca, 20 como referencia.

25

**Figura 9. Fludarabina induce la monoubiquitinación de FANCD2 y apoptosis, y NeoR lo evita.** A. Análisis de la expresión de mRNA de genes regulados por Fludarabina (10 $\mu$ M, 16h) en fibroblastos transfectantes para diferentes mutaciones de APH(3')-Ila, su forma agreste (wt) o no transfectadas (UT). B. Análisis del ciclo celular de células transfectadas con NeoR o no transfectadas en presencia o ausencia de 10 $\mu$ M Fludarabina. C. Western blot que muestra el cambio en la movilidad de FANCD2 y la digestión de PARP inducidos por 10 $\mu$ M Fludarabina en células transfectadas con los mutantes de NeoR indicados, su forma agreste (wt) o no transfectadas (UT). D. 30 Comparación entre el cambio de movilidad de la banda de FANCD2 inducida por 10  $\mu$ M Fludarabine (izquierda) o por 100  $\mu$ M Citarabina (derecha) en fibroblastos transfectados con NeoR o no transfectados (UT). Las cantidades de las proteínas GAPDH y p53 se muestran como control.

35

**Figura 10. APH(3')-Ila posee actividad ATPasa and F-Ara-AMP la inhibe.**

A. Hidrólisis de ATP in vitro catalizada por APH(3')-Ila (1.5 $\mu$ M) en ausencia (gris claro) o presencia (gris oscuro) de 200  $\mu$ M Kanamicina. Se muestra la actividad en presencia de 200 $\mu$ M Kanamicina pero sin enzima como control (negro). B. Efecto de la Fluradabina monofosfato (F-Ara-AMP) sobre la actividad ATPasa de APH(3')-Ila. La figura muestra los niveles de actividad ATPasa relativa en presencia de diferentes derivados de nucleótidos: Fludarabina monofosfato (FAP), adenosina monofosfato (AMP) o adenosina 5'-( $\beta$ , $\gamma$ -imido)trifosfato (AMP-PNP). En ausencia de nucleótidos (muestra control), la proteína presenta un grado de hidrólisis de ATP de 2100 nmol ATP/min/mg de proteína, que se consideró como el 100% de actividad. Los datos representan el promedio de diez experimentos (SD-barras de error).

**Figura 11. cAMPK también protege frente a Fludarabina.** A. Viabilidad de células transfectadas establemente con PRKACA o un vector vacío, en concentraciones crecientes de Fludarabina. El análisis de la expresión del mRNA de PRKACA se muestra a la derecha. B. Encaje de F-Ara-ATP en el bolsillo del ATP de cAMPK.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

**La aminoglicósido-3'-fosfotransferasa-IIa procariota y la relacionada estructuralmente kinasa dependiente de AMP cíclico eucariota, confieren resistencia a Fludarabina**

## I. MATERIALES Y MÉTODOS

### 25 Cultivo celular y ensayo de viabilidad celular

Los fibroblastos y las células 293FT embrionarias de riñón, ambas transformadas con el antígeno T grande de SV40, fueron mantenidas en medio DMEM (BioWest, Nuaillé, Francia) suplementado con un 10% de suero fetal de ternera inactivado por calor en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células MCF7 de cáncer de mama se mantuvieron de manera similar en medio RPMI con 10% de suero fetal de ternera. Para determinar la resistencia de las células a los tratamientos, se sembraron 3.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos e incubadas 3 días en presencia de las drogas que se indican. La viabilidad celular se determinó utilizando el XTT Cell Proliferation Kit II (Roche, Basel, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Análisis por RT-PCR**

Se utilizó el reactivo TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, EEUU) para preparar RNA total.

Para determinar la expresión de mRNA, se utilizó un método de retrotranscripción y

- 5 PCR semicuantitativa (RT-PCR). Para la reacción RT, el RNA (5µg) fue cebado con oligonucleótidos hexaméricos al azar y retrotranscritos con la transcriptasa inversa Superscript MMLV (Invitrogen, Carlsbad, EEUU) en un volumen de 20µl, siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA fue utilizado como molde en amplificaciones con cebadores para los genes que se muestran en la tabla 1.

10

<b>Gen</b>	<b>Cebadores (5'-3')</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
PRKACA	GAGCAGGAGAGCGTGAAAGA	3
	TCATGGCATAGTGGTTCCCG	4
GAPDH	GGCTGAGAACGGGAAGCTTGCA	5
	CGGCCATCACGCCACAGTTTC	6
c-jun	GTGCCGAAAAAGGAAGCTGG	7
	CTGCGTTAGCATGAGTTGGC	8
Bcl-XL	GGCAACCCATCCTGGCACCT	9
	CTGCGTTAGCATGAGTTGGC	10
MMP-9	CGGAGCACGGAGACGGGTAT	11
	TGAAGGGGAAGACGCACAGC	12
NeoR	GACTGGGCACAACAGACAATCGGCT	13
	TGATATTGGCAAGCAGGCATGCC	14

Tabla 1.

- 15 Las amplificaciones se realizaron siguiendo las indicaciones del fabricante de la polimerasa termorresistente durante 32 ciclos, excepto en el caso de GAPDH que se utilizaron 25 ciclos.

**Análisis por Western Blot**

Se obtuvieron lisados de célula completa tal como se ha descrito previamente (Sánchez-Carrera D, et al. Biosci Rep. 2015 Jun 11;35(3)). La concentración de 5 proteína se determinó por BCA siguiendo las instrucciones del fabricante (G Biosciences, St. Louis, USA). Las proteínas (25 $\mu$ g) se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a filtros de PVDF. Los *blots* se incubaron con anticuerpos contra FANCD2 (H-300), p53 (FL-393), PARP (H-250), ERK2 (C-14), GAPDH (FL-335) o alfa-tubulina (B-5-1) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EEUU), y después incubados con un 10 anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EEUU). El anticuerpo unido se detectó mediante un ensayo quimioluminiscente (Thermo Scientific, Rockford, EEUU) en una cámara LAS4000 mini (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, Reino Unido).

**15 Modelado molecular y encaje del ligando**

Se utilizó el modelo atómico de APH(3')-Ila (Número de acceso a Protein Data Bank 1nd4.pdb; descrita en Nurizzo et al. J.Mol.Biol. 2003, 327(2): 491-506) como molde. Las coordenadas estructurales de fludarabina, clofarabina y cladribina se obtuvieron de la base de datos PubChem. Se prepararon las moléculas para su encaje con la 20 herramienta DockPrep del paquete informático UCSF Chimera. Este proceso incluyó la adición de hidrógenos, la sustitución de las cadenas laterales incompletas con la biblioteca Dunbrack rotamer, la eliminación de las moléculas de agua como disolvente y la inclusión de cargas parciales utilizando AMBERff12SB force field. Los archivos que contenían las coordenadas atómicas de la proteína diana y los ácidos grasos se 25 enviaron al servidor de SwissDock, que utiliza el motor EADock dihedral spacing sampling (DSS) para encajar ligandos de tipo fármaco sobre macromoléculas. Las pruebas de encaje se realizaron a ciegas sobre la totalidad de la molécula, sin definir ninguna región específica de la proteína para evitar un sesgo. Los resultados se examinaron con UCSF Chimera y los emparejamientos fueron clasificados respecto al 30 valor Full-Fitness (FF) de Swissdock. Las poses con la mejor valoración FF y con la menor energía fueron finalmente seleccionadas. Se llevó a cabo un refinamiento posterior utilizando los coordinados del ATP unido a APH(2')-IVa (Número de acceso Protein Data Bank 3hav.pdb; Young P.G. et al. 2009. J. Bacteriol. 191(13): 4133-4143 tras alineamiento con APH(3')-Ila (número de acceso de Protein Data Bank 1nd4.pdb; 35 Nurizzo et al. cited ad supra). Las representaciones de las estructuras moleculares se

generaron con PyMOL. Se siguió un procedimiento similar para encajar la Fludarabina en cAMPK. En este caso se usaron las coordenadas del dominio catalítico de la proteína kinasa dependiente de cAMP de *Mus musculus* (Número de acceso Protein Data Bank 1aTP.pdb; Zheng J, et al. Protein Sci. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 5 1993, 2(10):1559–73) como diana.

### ***Clonaje de NeoR y PRKACA***

El gen NeoR fue amplificado del vector pCR3.1 (Invitrogen, Carlsbad, EEUU), clonado en el vector pGEX 2T y posteriormente subclonado en el vector de expresión pET28a 10 (Novagen, Madison, EEUU). La proteína resultante contenía una etiqueta de 34 residuos de His en el dominio N-terminal. NeoR fue también clonado en un vector de expresión con un marcador de selección eucariota de resistencia a Puromicina. Los cDNAs de PRKACA y ERK2 se amplificaron por RT-PCR y clonados en el mismo vector de expresión. Los diferentes mutantes de APH(3')-Ila se obtuvieron mediante 15 mutagénesis dirigida por PCR sobre el gen NeoR y los productos se clonaron en el mismo vector que el cDNA agreste. Todas las construcciones fueron confirmadas mediante secuenciación.

### ***Sobreexpresión y purificación de APH(3')-Ila***

20 Se indujo la sobreexpresión de la proteína en la cepa C41(DE3) de *Escherichia coli* (Miroux y Walker, 1996; J Mol Biol, 1996 vol. 260(3) pp. 289-298) mediante adición de 1mM de IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranósido). Se crecieron las bacterias en 1 litro de medio LB y, tras 6 horas de inducción a 25°C, las células se recolectaron y se guardaron a -80°C. Las células descongeladas se resuspendieron en 40 ml de tampón 25 A (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl y 0,001% PMSF) y lisadas por sonicación. Los lisados se recolectaron por centrifugación y los sobrenadantes se cargaron en una columna HisTrap HP (1 ml)(GE Healthcare). La proteína se eluyó de la columna en un gradiente lineal de imidazol mediante el uso del tampón B (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 500 mM imidazol y 0,001% PMSF). Las fracciones que contenían 30 APH(3')-Ila fueron agrupadas y cargadas en una columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrada con un tampón 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5% (w/v) glicerol y 0,001% PMSF. La proteína se guardó a -80°C.

### ***Ensayo de hidrólisis de ATP***

La hidrólisis de ATP se analizó mediante un ensayo de enzima acoplada, tal como se ha descrito previamente (Kreuzer y Jongeneel, 1983 Meth Enzymol, 1983 vol. 100 pp. 144-160). La proteína APH(3')-Ila (1,5 µM) se pre-incubó con los sustratos AMP, Fludarabina monofosfato o AMP-PNP (10 mM) durante 5 minutos a 37°C. Las 5 reacciones se iniciaron mediante la adición de esta muestra a una mezcla para ensayo de ATPasa (150 µl) consistente en 50 mM Pipes-NaOH pH 7.0, 35 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05 mM ATP, 225 µM Kanamicina, 5% (w/v) glicerol, 0,5 mM fosfoenolpiruvato, 0,25 mM NADH, 60 µg/ml piruvato kinasa y 60 µg/ml lactato deshidrogenasa (Roche Applied Science). La actividad se midió a través del descenso 10 en la absorbancia de NADH a 340 nm durante 5 minutos a 37°C en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu).

## II. RESULTADOS

15 ***La transfección con un gen de resistencia a Neomicina provee resistencia a Fludarabina.***

El gen de resistencia a neomicina incluido en la mayoría de los plásmidos comerciales codifica una aminoglicósido-3'-fosfatasa-Ila (APH(3')-Ila) que inactiva diferentes 20 antibióticos aminoglicosídicos mediante la transferencia de un grupo fosfato desde una molécula de ATP. Durante el desarrollo de nuestros experimentos se observó que la transfección estable de fibroblastos con plásmidos que contenían este gen de resistencia proveía un incremento de resistencia al análogo de purinas fludarabina. Este efecto no se debía al gen específico transfectado, ya que el vector vacío 25 generaba una resistencia similar (Figura 1). Sin embargo, esas mismas células transfectadas con un gen de resistencia a puromicina, otro gen ampliamente utilizado, se mantenían tan sensibles a la fludarabina como sus células parentales no transfectadas (Figura 1). De esta manera, se pudo concluir que la resistencia a fludarabina observada se debe a la proteína APH(3')-Ila codificada por el plásmido.

30 ***APH(3')-Ila confiere resistencia a Fludarabina y Clofarabina, pero no a otros análogos de nucleósidos.***

Dado que hay otros análogos de nucleósidos comúnmente utilizados en el tratamiento de diferentes tumores, se quiso saber si APH(3')-Ila confería resistencia también a otras drogas relacionadas estructuralmente. Células transfectadas con APH(3')-Ila 35 mostraban resistencia a clofarabina, otro análogo de nucleósidos (Figura 2), aunque

en menor medida. Como observación general, la eficacia de la fludarabina como citotóxico en los experimentos con fibroblastos fue mucho mayor que con ninguna de las otras drogas probadas que requerían dosis más elevadas para observar una reducción en la viabilidad celular.

5

- En la práctica clínica, un tratamiento previo con fludarabina a menudo mejora la respuesta a citarabina, así que se decidió investigar la respuesta de células transfectadas con APH(3')-Ila a una combinación de ambas drogas. Las células se trataron con una concentración fija de una de las drogas y con concentraciones 10 crecientes de la otra. Sin embargo, la combinación fludarabina+clofarabina no modificó la respuesta de las células (Figura 3).

***La resistencia a geneticina (G418) y a fludarabina requieren dominios diferentes de la proteína.***

- 15 La fludarabina es rápidamente fosforilada dentro de las células a su forma trifosfato activa (F-Ara-ATP), convirtiéndose así en un análogo del ATP, de modo que es probable que su interacción directa con APH(3')-Ila pueda catalizar su desactivación. Para probar esta hipótesis, se estudiaron las mutaciones de la enzima descritas previamente, para estudiar su influencia en la resistencia a fludarabina. Se generaron 20 líneas celulares estables que llevaban mutaciones H188Y, R211H, K50R y D190A de APH(3')-Ila. H188Y y R211H son mutaciones que alteran el bolsillo para el aminoglicósido de la proteína y, en consecuencia, interfieren su capacidad de desactivar G418 (Figura 4A). Sin embargo, estas dos mutaciones no alteran significativamente la resistencia a Fludarabina mediada por APH(3')-Ila (Figura 4A). La 25 lisina 50 se encuentra en el sitio de unión del ATP, donde se ha propuesto que interacciona con el fosfato  $\beta$  del nucleótido. La introducción de la mutación K50R en APH(3')-Ila afecta grandemente a la inducción de resistencia tanto a G418 como a fludarabina en fibroblastos (Figura 4A). Algo similar ocurre cuando la Asp190 se muta a Ala. Asp190 es considerada el residuo catalítico de la enzima y su mutación la 30 inactiva completamente. Tal como se muestra en la Figura 4A, las células transfectadas con el mutante D190A-APH(3')-Ila muestran una sensibilidad a fludarabina similar a la de las células parentales no transfectadas.

- Para descartar un posible efecto específico de célula, se analizó la protección a 35 fludarabina mediada por APH(3')-Ila en otras líneas celulares. La transfección del gen

NeoR en células 293FT de carcinoma renal embrionario, o en células MCF7 de cáncer de mama también proporcionaba protección frente a la fludarabina (Figura 5). La introducción de las mutaciones previamente descritas en la proteína APH(3')-Ila tuvieron efectos similares sobre la protección contra fludarabina.

5

Estas observaciones sugieren que la fludarabina y los aminoglicósidos se unen a sitios diferentes de APH(3')-Ila, así que se decidió probar sin existía algún efecto sinérgico al usar un tratamiento combinado. El tratamiento de las células con una dosis fija de kanamicina, un antibiótico procariótico, y dosis crecientes de fludarabina mejoró la

10 viabilidad de los fibroblastos transfectadas bien con la forma agreste de APH(3')-Ila o con su mutante K50R (Figura 4B).

En conjunto, estos resultados sugieren que la fludarabina se une al bolsillo del ATP de APH(3')-Ila y es desactivada por un mecanismo nuevo desconocido.

15

***Encaje de los análogos de purinas en la estructura de APH(3')-Ila.***

La resistencia a los análogos de purinas de las células transfectadas con APH(3')-Ila dependía del nucleósido usado, lo que sugería un modo de unión diferente de los nucleósidos a la proteína. Con el fin de explorar los posibles sitios de unión para

20 nucleósidos de purina en APH(3')-Ila, se llevó a cabo un análisis asistido por ordenador. Las predicciones ciegas de encaje utilizando el motor *EADock dihedral spacing sampling* del servidor Swiss-dock (<http://www.swissdock.ch/>) mostró el sitio de unión del ATP como el punto más probable de unión de los análogos de purina. La mayoría de las poses de unión coincidían en este sitio. Dado que no hay disponible

25 ninguna estructura de APH(3')-Ila unida a ATP o a algún otro nucleótido, se utilizaron las coordenadas de APH(2')-Ila (Número de acceso Protein Dta Bank 3hav.pdb; Young et al. 2009 cited *ad supra*) para modelar las interacciones del ATP con APH(3')-Ila. Los residuos implicados en las interacciones con el anillo de adenina (por ejemplo, Y87 y D219 en APH(2')-Ila; F48 y D208 en APH(3')-Ila) y con la cadena de fosfato (K42 y

30 E56 en APH(2')-Ila; K50 y E63 en APH(3')-Ila) se muestran en la Figura 6A. Los modelos de unión para fludarabina y clofarabina fueron refinados utilizando como modelo las coordenadas del ATP en el modelo de APH(3')-Ila. La fludarabina y la clofarabina tienen un grupo hidroxilo y un ion fluoruro en la posición C2' del anillo de ribosa, respectivamente,. Tal como se observa en las Figuras 6B y 6C, las distancias  
35 de estos radicales de la fludarabina y la clofarabina al grupo carboxilo de la Asp208 es

menor de 3Å. En apoyo de esta idea, se pudo demostrar que la mutación de Asp208 (D208A) tiene un profundo efecto en la resistencia a fludarabina mediada por APH(3')-Ila (Figura 5).

5 ***APH(3')-Ila bloquea la incorporación de fludarabina a las células.***

Para tratar de esclarecer el mecanismo por el que APH(3')-Ila protege a las células del efecto deletéreo de la fludarabina, los inventores llevaron cabo experimento para averiguar si aquella era capaz de impedir su incorporación en los ácidos nucleicos de las células o simplemente interfería con los mecanismos de apoptosis activados tras la 10 incorporación de fludarabina. Con este fin, se crecieron en presencia de fludarabina células transfectadas con APH(3')-Ila o células portadoras de una forma mutante de la enzima. Tras 24 horas de incubación, la fludarabina restante se ensayó en esos medios condicionados cultivando células sensibles a fludarabina en ellos. Los experimentos mostraron que los fibroblastos que crecieron en medio condicionado por 15 células transfectadas con APH(3')-Ila experimentaron una reducción en su viabilidad similar a las que crecieron en fludarabina fresca (Figura 7). Al contrario, el medio condicionado de células no transfectadas o transfectadas con el mutante APH(3')-Ila K50R apenas afectó la viabilidad de las células receptoras. En conjunto, estos experimentos sugieren que APH(3')-Ila impide que la Fludarabina sea incorporada por 20 las células.

***Fludarabina induce monoubiquitinación de FANCD2 pero APH(3')-Ila lo impide.***

Fludarabina es un análogo de purinas que se incorpora en el DNA recién sintetizado, dando lugar a la terminación de la síntesis de la cadena y la inhibición de las enzimas 25 implicadas en la generación de nucleótidos y la síntesis de RNA, desembocando en la muerte celular. De acuerdo con datos previamente publicados, pudimos observar que la fludarabina induce genes como c-jun y reprime la expresión de otros como Bcl-XL y MMP-9, involucrados en la modulación de las rutas de apoptosis (Figura 8A). Ciertamente, fludarabina indujo apoptosis en fibroblastos, tal como se deriva del 30 análisis de su ciclo celular y de la digestión de PARP (Figuras 8B y 8C). Estos efectos fueron completamente bloqueados en células transfectadas con APH(3')-Ila agreste o que albergaban las mutaciones H188Y o R211H. Sin embargo, las mutaciones K50R y D190A socavaron la capacidad de APH(3')-Ila de bloquear la digestión de PARP y la fragmentación celular (Figuras 8A y 8C).

Interesantemente, observamos que el tratamiento con Fludarabina indujo la monoubiquitination de FANCD2 (Figuras 8A y 8D), una indicación de que estaba siendo incorporada al DNA y atascando su replicación. La transfección de APH(3')-Ila en los fibroblastos bloqueó la monoubiquitination de FANCD2, pero las mutaciones 5 que afectaban a su inducción de resistencia a Fludarabina la restauraban (Figura 8C).

***La actividad ATPasa de APH(3')-Ila es inhibida por Fludarabina monofosfato.***

El análisis mutacional y las predicciones de interacción sugirieron que el bolsillo del ATP actúa como el sitio de unión de la fludarabina en APH(3')-Ila. Por tanto, se 10 hipotetizó que en presencia de fludarabina trifosfato (F-Ara-ATP), APH(3')-Ila podría hidrolizar este sustrato en vez de ATP, impidiendo así su incorporación al DNA. Con vistas a obtener evidencias directas de esto, se probó si la fludarabina era un sustrato de la enzima. Se purificó APH(3')-Ila para medir su actividad ATPasa *in vitro*. Los experimentos demostraron una discreta actividad de hidrólisis de ATP del enzima (~17 15 nmol ATP/minuto/mg), aunque era fuertemente potenciada cuando se añadía kanamicina a la reacción (~2100 nmol ATP/minuto/mg) (Figura 9A). Dado que no hay fludarabina trifosfato comercialmente disponible (en la práctica clínica a los pacientes se les administra la isoforma monofosfato, la cual es ulteriormente fosforilada dentro 20 de las células), se decidió usar la forma monofosfato en los ensayos *in vitro*. Se conjeturó que si la Fludarabina trifosfato es un sustrato genuino de APH(3')-Ila, su forma monofosfato actuaría como inhibidor de la reacción de hidrólisis de ATP, de forma similar a como el AMP hace con otras ATPasas. Ciertamente, cuando la Fludarabina monofosfato (F-Ara-AMP) se añadió a la reacción, se observó una 25 reducción del 35% en la actividad ATPasa de APH(3')-Ila, mientras que el AMP indujo una inhibición del 50% (Figura 9B). Estos resultados indican que la fludarabina monofosfato se une a APH(3')-Ila y sugiere que la defosforilación de la forma activa de fludarabina es el mecanismo de resistencia mediado por la enzima.

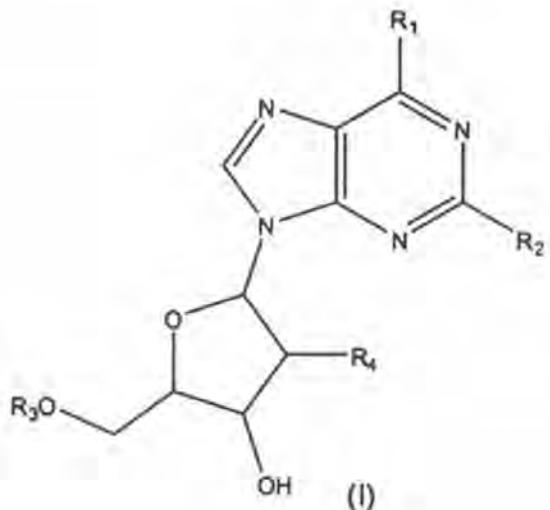
***Análisis de kinasas eucariotas con similitud estructural a APH(3')-Ila.***

30 Los estudios cristalográficos de APH(3')-Ila y de algunos de los miembros de su familia revelaron una relación estructural con algunas kinasas eucariotas, de modo que nos preguntamos si un incremento de la expresión de estas kinasas podría generar refractariedad de los pacientes al tratamiento con fludarabina. Dos de las kinasas eucariotas con alta similitud estructural con APH(3')-Ila son ERK (*extracelular 35 regulated MAP kinase*) y cAMPK (la subunidad catalítica de la kinasa activada por

cAMP, codificada por el gen PRKACA). Mientras que la sobreexpresión de ERK2 no indujo ningún cambio en la viabilidad de fibroblastos humanos en respuesta a fludarabina (Figura 10B), la transfección de PRKACA confirió una resistencia a la droga similar a la obtenida con APH(3')-Ila (Figura 11A). Se obtuvieron resultados similares cuando PRKACA fue sobreexpresada en otras líneas celulares (Figura suplementaria 10A). Una simulación ciega indicó que la fludarabina se une a cAMPK en el bolsillo del ATP (Figura 11B).

## REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con un compuesto de fórmula (I), o para seleccionar a un sujeto susceptible de ser tratado con un compuesto de fórmula (I),



donde:

R<sub>1</sub> se selecciona de entre NH<sub>2</sub> o OCH<sub>3</sub>,

R<sub>2</sub> se selecciona de entre un halógeno o NH<sub>2</sub>,

R<sub>3</sub> se selecciona de entre H o PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>,

R<sub>4</sub> se selecciona de entre OH o un halógeno,

o cualquiera de sus isómeros o sales farmacéuticamente aceptables, donde el método comprende las siguiente etapas

- (a) cuantificar los niveles de expresión del gen proteína kinasa dependiente de AMPc (gen PRKACA) en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, y
- (b) comparar los niveles de expresión de dicho gen con un nivel de referencia, en el que un nivel de expresión de dicho gen menor que un nivel de referencia es indicativo de que el tratamiento con un compuesto de fórmula (I) va a ser efectivo, o de que el sujeto es susceptible de ser tratado con un compuesto de fórmula (I).

2. Método según la reivindicación 1, donde R<sub>1</sub> es NH<sub>2</sub>.

3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde R<sub>2</sub> es F, Cl o NH<sub>2</sub>.

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R<sub>4</sub> es F o OH.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el compuesto de fórmula (I) es fludarabin fosfato o clofarabina.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sujeto padece una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en síndrome linfoproliferativo de bajo grado, leucemias agudas secundarias y síndromes mielodisplásicos de alto grado, o va a recibir un trasplante de un órgano o tejido.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el síndrome linfoproliferativo de bajo grado es leucemia linfocítica crónica.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la cuantificación de los niveles de expresión del gen PRKACA comprende la cuantificación del ARN mensajero de dicho gen, o un fragmento de dicho ARNm, el ADN complementario de dicho gen, o un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la cuantificación de los niveles de expresión del gen PRKACA se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o un array de ADN o ARN.
10. Método según una cualquiera de las reivindicación 1 a 7, en el que la cuantificación de los niveles de expresión del gen PRKACA comprende la cuantificación de los niveles de proteína codificada por dicho gen o un fragmento de la misma.
11. Método según la reivindicación 10, en el que la proteína codificada por el gen PRKACA es la proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una secuencia de identidad de, al menos, un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 (GenBank NP\_002721.1).
12. Método según la reivindicación 10 u 11, en el que la cuantificación de los niveles de proteína se realiza mediante western blot, ELISA o un array de proteínas.
13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el gen PRKACA comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de, al menos, un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con la secuencia SEQ ID NO: 1 (GenBank NG\_029699.1).

14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica, suero, plasma y tejido.
15. Uso de la expresión *in vitro* del gen PRKACA para predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con un compuesto de fórmula (I) descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o para seleccionar a un sujeto susceptible de ser tratado con un compuesto de fórmula (I) descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
16. Uso según la reivindicación 15, en el que el sujeto padece una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en síndrome linfoproliferativo de bajo grado, leucemias agudas secundarias y síndromes mielodisplásicos de alto grado, o el sujeto va a recibir un trasplante de un órgano o tejido.
17. Uso según la reivindicación 16, en el que el síndrome linfoproliferativo de bajo grado es leucemia linfocítica crónica.
18. Uso *in vitro* de un kit que comprende
  - (a) una pareja de cebadores que comprenden una secuencia de nucleótidos que hibrida de forma específica con la secuencia de nucleótidos del gen PRKACA,
  - (b) una sonda que hibrida de forma específica con la secuencia de nucleótidos del gen PRKACA, y/o
  - (c) un anticuerpo que reconoce de forma específica la proteína codificada por el gen PRKACA, para predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con un compuesto de fórmula (I) descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o para seleccionar a un sujeto susceptible de ser tratado con un compuesto de fórmula (I) descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
19. Uso de un kit según la reivindicación 18, en el que al menos uno de los cebadores comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 ó SEQ ID NO: 4.
20. Uso de un kit según la reivindicación 18 ó 19, en el que la pareja de cebadores comprende un primer cebador que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 y un segundo cebador que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4.
21. Uso de un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en el que la proteína codificada por el gen PRKACA es la proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de, al menos, un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 (GenBank NP\_002721.1).

22. Uso de un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en el que el gen PRKACA comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de, al menos, un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con la secuencia SEQ ID NO: 1 (GenBank NG\_029699.1).

23. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, en el que el kit comprende además una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

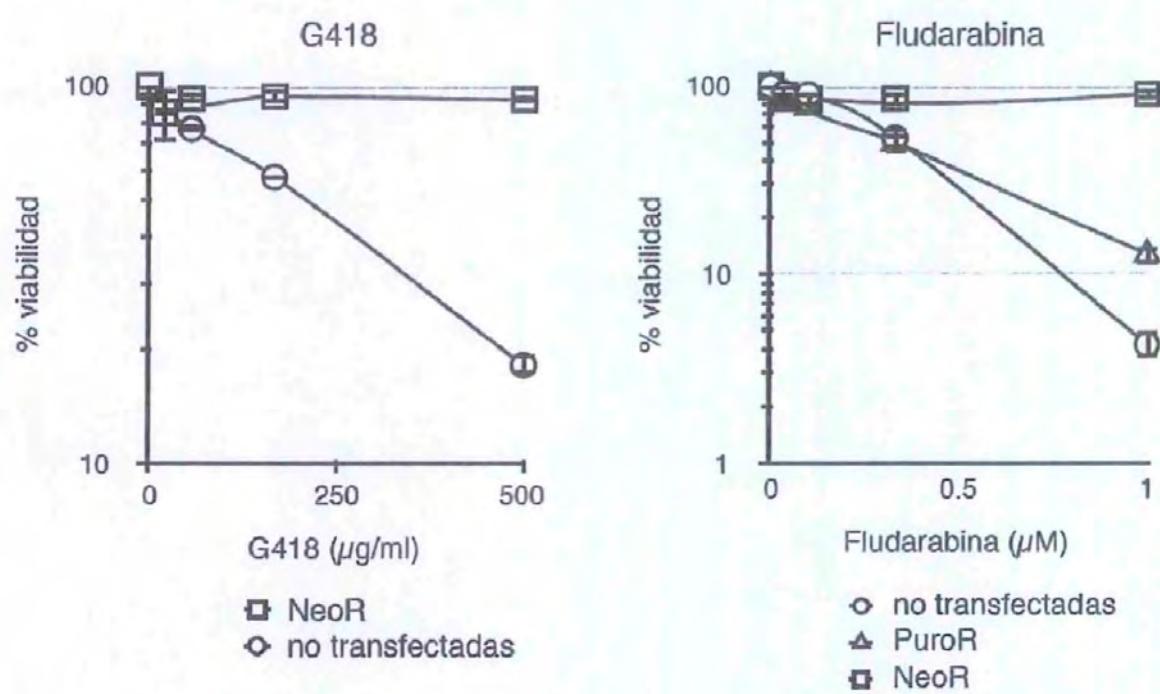


FIG. 1

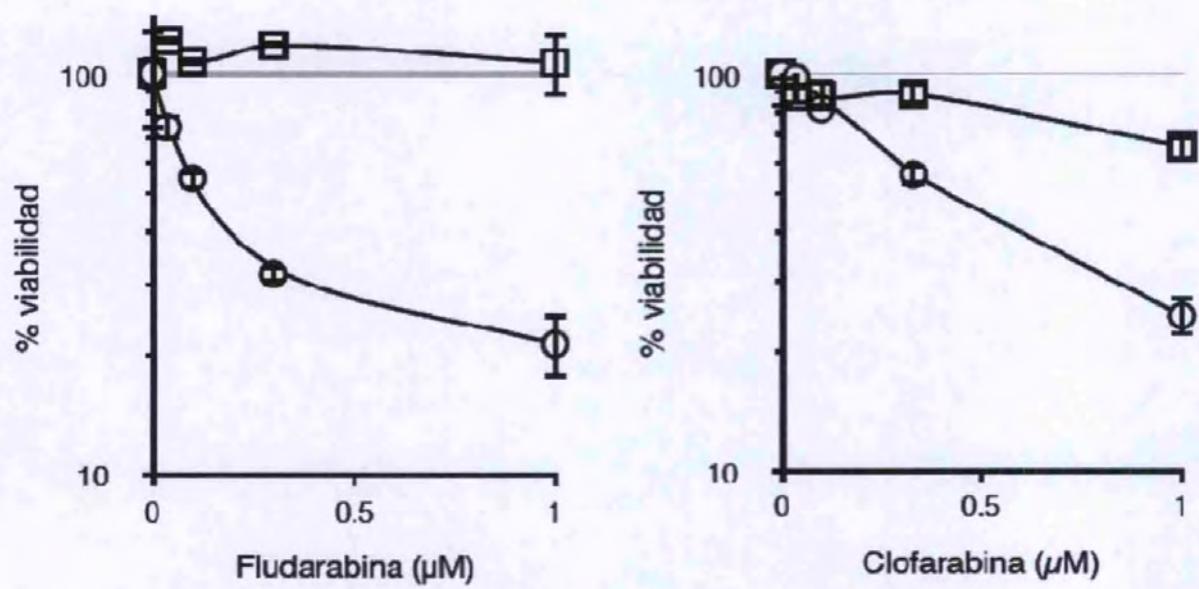


FIG. 2

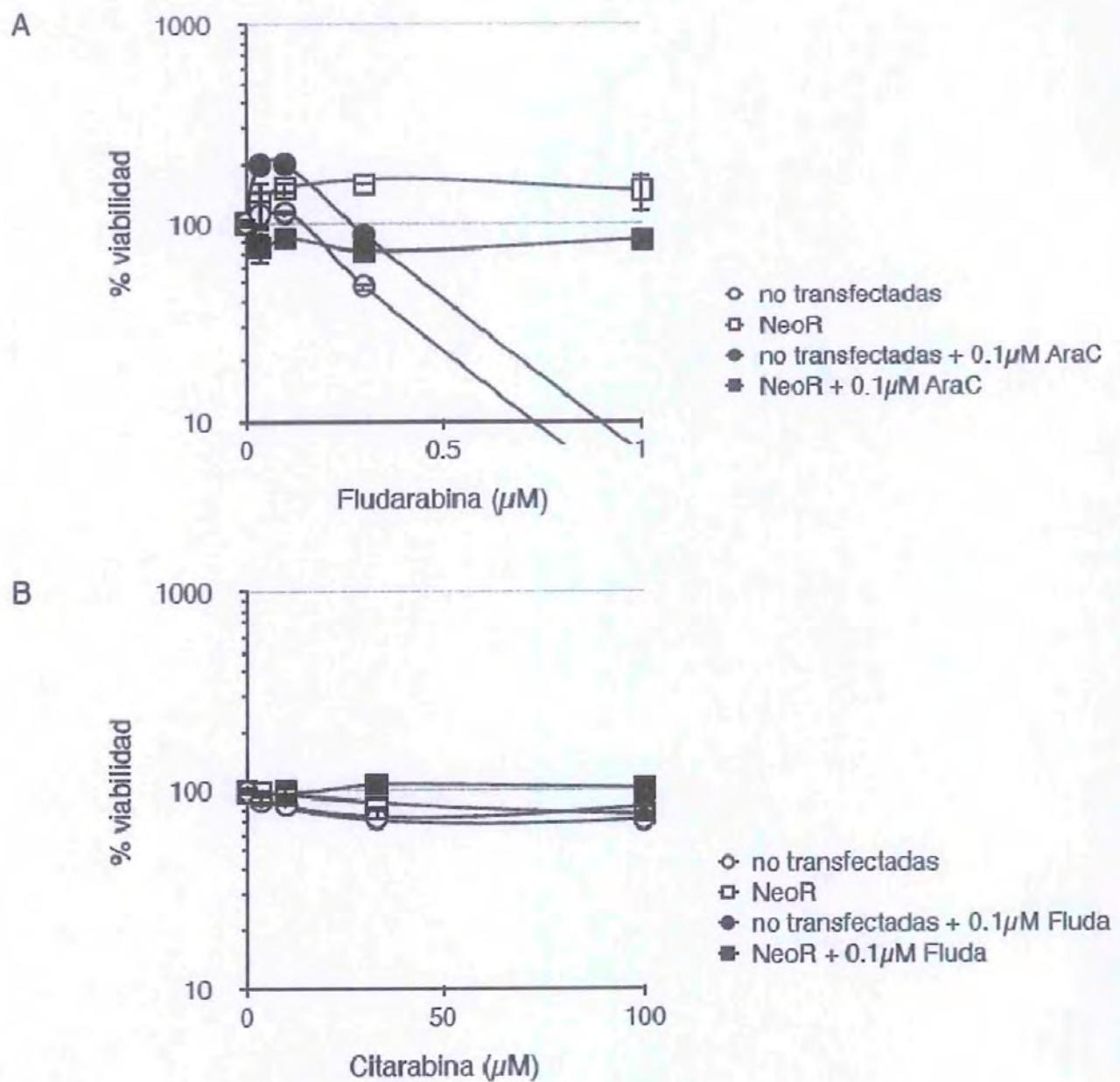


FIG. 3

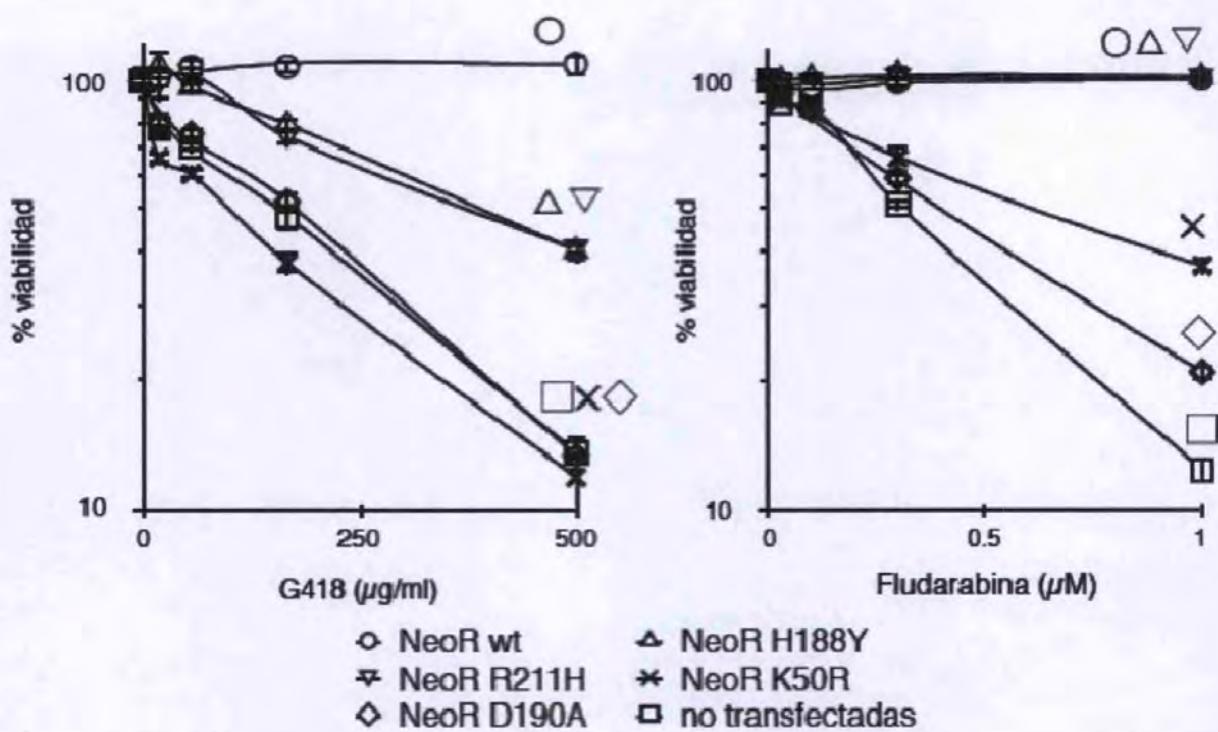
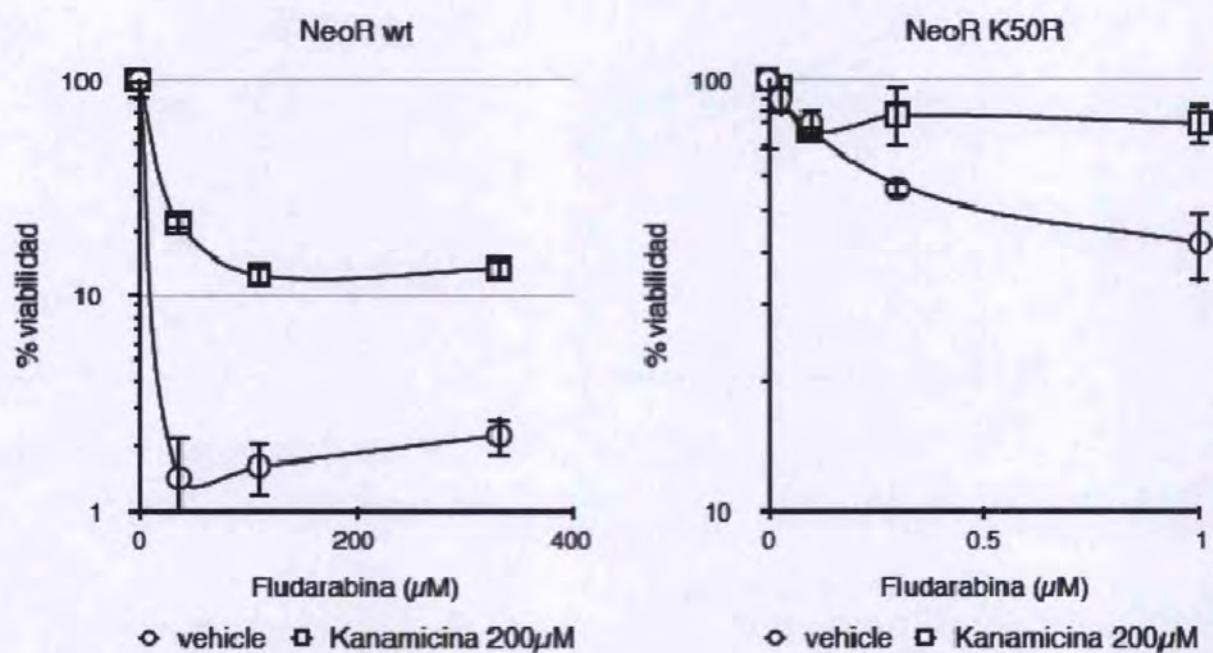
**A.****B**

FIG. 4

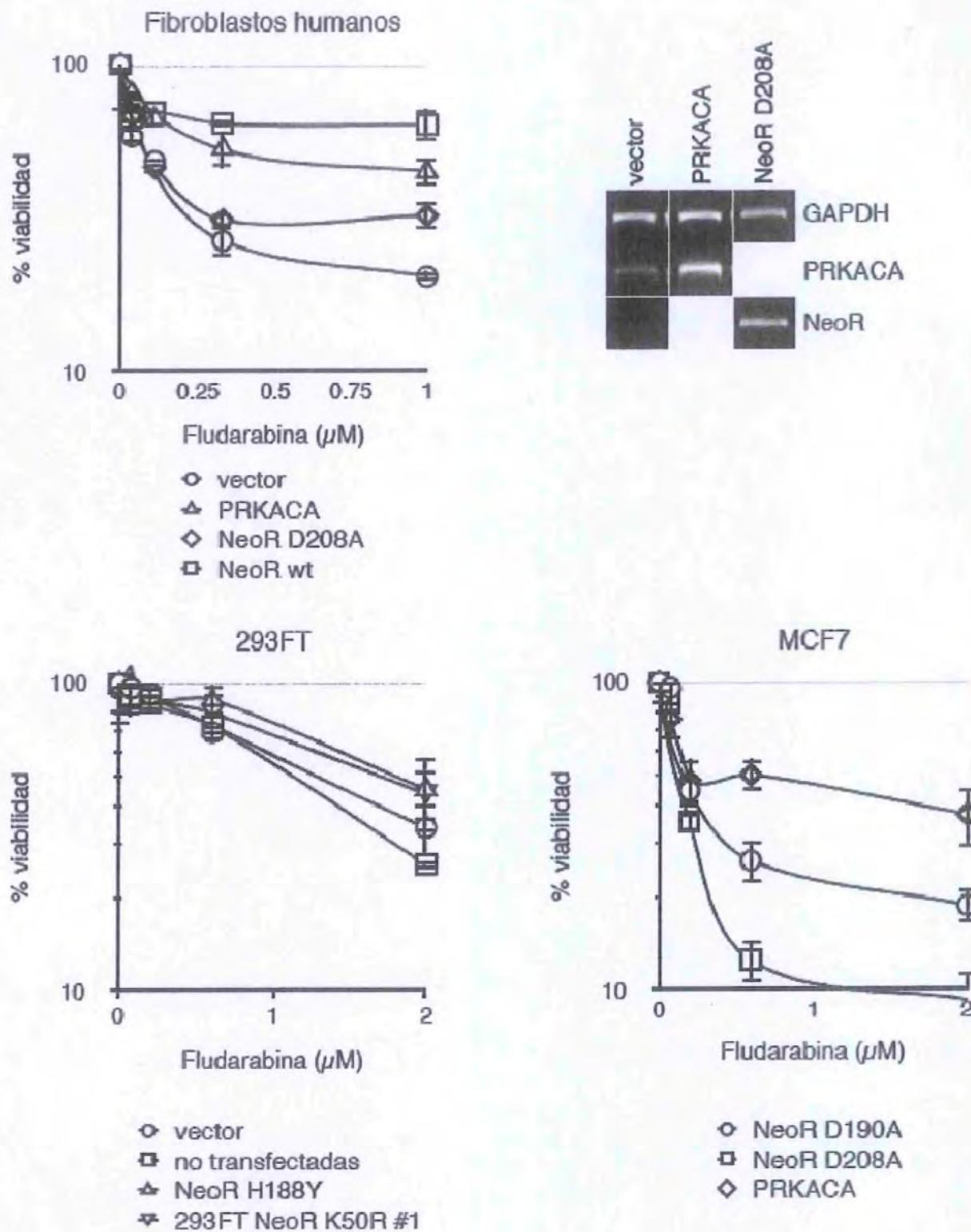


FIG. 5

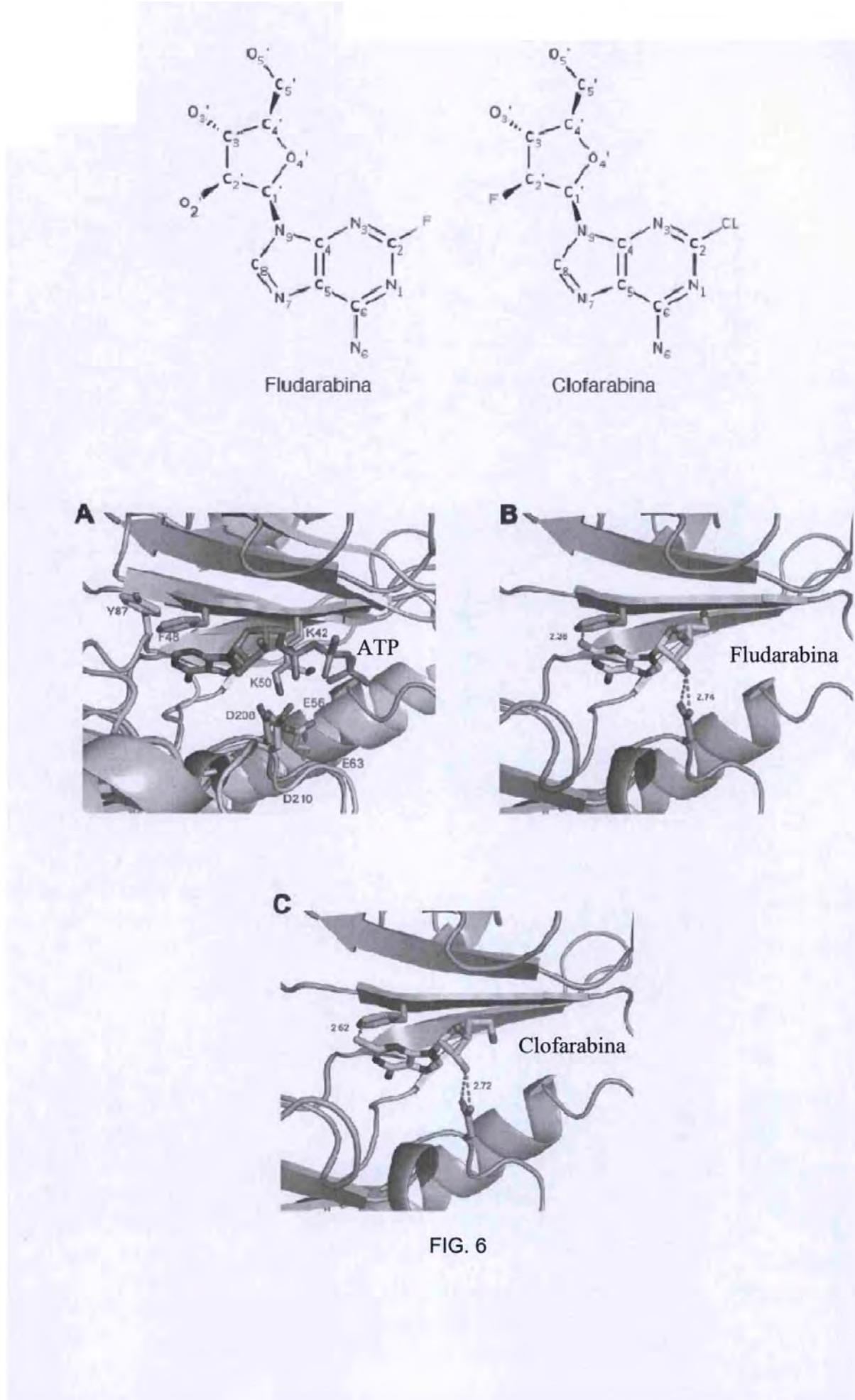


FIG. 6

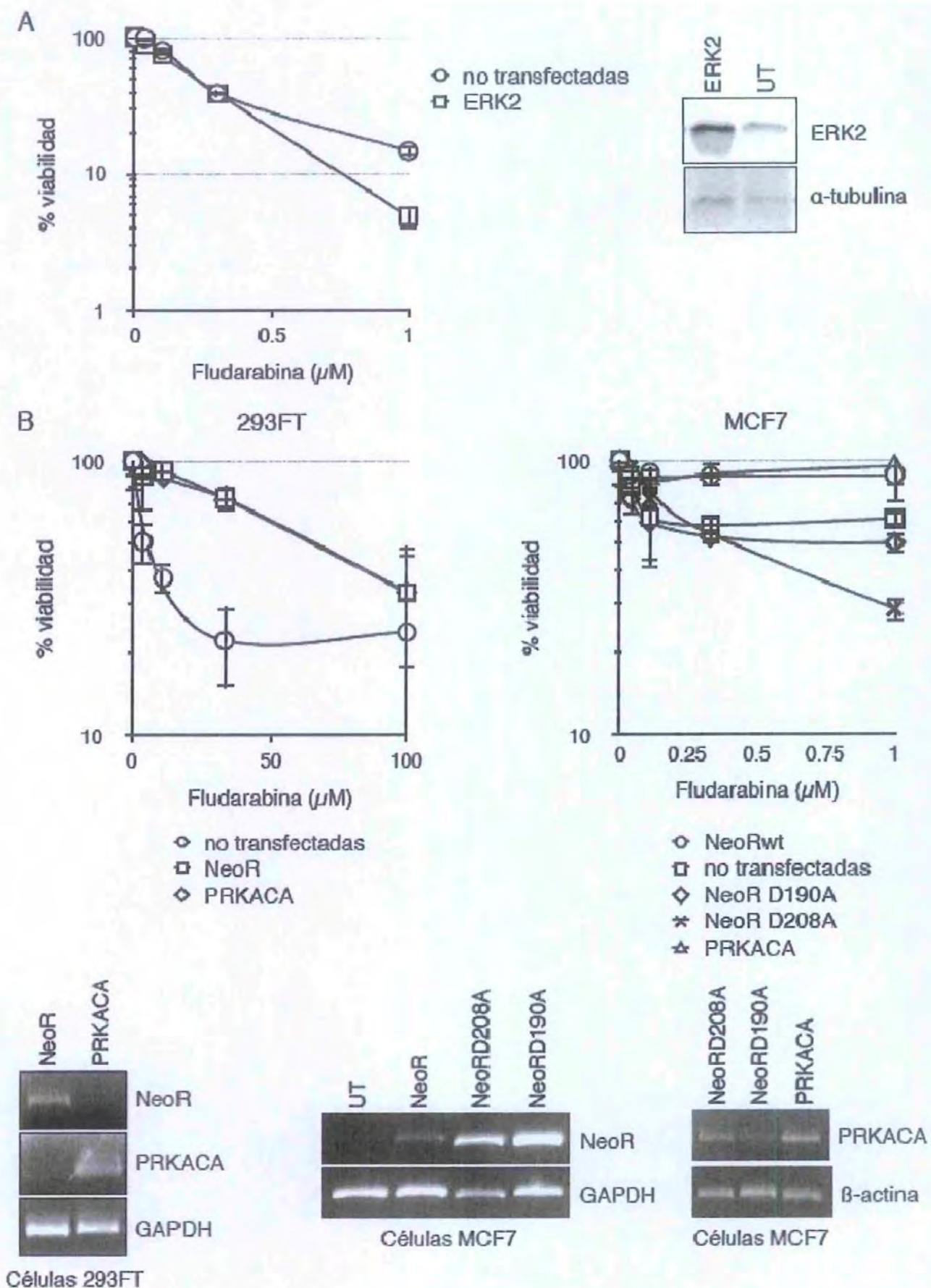


FIG. 7

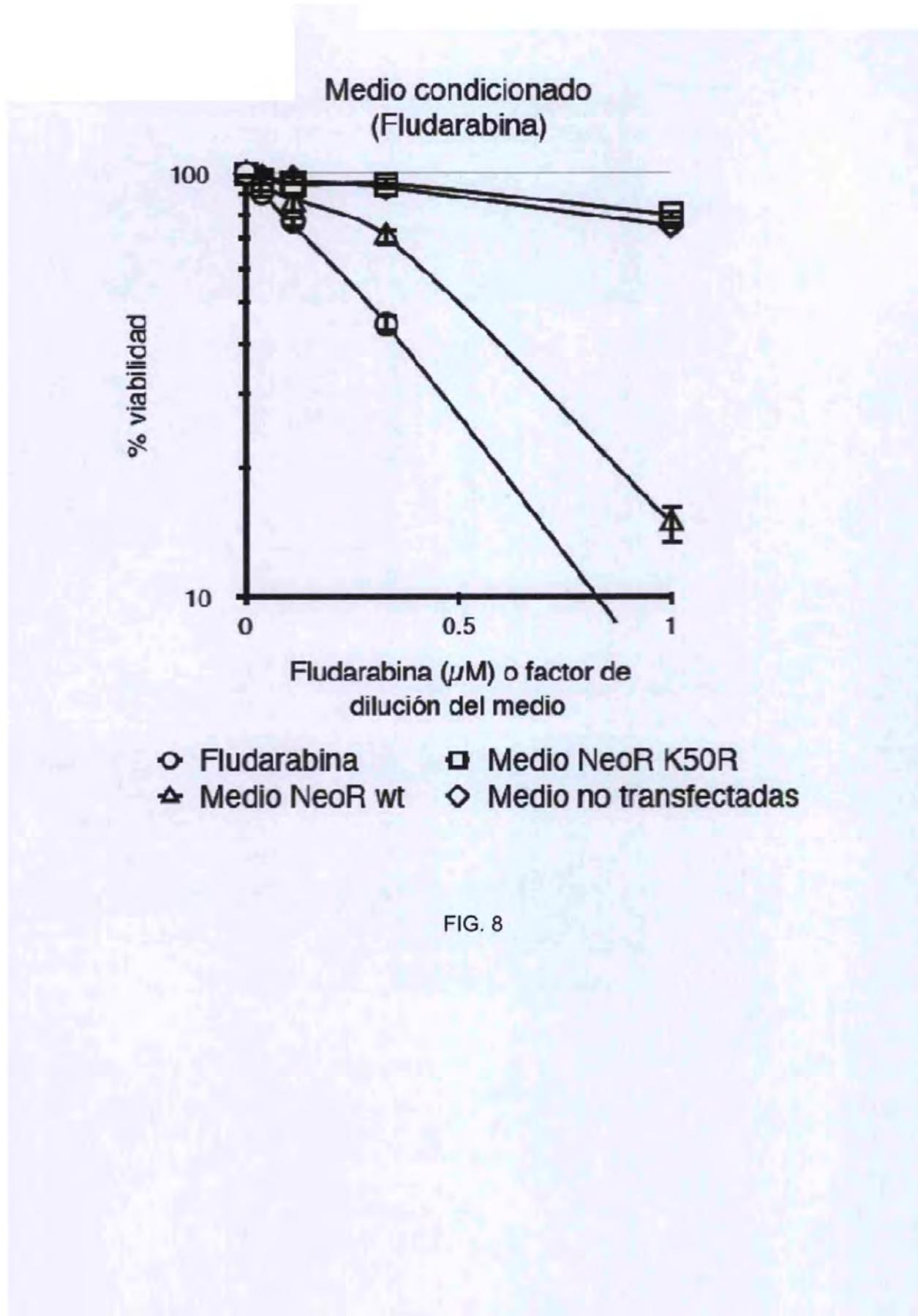


FIG. 8

ES 2 674 176 A1

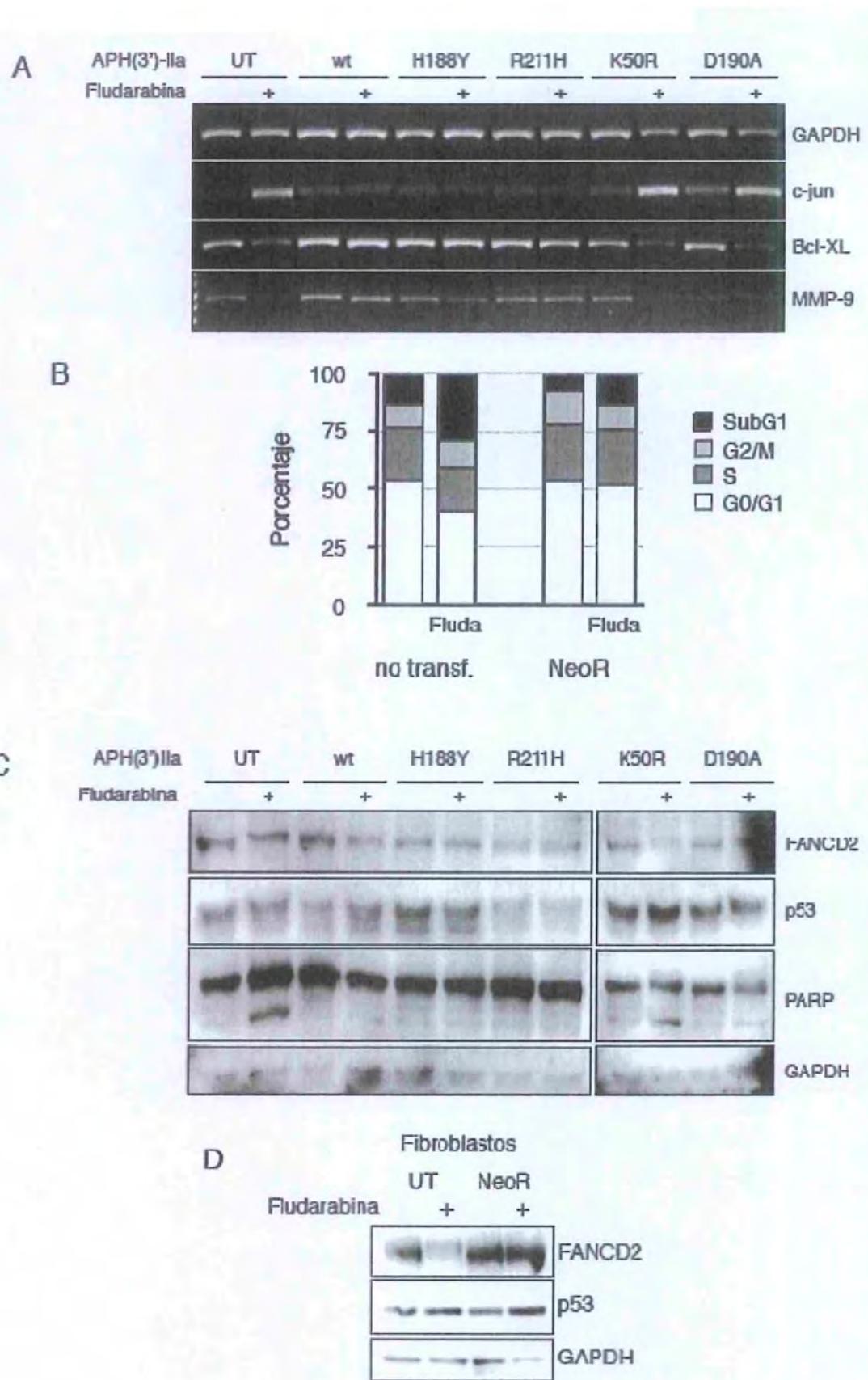
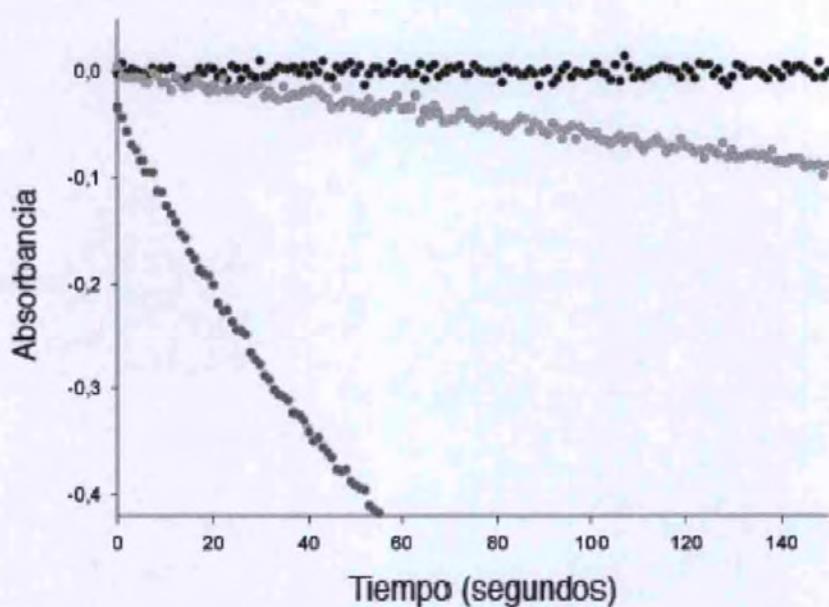


FIG. 9

A



B

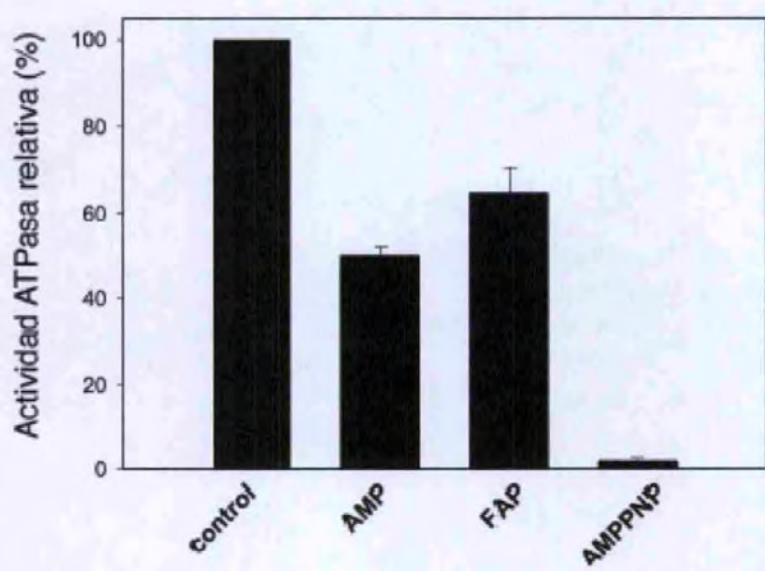
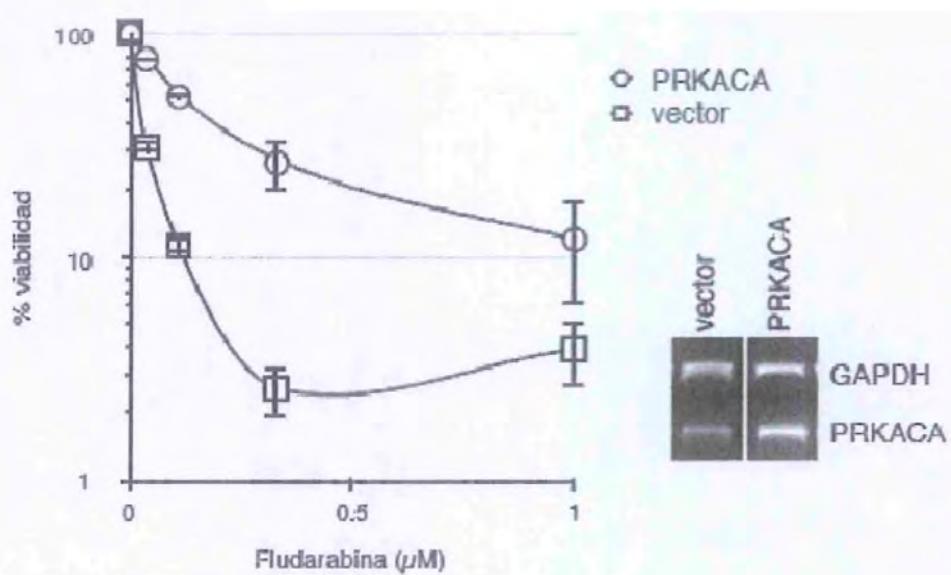


FIG. 10

A



B

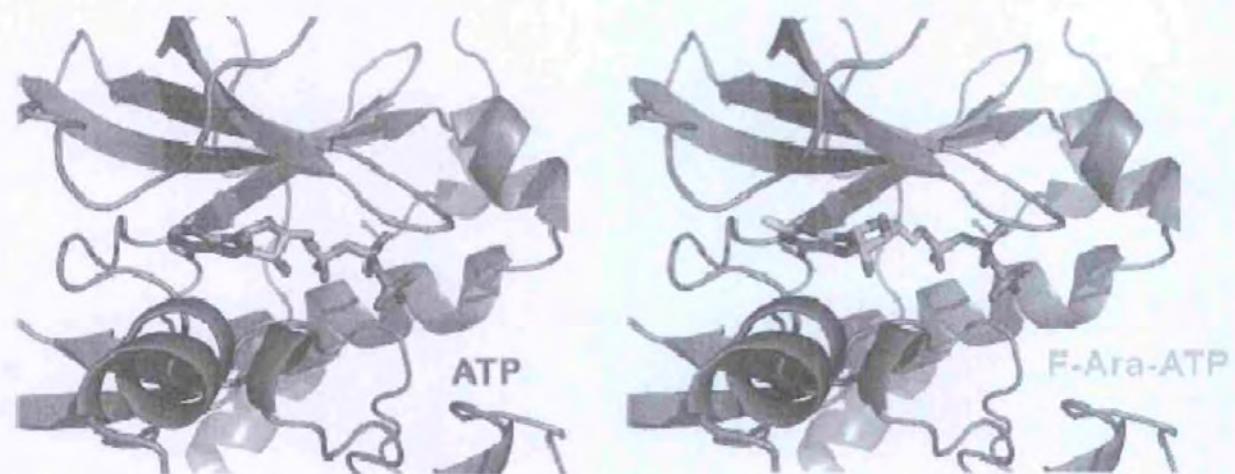


FIG. 11

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> FUNDACION INSTITUTO DE INVESTIGACION MARQUES DE VALDECILLA  
SERVICIO CÁNTABRO DE SALUD

<120> Uso del gen PRKACA para predecir la respuesta de un sujeto al  
tratamiento con un análogo de purina

<130> ES1633.13

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 33060

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1		
agagtaccac gcacacctcc ctgccacagt caacgtttt tagtcatttg tgggatttat	60	
tctgtgtttc catcagttga caactcctgg ctgggcacag tgactcacac ctgtaatccc	120	
agccctttgg gaggctgagg tgagaggatc gcttgagccc aggagttga gaccagcctg	180	
ggcaacatgg agaaaccctg tctctacaaa aaataattgg ctagacatgt tggcacacac	240	
cgttgtccca gctatttggg aggctgaagc aggaggattt cttgagccca ggagttcaag	300	
gatgcagtga gccatgatgg cgccattgca ctccagcctg ggttaacagag ggaggccaga	360	
ccctgtgtaa aaaaaaaaaa agtccaggcg caatggctca cacctgtata cccaacactt	420	
tgggaggccg aggtgggcag atcacctgaa gtcaggagtt taagaccagc ctggccaaca	480	
tggtgaaatc ccgtctgtac taaaaataca aaaaaaaggc tgggcgcagt ggctcacacc	540	
tgtatccccca acactttagg agtccaagac gggtgatca cctgaggtca ggagttcgag	600	
accagcctgg ccaacatggc gaaacccat ctctactaaa aataaaaaaa ttagccgggc	660	
atgggtgtgg gcacctgtaa tccagctac tcgggaggct gaggcaggag aatcgcttga	720	
acccgtgagg cggaggttgc agtgagccga gatcgacca ttgcacttca gcctggcaa	780	
cagagcaaaa ctccattaaa aaaaaatacc aaaaaaaaaa aaaagtttagc cgggtgtgg	840	
ggtgtgtgcc ttagtccccca gctgcctggg atgctgaggc agaattgttt gaacccgaga	900	
ggcagaagta aaaaaaagaa aactgagggc agagagcata cttttgctc agtaataca	960	
tgtatgttgg gaatctttgt actaatgaca tcgaggcatg gctgtggcac tgctaaggcc	1020	
taggatgtgt ctccccctagg ccgacgcccc caacccatcc ctcatcccag agactgatgc	1080	
cgtgggtgtg actgtggtcc tcatcacctg cacctaccat ggacaggagt tcatccgagt	1140	
gggctactac gtcaacaacg agtacctcaa ccctgagctg cgtgagaacc cgcccatgaa	1200	
gccagatttc tcccaggtgg ggcctgtttc cacttcctgc ttccccacaag ggcgttcttt	1260	
atacttgggg ggagttcagc cattcaaatt gagagtcaag gtcacttctt aaggtttca	1320	
agtaatattc agttcttaca gtactgtgtt agaagaggag aaaaagacct ttgtctctca	1380	
aaggcatgtc ttagagaatt aagattaggc cagcctggc aacatagtga gaccctgtcc	1440	

## ES 2 674 176 A1

ctaacccccc	caaaaaaaaaaaaaaaa	aatgagccag	acatgggtgg	tgtgctctac	1500
tctggaggct	gaggtgggag	gatcgcttga	gccaggagt	ttgaggctgc	1560
gatcggtcca	ctgcattcca	gcctgaccaa	cagagtgaga	ctgtccctta	1620
gtcctgggcc	aggcacagtg	gctcacgcgt	tgtaatccca	gcactttggg	1680
tgttaggatca	cctgaggtca	ggagttttag	accagcctgg	ccaacatggt	1740
ctctactaaa	aatacgaaaa	tgagccaggt	atggtgcctt	gcacctgttag	1800
acaggaggct	gaggcaagag	aatcgcttga	acccggaagg	cagaggttgc	1860
gatcacagca	ttgcaactcca	gcctggcaa	caaaagcaaa	actccgtctc	1920
taaataaata	aataaataaag	gtcctggcca	caggtgtttt	ctggagttcc	1980
tgctcttgct	gggcttgaga	tgggtgattt	gggggtgcct	ggctctatgg	2040
agggcgtacc	tacaagggtt	gacgttcctc	ttcctgcccc	agctccagcg	2100
gcctcgaacc	cccggtgac	ccgcttccat	atcaactggg	acaacaacat	2160
gaggccatag	agaccaggaa	ccctccctg	ggctgccc	tcccactcaa	2220
atcaagggct	tggggctccc	tggctgcattc	cctggcttcc	tccctgagaa	2280
tgcatctaac	tgcaggaacc	cagagtgtcc	cagcacgccc	ggaggggcaa	2340
cagcgagtcc	tgcagggccc	atctagagga	ctttggggc	catcagctgc	2400
tgtcaaactc	agcccctagg	aaagaacagg	ctttgggtct	cccctagtcc	2460
gatgatctcg	ctttcctct	acaggcctat	aagaagcagg	tacttcagtt	2520
acttgtttc	tttcgtctt	cataaattct	aactaaggcc	actgtgccac	2580
ttagtaccat	tgatccaaag	ctttcccaca	gaccccttg	gcccacctag	2640
ggtcagtgcc	tgtcaaggct	ccagtcctgc	tgagccaaag	gctttgtcat	2700
tcctgtacat	ctgagcagac	ccactccagc	tttctgggt	cacaggcggg	2760
agtaggtaga	cttagatccc	atttctgtcc	tgctcccagg	aagattctta	2820
aatccagcag	cccctccag	aggtgtgatc	agcaggatgc	ttaggaacca	2880
cctgtcaatc	acagccacct	tcctgttac	tcctaaatgg	atctggcttt	2940
tgccatggtt	ggaagatgg	atcagagggc	ctgcctggc	agtctgtctc	3000
tcagggaccc	tctgcctctg	gcagccttaa	cctgtcctct	gctaggacca	3060
aagccaggga	agcaactggg	accctgaaaa	ctgtccctcc	ccagcccgct	3120
gtgcccctgg	cccttgctg	ccatgtggat	gctgttgta	ttgctgtttt	3180
aatgttttt	atattaaaa	tgttgttct	gaaaattaaa	agcacttcat	3240
tgtttgtct	tttgtctctg	gtggactgaa	gcaactttgt	ccactctccc	3300
cctcttgccc	tgtccagtgg	gttggctgtc	ccacgtcttc	tttccagctt	3360
tcttaattgg	ttctacagtt	gtattccaga	ctgaggttcc	aggaggggtt	3420
aaaacttaaa	ccagctgtcc	tgcagataga	ttataatgag	tgattttca	3480

ttgacccaca ggaaatcaa atcgtatcc caacacacaa acagcaatgc ttttattaaa	3540
ttttactaaa ccttaccatg tatctatcca tccagaggcg gagtggtcag ccattcccc	3600
atagttcaca gaaaggctct gactctccct ccctggaaact gtggttgatc tgggaacatg	3660
ggggcagaca gcagctggag aaggtaggg ctattcaagt cgaagcagca gatcggcttg	3720
tagttaagcc cagctagccc ttccgagtcg gggtagctg gcttctcccc tcccctgacc	3780
ctctcttaag tgcttctcaa tcaggagcag ttcggccccc caagagcaca ttcaccaatg	3840
tcaggagaca gcgggtgccca cagccagcag gaagatagag gaggggctac tggcatccag	3900
tggtagagg cggggatgt tgctcaacac ccagtggtc acaagacacc ccccagcaga	3960
aatgatcca gcctcaccgt cagtagtgtc gcagttggaa aacccgact gtcctctgct	4020
aagtgtgtac tgaaagagga tcctgaagga aggggcaggt tcccttcgca ttgcccagac	4080
aggaaataca gacggggAAC aggagcaggg aatctgcctg gctgtacccc agattcctca	4140
tctgtgcaat gggagtgtatg atggtagcac ctacgcgtg ggagtgtgggt gcgaaggagc	4200
gttaagtggg tgccagctct tactactggc aggagccag ggctagggcc cagcaaagg	4260
gtggacactg agcggccctt cccagccacc cttgcgcgg gccccggcat cctcctgagt	4320
gcggctggaa aaacccagga ggccccgcgg cctggccccc aagcaggcct ggcctcggcc	4380
gcccagcgcc aggccttatg aatgacgcgc gcccggccg ggcgacctct gacccgcgc	4440
ccggccgcgc ccctcccccg ctggcaggtg gacagcggct gcgcggggca ggcgcggcg	4500
ccaactccgg ctggccgaca gccgctgcgg cactgagcgg gggcggggga ctgcggcg	4560
cgcggggccg gcccggcgcc cgccggggcc gcctcctgag cctcggagcg ctgcgcggcc	4620
gccagccagc ctccgcgc ccgccccgccc ggcccggggcc cgcaactgcgtc gtctccgc	4680
cgcctctca cccccggatt gacactgagc gttctgtgg ggggcttggc ggacccggca	4740
cctccgccaa tcggcggct cgcaaggccg accccgggccc cagtccagcg tctcggccaa	4800
tcggacgcgt ctgcccgc agctgcggcc tcgcgagcga gtgaatggcc gagagtccgc	4860
ggtgtgtgtc ccgaggctga gagctatag tggcgcgggaa aggtcgccgg agggccaatg	4920
ggaggcggcg ctgagccgtc agtcaggcg gcctaggcca atgagcggcg ggctgcgggg	4980
gcgtcacaga cagcggcaga gatcttggc tgaggttccc gggcgggccc gcgcggagag	5040
acgcgggaag caggggctgg gcgggggtcg cggcgccca gctagcgcag ccagcccgag	5100
ggccgcgcgc gcccggcccc agcgcgtcc gggccggccg gccgcagcca gcacccggcc	5160
cgccgcagct ccgggaccgg ccccgccgc cgccgcgcg atggcaacg ccgcgcgc	5220
caagaaggc agcgagcagg agagcggta gtgcccggc tgtgaccccg atcttggccc	5280
tgcgtgcca gccctggct tgcgttcatcg cgcgtggccc ctccccctac ggggcccctc	5340
atcctctctg cttacccccc agcggccctt gccccggcct gtccaaaggct ggggcccgc	5400
ggccgcaga gtacccctg taggggtccc cttccctag gggccggccca tgctgaaag	5460
accgtgctcc ccccccagctg tcactgccaa ccatggcacg tatgaccgct ggggccccac	5520

## ES 2 674 176 A1

atggggccct gtcaccagcc tacccccc tttcctggcc cctcttccca gattctaattc	5580
cccccaacttc ctcactcacc tctctcacct atgggatcct ctgcctgacc ccgacccagg	5640
tttctaccag tttggaaatg cgatgaggc tgcgtgcctc caccgcgcag ggaccttggc	5700
cacttgctga ccacacccct ccccccctcca gcccccgcca tctttctcct gcccttccc	5760
tcttcacctt agcacagccc ccccttccaa acccatcctg cccctgaac atttcccaga	5820
gccacctcca gcattatttt tttcttctgt gtcacttggc atgggggaca ggatcttct	5880
gggtccctct gcctctctca tcctgtcact ctgtcattct gctgctctgc ttgtgctccg	5940
tcctccaagc aagcgtctgt ccctggctgg gtagcagac tgtttatgaa ctagagaat	6000
tgcttcagtg cttccaaagc caagttttag gttgtcttgc tggtattcat tgcatcctct	6060
ttcctgcgtt gggtaaggg ggtggtggca gagccccctc tcatttcctg tcttgcagtg	6120
agctctaggc tccatggagg gcccctcaat aaatggtcgt ttacacaactg aggctccgtc	6180
attcacccag tccctggggc ttcttccacc actcctggct tggatgaaa agtgcgtggg	6240
tttagcgagg ttcattcggt tctaactgag atggtcagaa agagcactgg ggaggaggag	6300
gcagtcaaag agagtaatgg gtgacgtcta gtgatttgc ttgacgtcta gtgattctga	6360
tcattccag ggctcagcca gagagagacc tgtttccacc actgtccac acattaggtt	6420
ggtctttcc agccagccag agaaagagat tctctatctg gaaataccat cagaaatgg	6480
cttgaacccc attcccaatt ttacagctc taaaattgtt gtcactccag tctgaaagct	6540
ggaaggcagc tggatcccc tgtccactta cccagaaata gtcggacta ttggtcgaaa	6600
aggaaggcca gttttggc tcaaacccc gcatctgagt ttccctgaatg cccctccca	6660
gaaaggtatg aaagccaggg aactttattc ccatacggat tcaaatacgca gaactcagag	6720
tcacagagcg atcatgaaga ggcctgacat gtcaccaatg ggtggggct ggggagggaa	6780
atgcctgttag ctgagtgcc tgcgtgcct gatgacagag gagcagggtgg gtatgttcca	6840
gggcattgagc ttggagggg cttggccggg gggggaggag tcaggcccc agcagggtgag	6900
gccagctggg aggtggaagg tagaggcagg cagctatata ttgcggtagc tcagttgaaa	6960
gttggggaga tgacagtcc gaaaaaccc caaggctatc agacacatgt ggtgggggt	7020
ggaaagccac acaagaaaaa ggatcccag aaaaagatca gaggctctgg aaggaaccac	7080
tgattctctc agagcacagg tcagacaccc aggaatgaat gatcatggta aaatagagct	7140
actatttattt gggcatctag gctgtgccac aggctaaatg gccaggcgga tagagatacc	7200
tactctggtg actttataa cgggctgtta tccaaatttt ccaaaggagc cctctggtag	7260
aaatgacatc catgacatag atgatgtcac agaggcagga ttcacatcca gatccatcta	7320
ccagcaaact tcttggaccc cagaattccc cgactttgac attttcagc agcctcccg	7380
atttttactc tatcatattt tcttaattta aaataataaa agttttactc acttgtgttc	7440
agatgtaaac ttggagctca ttctaaacaa taatataaaat gaaatcatgg gattgccatg	7500
ccagttatat tttctctgtat acgcattaaa tacagtgtaa ctagataaat gaaacatccc	7560

gaaaatcatg tcatgttctg ccaatggac tatgtcacac gttgagaaac gcccgaagct	7620
gtacttcctc ccagaggctc ccagagaagg aaataagatg aggaaggaag tccctctttg	7680
ctttgaggcg ctctgattct gagaggatgg agtagacaa aatttgcctt cttagaaggg	7740
tggggcaggg gcagggcag tagccaggcc agcctgcagg gggcacctgg atttcatctg	7800
ccagacgccc gcccactgg ggtcaggaaa atgcccaggc cttgggaggc accagttaa	7860
catcctgcag tcccctgtgg taccatctct gtgccaggc aggacagagt ccgcctcctc	7920
ccaagaggcc agggatccag aatgaaccct ggagtggagt tggggaaatc tacacccaaa	7980
gatggcaaag ccattggag agctgagagg gccaagaaaa aagactaagg cccaggctct	8040
ggccaagttg gaagaatgga gagggagcag cggccccagg gggcaggcgc ccaggtcaga	8100
cagccaagtg gggctcaggt cgtggctggc actggctgaa gataccctg ggagctggcc	8160
cacagggaa gggcagagc tagtaaaagg gagccccga tccccaggac acaagcagat	8220
cctggcaaag agagaaaagc accccccaag aagaccctag atgggaagaa ctagtgcgt	8280
gtaacatcct atggatgcct aagacggcca aacaccttct gtgccttggc agtttatgg	8340
gtgccaaga ggtcttatca aggagctct ccccttagcg caaccgcgtc tacagaaact	8400
cggagggccc tatctgtccc tcctccacac ccagtggcct ctgggttggg tttctttcc	8460
tgctcccacc ccacggctcc ctagctcccc ctgcaggcag gttctgggg acagacagcc	8520
gaacagacac ggcaggtctc atgagccttc ccagccaccg tagtgcgggt gccctgagaa	8580
caggactgag ttagggcttc caactccagc gatggtgagg ctgagtcctg ttactatagc	8640
aacttcctag gcacactctg ccccttaagt cagggagggg ctgcagcggg gtctgggca	8700
caggcgaaga gaagaaggat gtgaaccct ggctggccct gaaaacgcct cctgtacagc	8760
cccgccgtgt gcggcctggg gaagagagag gggatcggtg gcccagttca gacaagggag	8820
gatggtccac ccggcagggg gccagctcag agaggggtgg tggagtggc catccagtg	8880
ttgggttca gtcagactg taggatgagc catcccagtg ttgggttcca gtcagaatg	8940
ggggtcgttc cagccagtgt tgggtccag ctcagagttg tgtcatttag gtaagccag	9000
agcagggaat ccaggctcca ctggaggaat cagccagcct cgagtagggg gcccagccca	9060
ggctggcat tcctgccccca gaattccag gacagccaga tttcaaaagg gcagaaggc	9120
tgagatttgtt gtccggagga aggggttct gtggctggc tcctccgag agagacccca	9180
agcccttgc ccaaattgtat attctgctgt tgcaattccc cattcccagg gcgagttct	9240
agatttctgc tttctgctgt ggtcctggct tttcaagggg tgtcaaggag tttccctat	9300
gaacccaaat ggaatctgga ccagagttag agctggcacc ccccgtgtgg gagatgtggg	9360
cagggcggca ggctgtacag gccagcagct ggctgggta ccatcctctg ccacttcctg	9420
ttgcttagcag gggccttggc tgccggcac actcaaagag gctgccactg accctctgt	9480
tcttttggc tctggaaaga aggaggaaga tggtaaggc tgccctcccc tccccaccc	9540
ctgggtttag ccgctcggtt ccgggttggc ctttcatggc cgagagttaga gccaagcaca	9600

## ES 2 674 176 A1

gggcaagggtt tgagagaggc caaggacatc ccgggatgcc tttccccctct ccaccccccgc	9660
ataggagcaa aacaaaagag tcagatatac ccattttctc tctcaggata gcaggatttg	9720
ggggttccac attgaaaggg agttcagggg aggaggcagg gtggctcttgc tcgccccccg	9780
ccccaaagcct ttctctccag ctgttcttgc agcgaattaa gggagctctg gggcctcttgc	9840
agccccctaag gagtctctgg ctgttgcctg atcctgaacc ttaactctt cccctctgccc	9900
cagtggcac tgctctggc acatcaggcg ctgtcctctg cacagtccag tgcccactga	9960
ggaaggcagg gcctggcgtc ctgggagcag tgaagtccgt ggaaaggaa gttagttta	10020
tcgccccgccc ctggggcacg caggccagcc agagggacac cctcgggaga atcttccat	10080
tgcctcctgc caagggagcc ctctgcaaac cttggcttagc ttggagcagg tacctttaaa	10140
agcttctgtg gcaaccagct cctcctccct ggtccccctga ggccatccca aggaagctga	10200
cttagaggct ctgcgttttc ctggttctc agcaaaagga agattccagg gagagccaa	10260
gggggctggg gatggatctg ggatcaggca gcagccaggg tggggacttg gagaccacct	10320
tccagctgtg gctgcagctg ctcctctggg cccacctggc tgtacgtttc ctggctacc	10380
tgcaccgcac cttccggggg cctaagccac agccagcacc ctgagcctcc ctggccaggg	10440
ggcagaaggc cgccagatca ccccatccca cccacccctt attctaccct ttcctggaag	10500
agacaggaag cagaggtgag tgtgggcct cttgatttagt gttacctgccc cttccccccc	10560
atcatccctc tctctgcctg ctcctctgg cactggcctc ccccatgccc catccccaaa	10620
tctgacaagc taacagggtc agtggcacca gaggggacag agcctggcg ctctggcct	10680
ttgagaggcc agagaagggc catgctaaca gcaaggcacc ctgtggagcag actctgtgg	10740
gcaccagcgg acagccaggg gctggagct cagcgagtctg gggaggtgca ggattcagca	10800
attcttcctt ttttctaag agcaaaggaa aaacggacca gacctttgg attcccttca	10860
agcctggcac ctctctgcct tcttgtgtgg gtgaaggtag aatcccaaga gggcaccctc	10920
caccctcccc acccactgct gaattctgtg tggattattt ggaggttcc aaggaagatg	10980
ttttctgtca caaagggtct atgactgaag ccaggcacag tggctcatgc ccgtaatccc	11040
agcactttgg gagactaagg tggggaaatc cattgaggcc agaagttgga gaccagcctg	11100
ggcaacatag caagacccca tctcaaaaca aaataaaaca ctcaaacaaa ggttctgcta	11160
gtgaaagtgt tggattttgt gtgaccccca ggctcaggcc cctggcttag ttggtgccccc	11220
agccaggcac ccatcttagga ctcctggcca ttcattgcct atccctctc cgcctggtca	11280
tttattgtgg ggccttcttgc gccacggct ctctccatct gccatctacc actttttttt	11340
ttttttttt gagacagagt ttcaactcttgc ttgtccaggc tggagtgc aa tggcgcgatc	11400
tgagccact gcaacctctg cttccgggt tcaagcaatt ctccctgcctc agcctcctga	11460
gtagctgggaa ttacaggcat gtgccaccac gcccagctaa ttttgtattt ttagtagaga	11520
cagggtttctt ccatgttggt caggctggtc tcaaactccc aacctcaggt gatctgcctg	11580
tctcagcctc ccaaagtgtt gggattacag gcgtgagcca ctgcacccag ccaccatcta	11640

## ES 2 674 176 A1

ccactttcta gctccatgag ggctttctc tctgaatgct gagggaaagc tctggagaca	11700
ggtagtgggg gtggctcccc acaaggccat gtgggattac tggcaggcag ataaccagca	11760
atgc当地 gcaagtgtac agggcccctc ggtggcagca aacccaggaa catcaggggg	11820
ttgaaggcag ctctgtccac attggccacc ctggtgact ggactcagca ctgaaaccaa	11880
tggctgagtt ggcagtgaag tagttaatct catggatgt gggggcaggc aagtgaccc	11940
agacctgatc agtcttctcc tctgtacagt gggaaaaca gcagctccca ccccacaggg	12000
tgagaacgaa gcatagaaaa tactcagcaa ggggctggc cttttagcc ctaggtgg	12060
gttaaaaagga caagtccata atgcaagaat ctgtcaggct gcgcattaa gattttagca	12120
ctcagtgtat ctcctatatt tgttttggg gtttttttat tattactttt ttttttgaga	12180
cagggcctca ctctgtcacc cagcctgcag tgtaatggct cagtcacggc tcactgcagg	12240
ctctatgtcc cgggcttgaa caatcctccc acctctgcct cctgagtagc tgggactaca	12300
ggtcataacc accacacccg gctaattttt ttatttttt tagagggttt tgatgtgtc	12360
caggctggc tcgaattcct gtattcaagc aatccccca actcggcctc ccagagtatt	12420
attatttttt tgagaaagag tctcactt gctcaggctg gagttagt gtagtgcatt	12480
agctcactgc aacctcaatc tcctggcctt taagcaatct tcctgcctca gcctcctgct	12540
tagctgaaac tgcgggcatg ggccactatg ctcagctaat ttttaattt ttttattttt	12600
tgttagagatt gggcttgct atgttgc当地 ggctggctc taattccagg cctcaagcga	12660
tcctccaacc tcggccttct aaagcactgg gattacaggc atgagccacc gttccggct	12720
ctccctatgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtat atatatataat atatatataat atatatata	12780
atttttttt ttttttttt tttttttttt gagacagagt ctcactctgt cgccctaggct	12840
ggagtgcagt ggc当地tct cagctcactg taacctctgc ctcccaagtt caagagattt	12900
tcctgccccca gcctccaaa tagctggat tacaggcatg cgccaccgtg cccagctaat	12960
ttttgtatTT ttagtagaga cggggtttca ccatgttgc caggctggtt tcaaactcct	13020
gacctcaagt gatctgcctg cctcggcctc ccaaagtgc gggattatag acgtgagcca	13080
ccatgcccga tcgctccccca tattttctt tctttttct ttttttttcc ttagacgagt	13140
cttgctctgt cacccaggct ggagtgcagt ggtcaatct cggctcactg caacctcagt	13200
ctcccgatt caagcaattc tcctgcctca gcctcccagg tagctaggat tacaggcaca	13260
catcaccacc acgcctggct aattttttt ttttggggat gagacagagt ctcgccccgt	13320
cgccctaggct ggagtgc当地 ggc当地tct cagctcactg caacttctgc ctcccggtc	13380
gaagcgattc tcctgccacc atgcccggct gattttttt tttttttttagt agaaacgggg	13440
tttttaccatg ttgaccacgc tggcttgaa tcctgacccctt caagtgcattt accccgccttgc	13500
gcctccaaa gtgctggat tataggtgtg acccaccgtg cctggcctca ttttttttatt	13560
tttagtagag atggggtttcc gccatgttgg ccaggctgg ctcgaactcc tgaccttgc	13620
atccacccac ctggcctcc cagactgctg ggattacaga cgtcagccac ctcacccagc	13680

## ES 2 674 176 A1

ctctctcccc atatttata cctcaattta gaaaataata ggctggcac ggtggctcat	13740
gcctgtaatc ccagcacttt gggaggccaa ggtgggcaga tcacctgagg tcaggagttc	13800
gagaccagcc tagccaacat ggcaaaaccc tgtctctact aaacatacca aaattagctg	13860
ggcgtggtgg caggtgtctg taatcccagc tactcaggag gctgaggcag gagaatcatc	13920
tgaacctggg aggcggaggt tgca tgagc tgaggatgtg ccactgcact ccagcctggg	13980
caacaaagtg ggactccatc tcaaaaaaaaaaa aaataataat aattaaaaaaaaa aataaattgg	14040
ccgggcatgg tggctcacgc ctgtaatccc agcactttgg gaggccgagg cgggtggatc	14100
acgaggtcag gagatcgaga ccacccctggc taacacggtg aaaccccgtc tccactaaaa	14160
aaaatacaaa aaattctctg ggcgtggtgg caggcgtctg tagtcccagc tactcaggag	14220
gctgaggcag gagaatggcg tgagcacggg aggccggagct tgca tgagc tgaggatgcg	14280
ccactgcatt ccagcctggg cgacagaggg agactccgtc tcaatcaatc aatcaatcaa	14340
tca gatagataaa taaaaataa taatagctga catttatctg gcactatcat	14400
cacacggggc cactgttcaa ctccctttgt caagatgaac tcattcattc ctcaaaacca	14460
ccccacttta cagatgagga aaactgaggg ctagagaggt gagatcagtt acccaaagtc	14520
acagagttca tcagagacca ggctggcgc tgaactggat cttgacccca agtccctggcc	14580
cttagccact ttgctggct gtgtctcagc agagacgaga atgactgttt tcaagcctgt	14640
ttcctgggtt gtttaagtggaa gacaatggat acaaggcagg ttgccgagtg agtcagatga	14700
gacagtgttag acagcagccg gcacagggtc tgccgggaa gtttcaacat tagccaggcg	14760
gtgatgttca ctttggata ccatggggcc gaggagtggg catcggcga gacttccctt	14820
gaaccagctc tggagcaatg cccttgcgt tgccacggag aggaacaggg ccagctgggg	14880
gccaaaggta cagctgagcc ccccaagggc acctgctacc cgagccccc aggcctccat	14940
cccaggcccg gcctccccag agaaggggcc agaggaacag ccaaatccca aggctataaa	15000
tacctcggtt ggcgtcgcc ctggccatgg aatgtcggtc agaactgggg cgagtgggg	15060
tgggctggtc tgcctggca cttccctccg ttcccctgcg agtgcacccct gagactctct	15120
gtacccact ttggatggag tggcagctgg atcccacctc tctgttagcaa gggaggccca	15180
ggccacggcc cagccaaggc cccagaggca ccagaaaaag gtcaggctct gggttggAAC	15240
tgcacccac tttccaccaa gtatctcccc agaaatcacc tgaacccacc ccggtgagac	15300
gggcgtctct gtataactct cccctctctc ctttcagtg aaagaattct tagccaaagc	15360
caaagaagat tttctaaaaa aatgggaaag tcccgtcag gtaaggctgc cgggtgcaga	15420
gcccaaggag gggtgagctg ctaaccccca gcccctggct gtgtcccagc aacacagcta	15480
gaatttcaga aaccccatag aaggcttcag accctccccca tttgctccct aggtgcccatt	15540
gggggctccct gtgtggagac acctgactgc ccaatgccag gcaccccat cccaccaccc	15600
ctcccaacgg cccgccccctg ccccccagcac agctgccagc agcttccagg ccccaggcca	15660
gggcccggatc tggccctgc caccgcctt aaggaatgtg ccctctgcca tcttgatttt	15720

## ES 2 674 176 A1

ccgccccctg tcctcacccc gctgacccca cgtgctcccc gggggccccc ctgccggtgg	15780
cagaggggat gccccagacc ttagccaagc aggccgcggg gagggcgtgc cctgagccta	15840
ccgaccacctc tgcccacaga acacagccca cttggatcag tttgaacgaa tcaagaccct	15900
cggcacgggc tccttcgggc gggtgatgct ggtgaaacac aaggagaccg ggaaccacta	15960
tgcctcatgaag atcctcgaca aacagaaggt gaggtggcct gtcctcgctc agggcctgcc	16020
tgtcaggcct ttgcctggac tgtgccact ccttagagtg ccctatccac cggttcactc	16080
acttgctttt ttttGattca gagtctcgct ctgtcgtca ggctggagta cagtggcgtg	16140
atctcggttc actgcaacct ccacccctt agttcaagcg attctcctgc ctcagccctcc	16200
cgagtagctg ggattacagg cgccctgccac cacacccagc taatTTTGT atTTTtagta	16260
gagatgggtt ttgcctatgt tggccaggat ggTTTcgaat tcctgacctc aggtgataca	16320
cctgcctcag cctcccaaag tgctggatt acaggcgtga gccaccgcgc ctggccgctt	16380
ggTTTTTTG tgggggacag gatcctgctc tgTTGCCAA gcaggaaagt gcagtgacgt	16440
gatcatagct cactgttagcc tcaaactcct gagctcaaga gatcctcctg agtagctggg	16500
actacaagcg cacactacca tgccctggcta atTTTTTTG ttgtttgtt tgTTTTGT	16560
tttagacagg gggtcttgct gtgttgccta ggctggctt gaactcctgg cctcaagtga	16620
tctcctactt cagcctccca aagcacaggg attacaggca tgagccacca tgccaggctc	16680
acccactatt ccccgagccc ccataatgtg ccagccccag gggtcagaag ggccctgtgc	16740
cgcctccca aagctccctc tccaggccgg ccatggattc aaagccaggc actgtgacac	16800
agggtcagac accagccaa caggaggaga acaagagcac tcttggggga agtggtgttt	16860
atgtgcactt tcttcccgta aatTTTTG tgatcgact ttataccagg cactgtata	16920
aagcagcaat gtaactagca gaaatgtaac ctgagccaca gaagcaattt taaATTTCT	16980
gtttgctcca tcataaacag taaaacagc caagcacggt ggcgcacgccc tgttagccca	17040
gctactagac aggctgaggt gggaggatca cttgaaccca ggagttcaac tccagccctg	17100
acaacacagc cagacccat ctctaaaaaa acacccaaag ttgttaatta aaagagaaaa	17160
tgaaagaaac aggtgtcatt catgaaattc atTTTAatga catgtttggg gctTTTTTT	17220
atgtTTTTTTT tttttgaga cagagtctca ctcttgcgc ccaggctgga ctgcagtggc	17280
gtgatctcag ctcactgcaa cctccacctc ccaggttcaa gtgattctcc tgcctcagct	17340
tcccaagtag ctgggattat gggtgccacc accacgccc gctaactttt gtatTTTtag	17400
tagacttggg gtttaccat gttggtcagg ttggtctcga actcctgacc tcaggttaatc	17460
cgcggccctc agccttccaa agtgcgtggaa ttacagatgt gagccaccac acctggccta	17520
atgatatgtt ttaattaagc cagtatatct acagtattac cctttccata tattatcaat	17580
gtgaaaatat cattaatgaa acatTTTACA ttccTTTGT tttttccca gtcctccatg	17640
acttcggaaa tatttcctt ttttctgtac tgaagtatct taaaatcca gtgtctattg	17700
tatgcttaca acagttctca actctgtatgg taaATTTTC ctggaaagat aagaaaaagc	17760

## ES 2 674 176 A1

agggaaagttg	aaaaagcaga	ttcacatgcc	caagttgttc	caaccatgcc	tgaaagtac	17820
cagtacctgc	atcaagagtt	taatttttgt	tttgttttgt	tttgttttgt	tttgagatg	17880
gagtttcgct	cttggccc	aggctggagt	gcaatggcat	gatctcagct	cactacaacc	17940
tctgcctccg	ggttcaagc	gattcttgt	ctccagcctc	ctgagtagct	ggaattacag	18000
gcgcggcta	ccacgcccag	ctaattttt	aattttttt	ttttttttt	ttgagatgga	18060
gtctcgctct	gtcgctcagg	ctggagtgca	gtggcacgat	cttggctcac	tgcaacctct	18120
gcctccggg	ttcacgccccat	tcttctgcct	cagcctcctg	agtagctggg	actacaggcg	18180
cccaccacca	cgcctggcta	atttttgt	tttttagtag	agatggggtt	tcaccgtt	18240
agccaggatg	gtctccatct	cctgaccttg	taatccaccg	gcctcggcct	cccaaagtgc	18300
tgggattaca	ggcgtgagcc	accacacctg	gccagttttt	aaatattttt	agtagagaca	18360
gggttcacc	atttggcct	ggctgggtgt	tgtttttttt	ttttttttt	tgagacggag	18420
tctcgctctg	ccacccaggc	tggactgcag	tggtgtgatc	tcagctcact	gccagctcca	18480
cctccgggt	tcatgccatt	ctcctgcctc	agcctcccga	gtacagggga	ctacaggcgc	18540
ccgcccaccac	acccggctaa	ttttttgt	tttttagaga	gacggggttt	caccatgtta	18600
gccaggatgg	tctcgatctc	ctgacctcg	gatccacctg	cctcggcctc	tcaaagtgt	18660
gggattacag	gcgtgagcca	ccgtacccgg	cctgggtgtt	ttgtttttga	gacagggtct	18720
tgctctgtt	cccaggctga	agtgcagttg	ggctcaaatg	atcctccac	ctcagcctct	18780
ggagctgctg	ggaccatagt	cgtccatgc	ccagctaatt	gtttttgtt	tccttgggtt	18840
tgtttgtaga	gatggggtct	cgctacattg	cccaggctag	tctcaaactc	ctgggctcaa	18900
gcgatttacc	tgcctgggcc	tcccaaagt	ctgggattac	ggcgtgagc	caccatgccc	18960
agctgggttc	agtttttaa	tttatatttt	agatacttaa	aattttgaa	tttggctccc	19020
catccgacca	gccatatttc	aaggccccag	catccccctg	tggctaatgg	ggactgaact	19080
ggtagggca	ggtatagact	ctgaggacac	agctatgtga	gcaaagcagt	tgacagctga	19140
ctgagggacc	aggctggcca	catttacac	accagcctga	catcagccag	ctgtgtgacc	19200
ttggacaagt	cacccct	ctgtgtctgg	tcttccaaac	tggcgtaactc	ccagcatggg	19260
cctctagggc	ttctatcctg	attcagttag	agactgggtg	ccaggtgcct	gctcatggca	19320
tctgctatta	ggggacagct	gatggcttag	gagctgttag	cctgaggttc	aggttgcgt	19380
gtggagtgtt	ctagacaagg	gtaaggcagg	tcctaaaccc	cccacctctt	gggcttctcc	19440
tgcctgtctt	ttcaatttca	gttcagctgc	cccttcctcc	agaaagcgt	gtctgattcc	19500
cccttccccca	gaccacgcca	ggtactttac	atgggcttct	tggggctgc	ttctccacaa	19560
ccccaaagata	ccctccacca	cggctctgac	ctctgtgggg	gtaacccatg	tattcttgc	19620
cctggactta	gtgccgtgca	aggacaagca	gcccctagcc	tccctgatgc	tgtgtcctca	19680
gcatcagcta	aggccccgac	aggccacagg	cacacaatg	attctggctg	aaggaaccgg	19740
cctggctccg	gcatccctag	ttccaggcat	tagggaaat	gaggccccctc	tcacccccc	19800

ES 2 674 176 A1

tcctttctg ccctccctc cttccctcc caggtggta aactgaaaca gatcgaacac	19860
accctgaatg aaaagcgcat cctgcaagct gtcaacttc cgttcctcgtaaaactcgag	19920
ttctccitca aggtgggtc ccagtggcca agggcgaaaa gtcactgcat tgggtcccagg	19980
ccttctggcc cccagggctg gggtcggagc tgaggacaat cagtgctgc tctctttgt	20040
ggaagaacaa gatccctgga ggagggagat cagggacag gagtcaggct gggactctgg	20100
tagacccaag ttcatgttcc ggtccagcca gttttagtt cgataccctt ggtgagtcac	20160
ccaacccatcg taacatccct caaaagcagc acctggttt tggtaaagagc ctgacccagg	20220
agcacaaact ctgccccagg cagccgggt tcatttccca gttcagttact tcttgatgtg	20280
tggccccggg caagagactt atctcccaa gcctcagctt tctcatggta aaatggggat	20340
cataccagtt ccagcctggg ggggttgtca tgacagttcc aggacgtct tgagcgcctt	20400
ttgggagccg ttttgggtgc catccaaagc tgtggtcatg agaaacagga aaggccactc	20460
agggccagct tcatggacgt ttgaccaga gaagcacaag ggcctgttct ccgagggacc	20520
ccacacctgg tttaacgctt tgctgtgtct gctgtcttga gatccgtaat aattttttt	20580
tgttgagaca gagtctcact ctgttgctca ggctggagag cagtgccgca atctggctc	20640
actacaacct ctgcctcctg ggttcaagca attctcctgc ctcagcctcc tgagtagcgg	20700
ggattacagg tgcccaccac catgcccagc ttatgtttt attttttagta gagacaggat	20760
tttgccatgt tgctcaggct ggtcttgaac tcctgaccc tcgtatctg cctgccttgg	20820
cctcccaaag tgctggattt acaggcatga gccactgtgc caagcctaatttttattttt	20880
tttattttaga cagagtttgg ctgttgtgc ccaggctgga gtgcaatgtat gcatctcag	20940
ctcaccacaa cctctgactc ctgggttcaa gcaatttttc tgcctcagcc tcccggat	21000
ctgggattac aggcattgtgc catcacatct ggctaaattttt gtattttta gttagagacag	21060
ggtttccccca tgggttcag gctggtcttgc aactcctgac ctcaggtat ctgcctgcct	21120
cgacaccttca aagtgtggg attgcagggttg tgagccgtgc ccggccatttt tgtttgg	21180
tgttaagat aaggctttac cctgttgcgg aggctggagt gcagtgccgc aattacagct	21240
cacaacctttt gctcccccagg ctcaagcaat cctcccacct cagtcctcg agtatgagac	21300
tacaggtgca cggccatgtat cccagctaat ttgttattttt ttgcagagac ggggtctcac	21360
tatgttgcgg aggctggatctt caaactccata ggctcaagtg atccacccac ctggcctcc	21420
caaagtactg ggattataca ggcattggcc accacacccg accctctgtataaatttttt	21480
aaccaggggc catctttttt attctgggcc ccactaattt tgcaagcttcatatcatatccca	21540
ttttacagat gacaaaactg tggcctcaga gccttactca agctccaga gcaaggtaact	21600
acagagttct ctctccagcc aaggcaggctt aaccagggtcc tgacataacct ctgagccagc	21660
cctcactttt acccattaaac agcaggataa gggtcgcccc tggtaaacat gattcctaca	21720
gggagccagg atcgctgttg tcatttaatg tttgaacacc agccggggag gcccccaagg	21780
ccttcagatc gggtccaagt ctcaggggtg ggccttgcac cagccactgc ttcccacagg	21840

acaactcaaa cttatacatg gtcatggagt acgtgcccgg cggggagatg ttctcacacc	21900
tacggcggat cggaagggttc aggttaagcgg gccacccccc atcacatcg gctgtcaggg	21960
tgtccacagg tggcagtgcg cggccaaagcc ccctggaaat gcagaggagt ccagcatact	22020
tcaacatgca ggtggtctcc cagaccctgt gggttctgt ttccccctgt ctgaggaata	22080
tgtgatattt caaccaccac aaaacaaaac agagcaaaca gggcaactta ggtgtccaaa	22140
ctgaagttgc tgccaggcac ggtggttctc accagtaatc ccagcacttt gggaggccaa	22200
ggtgggcaga tcacctgagg tcaggagttt gagaccagcc tggccaacat ggcaaaaccc	22260
tgtctccact aaaaatacaa aactgagctg ggcattggtg tggcacctg taatcccagc	22320
tacttggag gctgaggcag gagaatcaact tgaacccagg agacagaggt tgcagtgagc	22380
caagatcaca ccactgtact ccagcctggg tgagagagtg acatgccgtc taaaaaaaaa	22440
aaattgaagt tggatattt gtgcatttt tgagcccaa aaggtggcat gcatctgttag	22500
tcccactagt cctgaggctg aggtgagaag atcatttgag ctcagaatt tgagaccagc	22560
ctgggctgca tagtggagtt ttgtctcttt taaaaaaaaa aaattggctg ggcgcagtgg	22620
ctcgtgcctg taatcctaga actttggag gcccaggcgg gcggatcacg aggtcaggag	22680
atcaagacca tcctggtaa catggtaaa ccccgctct actaaaaaaaaa tacaaaaaaaa	22740
ttagccgggt gtatggcgg ggcctatacg tcccagctac tcgggaggct gaggcagaat	22800
ggcgtgaacc cgggaggcgg agttgcagt gagccgagat cgcgcactg cacttccagc	22860
ctgggtgaca gagcggact ccgtctaaaa aaaataaaat aaaaattata ctattatttt	22920
attttatata ggtggacagt tttatatgtg tagattttaa tatatatattt tatacataaaa	22980
ataaatctat atacagaaat ttgttaagttt aagatacagg ctgggtactg tggctcatgc	23040
cctataatcc cactgggaa ggcaggatgc tagagcccgaaatggatgaaatggatgaa	23100
ccagccttac atagcaagac cccatctctaa caaaaaaaaaa aaaaaaaaaagt	23160
caggtgtgg ggcacattcc tgttagtccca gtcctgggg aggctgaggt gggagatca	23220
cctgagtctg ggaggtaag actgcattgg cccacccatca tccctaggat gcaaggctgg	23280
ttcaacatata gaaaaaaaaa aaaaagactg cataagccgt gatcacgtc ctgcagtcca	23340
gactgggtttaaaccctgta agaccctgct gaaagaaaaa aaaaattttt aacttataaa	23400
tttgtcttat taacttataa gtttacatac gtagtttat ttgattttat ttttgagac	23460
agagtttac tcttgcacc caggctggag tgcagtggca cgatctcgcc tccatgcaaa	23520
ctctgcctcc cgggttcaag tgattcttt gtctcagcct cccaaatgc tggactaca	23580
ggtgcattgc ccctgcctg gctaattttt gtatTTTtag tagagatggg gtttaccat	23640
gttggccagg ctggtctcga actccctgacc tcaggtgatc ccccccccccc gccttggcct	23700
ctcaagatgc tggattaca ggcattggcc accgcgtgg cttgttagtt gtattttaga	23760
tagataacta tagattcact ttacatacaa caaaatgcac agttctcaa tggccatgc	23820
tacaagttttt gacagttgta tatacgatcc taacctccac caaaaacagt atatggaaact	23880

## ES 2 674 176 A1

tttctatcac ctaagaaaat tcccttgaat ccctttttt ttttttttt tttccaataa	23940
catacagagg tggaggccgg gtgccatggc tcacgcctgt aatcccagca ctttgggagg	24000
ccgaggcggg cgaatcacaa ggtcaggagt tcgagaccag cctgaccaac atggtaaac	24060
cccgctctca ctaaaaatat aaaaattagc cgggcgtggt ggtgcacacc tgtaatccca	24120
gctactcagg aggctgaggc aagagaatca ctgtttcca ggaggcaaag gttgcagtga	24180
gccgagatta tgccattgca ctccagcctg ggcaagagag cgagactgtc ttaaaaaaaaa	24240
taaattaatc aaaaaaaaaat atatataat atatacacac acacacacat atctacatac	24300
atacagaggt gaggtcttgc ctatattgcc caggctggtc tcgaactcct gggctcaagc	24360
gatcttccca cctcgacccc caaaaatgct gggattacag gggtagcca ccgcaccggg	24420
ccgaatccct ctcttgacac gtcacccccc caccaaaggc agttgtcctt tctgacttca	24480
aacaccgtgc ctttgtttg tctggcgtg gacatgatataaatggaatc attcatgttc	24540
ttttgtgtct tctttgcctt aacataatca gtttgaatg cagccacatt gttgagtgga	24600
tgcattggct gtcctgttgg cggtgggtgt ggtgagtgga attccattgt atgactatag	24660
ctcagtctgt gattccattt tcctgtggat ggaccacag gctgtttccc atgtcgggct	24720
atctaagaat caggtgcctt gcgtttctga cggctggact ggaggtgtct tcctctgggg	24780
taggctctgc agggccacct gctggaccat tttggggcat gaccactgac gttcacctcc	24840
ccatttgcctt ccatcagtga gcccatgcc cgtttctacg cggcccagat cgtcctgacc	24900
ttttagtatac tgcactcgct ggatctcatc tacagggacc tgaagccgga gaatctgctc	24960
attgaccagc agggctacat tcaggtgccc accagggccgg gcgaggggca gcccctgggg	25020
agccgtggcc tggacccttc ctccctgcca actgcctgtt ctgtgcccc caggtgacag	25080
acttcgggtt cgccaagcgc gtgaagggcc gcacttggac ctgtgcggc acccctgagt	25140
acctggccccc tgagattatac ctgagcaaag taggacgctc cccagccctc ccctccccct	25200
gaggccggct ctgctctcct gctctgcctt cctcctcacc ctgtcccccc ccatcttgct	25260
ccagggctac aacaaggccg tggactggtg gcccctgggg gttcttatct atgaaatggc	25320
cgctggctac ccgccttct tcgcagacca gcccatccag atctatgaga agatcgctc	25380
tggaaaggtg aggtccggat gtggggacac agccctggaa gaaacagacc gttccctgct	25440
caccatcctt attccctggg gagccctgct tgggtcaga ataatctaga agttccctaa	25500
gtcaggccag gtggtaagc tggacgcgcc gcccacactg aggccaacac ctcaagcccc	25560
cttgctgtcc agcccaacc ccgcgggttcc agaatccat gggcttccaa aatcccgagc	25620
ctcacggaa catcttggcc acagaacaca aaccgcctg ccagacgacc ctcctttcg	25680
ctcctcatcc cagttagtgt gagtttcgc aaattccaag gcagaaaaac gaatgtat	25740
ggttcctgtt cccaggtgct gtccatagcc tcacccagga ttgcctcac ttagcattta	25800
tagccatgc ttccctcccc aaacccagac ttgcctaact ctgagggttc agatgagggg	25860
tggtaagcc atctcagctc acatctatga caggtgaaa gtgcccacca tccaccaggc	25920

ES 2 674 176 A1

cccgaaatcc ccatcagtca caccctgaga tagtggcacc ctctgttagga gaggtgagga	25980
aacaggctgg gaaaaggat gtgtcttggc caagatcaca ctttggtag gaggtaatca	26040
ccgttagcaa tcattgttagg cactgatggc cgagagagg ttggggaccc cacctctgcc	26100
ctcagctcaa ccacccctgct gggaaagaccc gaccatcccc cgacttggtc cagcatctcc	26160
tacacaggag cttttgggtt gcccggagtc atgacactgt ggtggagca ccctcaggct	26220
cagccctggc cccagtcac gctctgccac cgactggctt tgaaactttg gggctggta	26280
caatggctca cacctgtat gccagcacct tggaaagtgg aggcttgagg ccaggagttc	26340
cagaccagcc tggcaacat agccagaccc catctctaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaca	26400
ctggccggc gcggtggctt acacctgtaa tcccagcact gtgggaagcc aaggcggca	26460
gatcacctga ggtcgaggagt tcgagaccag cctgactaac atggtaaac tccgtctcta	26520
ctaaaaacac acacaaaaaa aattagctgg gtatagtgtt gggcgcctgt aatcccagct	26580
acttgggagg ctgaggcagg agaattactt gaacccagga ggccggaggtt gcagttagcc	26640
aagatcacac cattgtactc cagccctggc aacagggcag gactctgtct caaaaaaaaaa	26700
aaaaaaaaaa aaaaactaaa aattagctgg gcgtgatggt gcacccctgt gttcccagct	26760
catcgagggt gtgaggcagg agatcgctt gagcccgaaa gtgagctgtg agctgtgatt	26820
gcatcactgc agtctagcct gggcacaga gccagaccct gtctttaaa aaaattcagg	26880
caagtgggtt gccccagctg gacacatagc atcactaaaa gagaaagatg aaggccaggc	26940
gcggtggtc acacctataa tcccagcatt ttgggaggcc aaggcaggtt gatcacgagg	27000
tcaggagttc aagaccagcc tggctaacat ggtgaaaccc tgtctctact aaaaatacaa	27060
aaattagctg ggcgtgggtt cgggtgcctg taatcccagc tactcggag gctgaggcag	27120
agaactgctt gaacccggga gacagagggtt gtagtgagcc gagattgcgc cactgcactt	27180
cagccctgggt gacagagcaa gactctgtct caaaaaaaaaa gaaagatgag gcatctgcca	27240
ccggaccaaa agaaactgccc aagaaaaatgg cccagagttt gccgggtgtt gtggctcacg	27300
cctgtatcc cagcactttt ggagggcggag gcggggcggat cacgaggtca ggagtttaag	27360
accagcctga ccaacatggt gaaacccgt ctctactaaa aataaaaaaa ttagccggat	27420
atggtgacac acacctgtaa tcccagctac tcaggagttt gaggcaggag aatcacttga	27480
aaccgggagg cagaggttgc agttagtgc gattgtgcctt ctgcacttca gcctggca	27540
cagagcaaga ctccatctca aaaaaaaaaa agaaaaaaaaa aaaaaaaaaat gtcccagagt	27600
ggggaaaaaa agaaagaaaa aaacacagaa gatcccacag gagaagatgc acatgactcc	27660
cttctttgtt gcatccccctt gttccccgc accgtcagtgt gtattatctc cctcgtgcag	27720
ccctggcata tctgccccac atctgagagg catgcgcagg cccagagagg ttaagggcca	27780
tggccaaggt cacacagcgt gtaagaggca cagcaggaac aagaagtcgt ttcttgcaac	27840
tataacttca gtatgtactt gcatacaagg cgtggctca gaggtttgg gaaaaacttt	27900
caagaagagt ttagctggc tttaagaac ggaagagcct tagctatgca gaaagagagg	27960

agagaaaaag tttgtcataa gcaagaatat ttcagaagtc tccagacccc agcagagatg	28020
ccttaagcag cagcagcagc agctgagaat gcaagttcta gagtccagta gacctgagat	28080
ggaattgccc catcacacac ctcaatgtga cctaggaaga gctgtttaac ccaaggctca	28140
gtttccccctt ctctgaaatg gaaatcatca tagcacttgc cttagagcaa tggttcttaa	28200
aagggacccc tttccagcag caccattgct ggggaatttg tttagaaatgc agattttgg	28260
gccaggcacf gtggctcaca cctgtaatcc caacacttg ggaggccaag gcaggtggat	28320
cacctaaggt caagagttca agaccagcct gaccaatatg gtgaaacccc gtctctacta	28380
aaaatacaaa aattagccag gtgtttggc gtgagcctgt aatcccagct actcaggagg	28440
ctgagacagg agaattcctt gaacccagga ggcggaggtt gcagtgagcc cagatcgac	28500
cactgcactc cagcctggc tacagagtga ggctattttt tttttttttt tttttttttt	28560
ttcaaaaaaa gaaatgcaga ttcttgctgg gtgtggtggc tcacgcctat aatcctagca	28620
ctttgggagg ccaaaggcagg agatcgctt gggctagaa gttcaagacc agcctggca	28680
acgttagtgag accctgtctc tacaaaaact tcttaaaata actaactctt gaattttaa	28740
agttttaaa gaaatgcaga ttctcaggcc acagtatcag acttcctaaa ttggaaactg	28800
taggtaggc tcaaggagct gtttacaag atgctggcag gcactctgct ttggaggccc	28860
acacccagta ggaccgttgg atggagaaag aagcatcatg ggcttcccaa gttccagacc	28920
agcttccac cctgtcctt tacccttcc tccaggtgcg cttcccttcc cacttcagct	28980
ctgacttgaa ggacctgctg cgaaacctcc tgcaggtaga tctcaccaag cgcttggga	29040
acctcaagaa tgggtcaac gatatcaaga accacaagtg gttgccaca actgactgga	29100
ttgccatcta ccagaggaag gtggcctcc cctccttaag cctgctgagg gtttggagc	29160
aggccaagag tcagggagga cagccaatag agaaatagag aagagaacac agttcagga	29220
gcaacctaga gtagagagct tagagcagt gggctagaa atggattct ggggtcattt	29280
ggccattcca tgactttg caacagatgc ctctcttgg gaagtaattt cccctttgat	29340
gagttgctac attaagagtt tcgggctgtt aagaggaatc cataacctaa tggtaagcac	29400
aggcctgagt cagagtaat atctttgaa tggtaggcca ttgcattta ttgtttaat	29460
aatgattatg ttgaatgctg aggtctgggt gattcttgcattt ccctctccag gtggaaagctc	29520
ccttcataacc aaagttaaa ggccctgggg atacgagtaa cttgacgac tatgaggaag	29580
aagaaatccg ggtctccatc aatgagaagt gtggcaagga gtttctgag ttttagggc	29640
atgcctgtgc ccccatgggt tttttttttt cttttttctt ttttttggc ggggggggtgg	29700
gagggttgga ttgaacagcc agagggcccc agatccctt gcatctaatt tcaccccccac	29760
cccacccctcc agggttaggg ggagcaggaa gcccagataa tcagagggac agaaacacca	29820
gctgctcccc ctcatccct tcaccctcct gccccctc ccactttcc cttccctttt	29880
ccccacagcc ccccagcccc tcagccctcc cagcccaatt ctgcctgttt taaacgagtt	29940
tctcaactcc agtcagacca ggtcttgctg gtgtatccag ggacaggta tggaaagagg	30000

## ES 2 674 176 A1

ggctcacgct taactccagc ccccacccac acccccattcc cacccaacca caggccccac	30060
ttgctaaggg caaatgaacg aagcgccaaac ctcccttcg gagtaatcct gcctggaaag	30120
gagagatttt tagtgacatg ttcatgtgggt tgcttgctag aattttttta aaaaaacaac	30180
aatttaaaat ctatattaag ttccaccagt gcctccctcc ctcccttcctc tactcccacc	30240
cctccatgt ccccccattc ctcaaattca ttttaaagag aagcagactg actttggaaa	30300
gggaggcgct ggggttgaa cctccccgct gctaatttcc cctggggccc tccccgggaa	30360
atcctctctg ccaatcctgc gagggtctag gccccttag gaagcctccg ctctctttt	30420
ccccaacaga cctgtcttca cccttgggct ttgaaagcca gacaaagcag ctgccccct	30480
ccctgccaaa gaggagtcat ccccaaaaaa gacagagggg gagccccaaag cccaagtctt	30540
tcctcccaagc agcgtttccc cccaaactcct taattttatt ctccgctaga ttttaacgtc	30600
cagccccc tcagctgagt ggggagggca tccctgcaaa agggAACAGA agaggccaag	30660
tcccccaag ccacggggcg ggggtcaagg ctagagctgc tggggagggg ctgcctgttt	30720
tactcaccca ccagcttccg cctccccat cctggggcgcc ctcctccag cttagctgtc	30780
agctgtccat cacctctccc ccactttctc atttgtctt ttttctctcg taatagaaaa	30840
gtggggagcc gctggggagc caccattc atccccgtat ttccccctct cataacttct	30900
ccccatcccc ggaggagttc tcaggcctgg ggtggggccc cgggtgggtg cggggggcgat	30960
tcaacctgtg tgctgcgaag gacgagactt cctcttgaac agtgtgctgt tgtaaacata	31020
tttggaaaact attaccaata aagttttgtt taaaaaaaaa gtgtcgctgg ttttctcgac	31080
ttcgtatcacc cacccacaca ccccccagggg gttggaaagg gaatttcgga ccccagcgtg	31140
caggccgatc aggtcctggc ttgaagtcct tgtaaccagg gtttagctga aattccggca	31200
ctccttcggc cccgcaggag aaacgagcgt caaaactgccc ttgacccca gattcggggt	31260
ccccaaatct gcggcgccgc ccctcggcgt ccagccccgg accgagaggg cgctctaggg	31320
aggcgctggg gctggcgccgc caggaggccg agcggcgccg gggcgccccc tggcaggggg	31380
agtagaaggg ggagaggggtg cgcccccattc ctcagcgccg ggccaggcgcc	31440
gcctgagggc cgcggggcg gcggcagcag gagggtcccc gcagcacccct gcgagcgccg	31500
cagccccggc ccgcggggcg cgagttcccg gtaagtgcgg tcccagagac ggagcgccgt	31560
ggagaggcgt ggagaggggg gctggcgcc gggacgtct gggcccgcc cccaaatggct	31620
ggagggcgcc cgagcgccgc ccgcggccccc tgcccccctc ctctccactc ccccccggcac	31680
tcccccccccc ctccccccgc ccggctttc ccccgcccccc gccccgggccc aactccgcgg	31740
cgcctcccta aaaagcgccgc gggagttgta agggggggcc ggagcgagcc ggagtgagcg	31800
agagcgccagg gtaaaggggg cggggggggg gcccgggctc cacctaaaaa gcggggcgccgt	31860
gggggtggga gggaggaagg cggggggcg ggaggaggga gggagggaaag gaaggggggc	31920
cggagtgtcc cggggcgccagg gcgcgcgtgc ggccggggcg gcggccggggaa gggggccggcc	31980
gcgcgcgcgt cccctccctcc ccctcgcatc cccggcccccg cgccgcggcca gcagaagcg	32040

gtctgtgtgt	gcgtgcgtgc	gagtgagtga	gtgtgtcat	attttttctt	ctctttctt	32100
tctctctcac	tgtttttcc	tctctctc	tctccctctc	tctctctttt	tttttttttt	32160
ttttttgcaa	agaaacagca	gcgccgccc	cgcgtcgcc	aggcgctcg	ccccccgggg	32220
ggggaggcgg	aggaggcggg	cagcggcgg	gggaggggag	ccggggaggg	gggcggcccg	32280
ctgggaggga	ggcagcgcgc	acggtgcagc	cggccgggc	gggaggcatg	gcggggcccc	32340
cggccctacc	cccgccggag	acggcggcgg	ccgcccaccac	ggcggccgccc	gcctcgctcg	32400
ccgccccttc	cccgactac	caagagtgg	tcctggacac	catcgactcg	ctgcgctcgc	32460
gcaaggcgcg	gccggacctg	gaggcatct	gccggatgg	gcggcggcgg	cacggcccg	32520
agccggagcg	cacgcgcgcc	gagctcgaga	aactgatcca	gcagcgcgcc	gtgctccggg	32580
tcagctacaa	ggggagcatc	tcgtaccgca	acgcggcgcg	cgtccagccg	ccccggcgcg	32640
gagccacccc	gccggccccc	ccggcgcgc	cacagcagca	gcagccgccc	ccgcccgcagc	32700
cacagccgcc	gccggagggg	ggcgcgggtgc	gggcccggcgg	cgcggcgcgg	cccgtgagcc	32760
tgcgggaagt	cgtgcgtac	ctcggggca	gcggcggcgc	cggcggtcgc	ctaaccgcg	32820
gccgcgtgca	ggggctgctg	gaggaggagg	cggcggctcg	aggccgtctg	gagcgcaccc	32880
gtctcggagc	gcttgcgttg	ccccgcgggg	acaggcccgg	acgggcgcgc	ccggccgcaca	32940
gcccgcgc	gtctcgacgc	aaggtagcgc	cgccggggag	cgggggcgc	gcccgtggg	33000
caggtgcggg	cgaagtttgt	ggcggggcgc	cgagtcccgg	gaggaactgg	gtggcgggtg	33060

<210> 2  
<211> 351  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Asn Ala Ala Ala Ala Lys Lys Gly Ser Glu Gln Glu Ser Val  
1 5 10 15

Lys Glu Phe Leu Ala Lys Ala Lys Glu Asp Phe Leu Lys Lys Trp Glu  
20 25 30

Ser Pro Ala Gln Asn Thr Ala His Leu Asp Gln Phe Glu Arg Ile Lys  
35 40 45

Thr Leu Gly Thr Gly Ser Phe Gly Arg Val Met Leu Val Lys His Lys  
50 55 60

Glu Thr Gly Asn His Tyr Ala Met Lys Ile Leu Asp Lys Gln Lys Val  
65 70 75 80

Val Lys Leu Lys Gln Ile Glu His Thr Leu Asn Glu Lys Arg Ile Leu  
85 90 95

Gln Ala Val Asn Phe Pro Phe Leu Val Lys Leu Glu Phe Ser Phe Lys  
100 105 110

ES 2 674 176 A1

Asp Asn Ser Asn Leu Tyr Met Val Met Glu Tyr Val Pro Gly Gly Glu  
115 120 125

Met Phe Ser His Leu Arg Arg Ile Gly Arg Phe Ser Glu Pro His Ala  
130 135 140

Arg Phe Tyr Ala Ala Gln Ile Val Leu Thr Phe Glu Tyr Leu His Ser  
145 150 155 160

Leu Asp Leu Ile Tyr Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Leu Leu Ile Asp  
165 170 175

Gln Gln Gly Tyr Ile Gln Val Thr Asp Phe Gly Phe Ala Lys Arg Val  
180 185 190

Lys Gly Arg Thr Trp Thr Leu Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro  
195 200 205

Glu Ile Ile Leu Ser Lys Gly Tyr Asn Lys Ala Val Asp Trp Trp Ala  
210 215 220

Leu Gly Val Leu Ile Tyr Glu Met Ala Ala Gly Tyr Pro Pro Phe Phe  
225 230 235 240

Ala Asp Gln Pro Ile Gln Ile Tyr Glu Lys Ile Val Ser Gly Lys Val  
245 250 255

Arg Phe Pro Ser His Phe Ser Ser Asp Leu Lys Asp Leu Leu Arg Asn  
260 265 270

Leu Leu Gln Val Asp Leu Thr Lys Arg Phe Gly Asn Leu Lys Asn Gly  
275 280 285

Val Asn Asp Ile Lys Asn His Lys Trp Phe Ala Thr Thr Asp Trp Ile  
290 295 300

Ala Ile Tyr Gln Arg Lys Val Glu Ala Pro Phe Ile Pro Lys Phe Lys  
305 310 315 320

Gly Pro Gly Asp Thr Ser Asn Phe Asp Asp Tyr Glu Glu Glu Ile  
325 330 335

Arg Val Ser Ile Asn Glu Lys Cys Gly Lys Glu Phe Ser Glu Phe  
340 345 350

<210> 3  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>

<223> Cebador diseñado para amplificar el gen PRKACA

<400> 3

gagcaggaga gcgtgaaaga

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador diseñado para amplificar el gen PRKACA

<400> 4

tcatggcata gtggttcccg

20

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador diseñado para amplificar el gen GAPDH

<400> 5

ggctgagaac gggaaagcttg tca

23

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador diseñado para amplificar el gen GAPDH

<400> 6

cggccatcac gccacagttt c

21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador diseñado para amplificar el gen c-jun

<400> 7

gtgccgaaaa aggaagctgg

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador diseñado para amplificar el gen c-jun

<400> 8

ctgcgttagc atgagttggc

20

<210> 9

<211> 20

<212>	DNA	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Cebador diseñado para amplificar el gen Bcl-XL	
<400>	9	20
	ggcaaccat cctggcacct	
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Cebador diseñado para amplificar el gen Bcl-XL	
<400>	10	20
	ctgcgttagc atgagttggc	
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Cebador diseñado para amplificar el gen MMP-9	
<400>	11	20
	cggagcacgg agacgggtat	
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Cebador diseñado para amplificar el gen MMP-9	
<400>	12	20
	tgaaggggaa gacgcacagc	
<210>	13	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Cebador diseñado para amplificar el gen NeoR	
<400>	13	25
	gactgggcac aacagacaat cggtt	
<210>	14	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Cebador diseñado para amplificar el gen NeoR	
<400>	14	25
	tgatattcggtt caaggaggca tcggcc	



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201601099

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 22.12.2016

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)  
**G01N33/574** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 2007015926 A2 (OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY) 08/02/2007, Todo el documento especialmente reivindicación 10.		1-23
Y	MOUSSAY, E. et al. "Determination of genes and micrornas involved in the resistance to fludarabine <i>in vivo</i> in chronic lymphocytic leukemia". MOLECULAR CANCER, 20/05/2010, Vol. 9, páginas 115, <DOI: 10.1186/1476-4598-9-115>, Todo el documento.		1-23
Y	MACKEY, J.R. et al. "Quantitative analysis of nucleoside transporter and metabolism gene expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL): identification of fludarabine-sensitive and -insensitive populations. BLOOD, 15/01/2005, Vol. 105, Nº 2, páginas 767-774, <DOI: 10.1182/blood-2004-03-1046>. Todo el documento, especialmente tablas 2, 3.		1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 20.10.2017	Examinador M. Novoa Sanjurjo	Página 1/4
--	---------------------------------	---------------

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

C12Q, G01N

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.10.2017

**Declaración****Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-23  
Reivindicaciones

SI  
NO

**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones  
Reivindicaciones 1-23

SI  
NO

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2007015926 A2 (OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY)	08.02.2007
D02	MOUSSAY, E. et al. "Determination of genes and micrornas involved in the resistance to fludarabine <i>in vivo</i> in chronic lymphocytic leukemia. MOLECULAR CANCER, Vol. 9, páginas 115, <DOI: 10.1186/1476-4598-9-115>	20.05.2010
D03	MACKEY, J.R. et al. "Quantitative analysis of nucleoside transporter and metabolism gene expression in chronic lymphocytic leukemia (cll): identification of fludarabine-sensitive and –insensitive populations. BLOOD, Vol. 105, Nº 2, páginas 767-774, <DOI: 10.1182/blood-2004-03-1046>	15.01.2005

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

## NOVEDAD

## Reivindicaciones 1-23

La relación entre la expresión del gen PRKACA y la resistencia/sensibilidad de pacientes hematológicos al tratamiento con Fludarabina, no ha sido descrita previamente en el estado de la técnica. Las reivindicaciones 1-23, cumplen el requisito de novedad de acuerdo al Artículo 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

## ACTIVIDAD INVENTIVA

## Reivindicaciones 1-23

La invención consiste en un método para determinar si un paciente hematológico principalmente de leucemia linfocítica crónica, va a presentar resistencia al tratamiento con Fludarabina.

El solicitante menciona en la página 3, líneas 5-10, que no existe en el estado de la técnica un método que permita averiguar si un sujeto va a responder de forma positiva al tratamiento con análogos de purina.

Los documentos más relevantes para valorar la actividad inventiva son los documentos D01-D03. El documento D01, describe un método para valorar la respuesta de un enfermo de leucemia linfocítica crónica al tratamiento con Fludarabina en el que se utilizan los marcadores de superficie CD5 y CD19. El documento D02, presenta los resultados de la expresión de distintos genes en pacientes de leucemia linfocítica crónica, sensibles y resistentes a la Fludarabina. Se mencionan varios genes cuya expresión disminuye en pacientes sensibles a Fludarabina. Los datos específicos se presentan en los archivos adicionales del documento. El documento D03, también presenta los resultados de un ensayo para identificar marcadores que permitan seleccionar pacientes sensibles y resistentes a Fludarabina.

En ninguno de los documentos D01-D03, se ha identificado el gen PRKACA como marcador. Los marcadores para la respuesta de un paciente al tratamiento con Fludarabina son conocidos en el estado de la técnica anterior (D01-D03). Un nuevo marcador solamente podría considerarse inventivo si su determinación proporcionara resultados inesperados en relación con el resto de las opciones posibles descritas en el estado de la técnica. Sin embargo, en la solicitud no se indican dichos efectos o propiedades; por lo tanto, se considera que las reivindicaciones 1-23 no cumplen el requisito de actividad inventiva del Artículo 8 de la Ley de Patentes 11/1986.