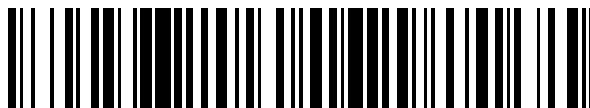


19



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:

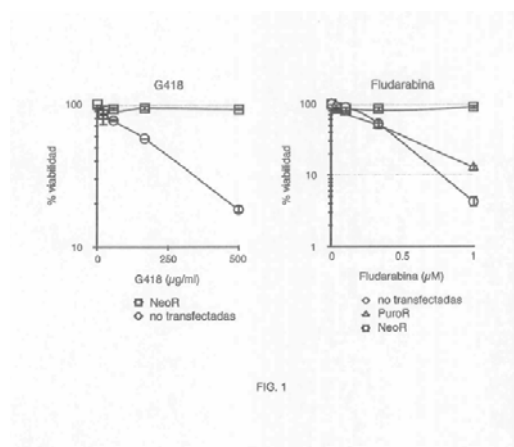
**PIPAÓN GONZÁLEZ, Carlos y
YÁÑEZ SAN SEGUNDO, Lucrecia**

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.



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 de un órgano, que comprende la determinación de los niveles de expresión del gen PRKACA.

10

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 maquinaria de replicación del ADN, lo que da lugar a una terminación prematura de las cadenas nacientes y a la muerte celular.

20

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 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.

25

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 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.

30

35

- 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
- 5 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
- 10 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.
- 15 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).
- 20 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.
- 25 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
- 30 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
- 35 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 INVENCION

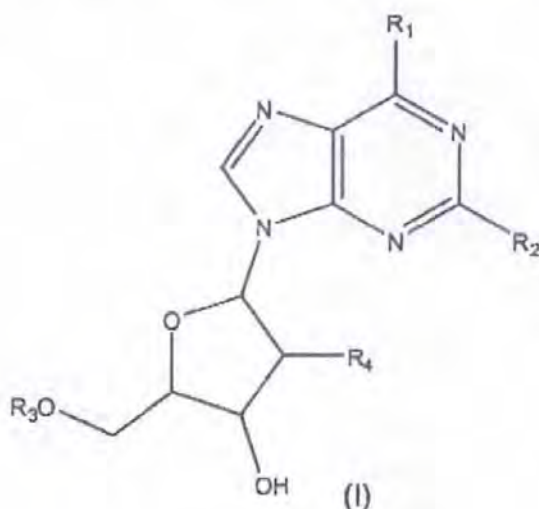
- Los autores de la presente invención han observado que la determinación de los
- 15 niveles de expresión del gen proteína kinasa dependiente de AMPC (gen PRKACA) en un sujeto permite la predicción de la respuesta de dicho sujeto al tratamiento con un análogo de purina. Esto resulta muy beneficioso 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 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 fórmula (I),



donde:

- R₁ se selecciona de entre NH₂ o OCH₃,
- R₂ se selecciona de entre un halógeno o NH₂,
- 15 R₃ se selecciona de entre H o PO₃H₂,
- R₄ se selecciona de entre OH o un halógeno,

o cualquiera de sus isómeros o de sus 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
- 20 (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 trasplantado 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 administración de análogos de purina, 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 neutrofilica crónica, policitemia vera, mielofibrosis primaria, trombocitopenia esencial, leucemia eosinofílica crónica, mastocitosis sistémica, neoplasias mieloproliferativas inclasificables, citopenia refractaria con displasia unilineal, anemia refractaria sideroblástica, citopenia refractaria con displasia multilinea, anemia refractaria con exceso de blastos, síndrome mielodisplásico con del (5q) aislada, síndrome mielodisplásico inclasificable, síndrome mielodisplásico infantil, leucemia 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 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 enfermedad de injerto contra huésped.

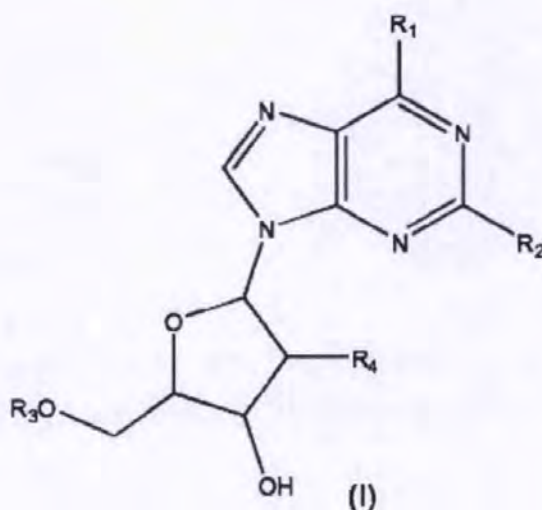
En una realización particular, el sujeto padece una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en síndrome linfoproliferativo de bajo grado, leucemias agudas secundarias y síndromes mielodisplásicos de alto grado, o el sujeto va a recibir un trasplante de un órgano o tejido. En una realización más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

- R₁ se selecciona de entre NH₂ o OCH₃,
- 15 R₂ se selecciona de entre un halógeno o NH₂,
- R₃ se selecciona de entre H o PO₃H₂,
- R₄ 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).

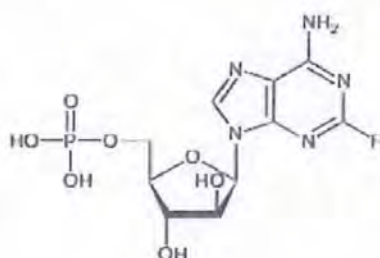
En una realización particular del método de la invención, R₁ del compuesto de fórmula (I) es un grupo NH₂.

En otra realización particular, R_2 del compuesto de fórmula (I) es un grupo NH_2 , un F o un Cl.

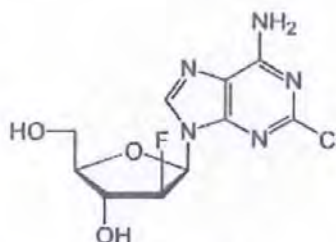
- 5 En otra realización particular, R_4 del compuesto de fórmula (I) es un grupo OH o un F.

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).

- En una primera etapa [etapa (a)], el método de la invención comprende cuantificar los
15 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
20 de la proteína quinasa 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
25 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 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, 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, deleciones 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 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
IQVTDFGFAK RVKGRWTWLC 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 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.

20

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.

35

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, 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 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.

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.

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.

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 unirse a la proteína cAMPK y la posterior cuantificación de los complejos formados.

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

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 α 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). 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 bioluminiscentes, 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 inmunoabsorbente 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, 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 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.

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 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 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.

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 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 rellenar 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.

35

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 farmaceuticamente 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
 5 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
 10 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
 15 la invención comprenderán una secuencia de nucleótidos que hibrida de forma específica con la secuencia del 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.

20

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
 25 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
 30 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
 35 longitud de la secuencia del ácido nucleico, la composición base, el porcentaje de

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

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

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

Como alternativa, y en realizaciones adicionales de la invención, la expresión genética 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 epítopos 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 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 específicos de la proteína codificada por el gen PRKACA disponibles comercialmente

incluyen, sin limitar a, PKA α 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')-IIa.** A. Análisis de viabilidad por XTT de fibroblastos transfectados con el gen NeoR o no transfectados, tratados o no con 0,1 μ M 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 μ M) y dosis crecientes de Citarabina.

15

Figura 4. Análisis mutacional de la resistencia a Fludarabina por APH(3')-IIa (NeoR). A. Curvas de viabilidad de fibroblastos transfectados con NeoR agreste o diversos mutantes en respuesta a dosis crecientes de Geneticina (G418) o 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.

20

Figura 5. Protección contra Fludarabina mediada por NeoR y PRKACA en 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.

25

30

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

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

35

utilizando las coordenadas del ATP relativas a APH(3')-IIa. 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')-IIa (guiones grises) del grupo hidroxilo de la Fludarabina y del ion fluoruro de Clofarabina es 2.7 Å.

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 1µM Fludarabina. Se muestra la curva de los fibroblastos incubados en Fludarabina fresca, como referencia.

20

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 (10µM, 16h) en fibroblastos transfectantes para diferentes mutaciones de APH(3')-IIa, 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 10µM Fludarabina. C. Western blot que muestra el cambio en la movilidad de FANCD2 y la digestión de PARP inducidos por 10µM Fludarabina en células transfectadas con los mutantes de NeoR indicados, su forma agreste (wt) o no transfectadas (UT). D. Comparación entre el cambio de movilidad de la banda de FANCD2 inducida por 10 µM Fludarabine (izquierda) o por 100 µM Citarabina (derecha) en fibroblastos transfectados con NeoR o no transfectados (UT). Las cantidades de las proteínas GAPDH y p53 se muestran como control.

30

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

35

A. Hidrólisis de ATP in vitro catalizada por APH(3')-IIa (1.5µM) en ausencia (gris claro) o presencia (gris oscuro) de 200 µM Kanamicina. Se muestra la actividad en presencia de 200µM Kanamicina pero sin enzima como control (negro). B. Efecto de la Fluradabina monofosfato (F-Ara-AMP) sobre la actividad ATPasa de APH(3')-IIa. 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'-(β,γ-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, Nuailé, Francia) suplementado con un 10% de suero fetal de ternera inactivado por calor en una atmósfera con un 5% de CO₂ 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 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

Gen	Cebadores (5'-3')	SEQ ID NO:
PRKACA	GAGCAGGAGAGCGTGAAAGA	3
	TCATGGCATAGTGGTTCCCG	4
GAPDH	GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCA	5
	CGGCCATCACGCCACAGTTTC	6
c-jun	GTGCCGAAAAAGGAAGCTGG	7
	CTGCGTTAGCATGAGTTGGC	8
Bcl-XL	GGCAACCCATCCTGGCACCT	9
	CTGCGTTAGCATGAGTTGGC	10
MMP-9	CGGAGCACGGAGACGGGTAT	11
	TGAAGGGGAAGACGCACAGC	12
NeoR	GACTGGGCACAACAGACAATCGGCT	13
	TGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCC	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 proteína se determinó por BCA siguiendo las instrucciones del fabricante (G Biosciences, St. Louis, USA). Las proteínas (25µg) 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 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).

Modelado molecular y encaje del ligando

Se utilizó el modelo atómico de APH(3')-IIa (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 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 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 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')-IIa (número de acceso de Protein Data Bank 1nd4.pdb; 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')-IIa 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.

Sobrexpresión y purificación de APH(3')-IIa

20 Se indujo la sobrexpresión 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-tiogalactopiranosido). 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')-IIa 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')-IIa (1,5 μ M) se pre-incubó con los sustratos AMP, Fludarabina monofosfato o AMP-PNP (10 mM) durante 5 minutos a 37°C. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de esta muestra a una mezcla para ensayo de ATPasa (150 μ l) consistente en 50 mM Pipes-NaOH pH 7.0, 35 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,05 mM ATP, 225 μ M Kanamicina, 5% (w/v) glicerol, 0,5 mM fosfoenolpiruvato, 0,25 mM NADH, 60 μ g/ml piruvato kinasa y 60 μ g/ml lactato deshidrogenasa (Roche Applied Science). La actividad se midió a través del descenso 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-IIa (APH(3')-IIa) que inactiva diferentes 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 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')-IIa codificada por el plásmido.

30 ***APH(3')-IIa 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')-IIa confería resistencia también a otras drogas relacionadas estructuralmente. Células transfectadas con APH(3')-IIa 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')-IIa 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')-IIa 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')-IIa. 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')-IIa (Figura 4A). La
25 lisina 50 se encuentra en el sitio de unión del ATP, donde se ha propuesto que interacciona con el fosfato β del nucleótido. La introducción de la mutación K50R en APH(3')-IIa 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')-IIa 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')-IIa 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')-IIa 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')-IIa, así que se decidió probar si 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 transfectados bien con la forma agreste de APH(3')-IIa o con su mutante K50R (Figura 4B).

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

15

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

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

30 E56 en APH(2')-IIa; K50 y E63 en APH(3')-IIa) 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')-IIa. 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')-IIa (Figura 5).

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

Para tratar de esclarecer el mecanismo por el que APH(3')-IIa 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 incorporación de fludarabina. Con este fin, se crecieron en presencia de fludarabina células transfectadas con APH(3')-IIa 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 células transfectadas con APH(3')-IIa 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')-IIa K50R apenas afectó la viabilidad de las células receptoras. En conjunto, estos experimentos sugieren que APH(3')-IIa impide que la Fludarabina sea incorporada por las células.

Fludarabina induce monoubiquitinación de FANCD2 pero APH(3')-IIa 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 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 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')-IIa agreste o que albergaban las mutaciones H188Y o R211H. Sin embargo, las mutaciones K50R y D190A socavaron la capacidad de APH(3')-IIa 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')-IIa 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')-IIa 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')-IIa. Por tanto, se
10 hipotetizó que en presencia de fludarabina trifosfato (F-Ara-ATP), APH(3')-IIa 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')-IIa 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 de las células), se decidió usar la forma monofosfato en los ensayos *in vitro*. Se
20 conjeturó que si la Fludarabina trifosfato es un sustrato genuino de APH(3')-IIa, 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 reducción del 35% en la actividad ATPasa de APH(3')-IIa, mientras que el AMP indujo
25 una inhibición del 50% (Figura 9B). Estos resultados indican que la fludarabina monofosfato se une a APH(3')-IIa y sugiere que la defosforilación de la forma activa de fludarabina es el mecanismo de resistencia mediado por la enzima.

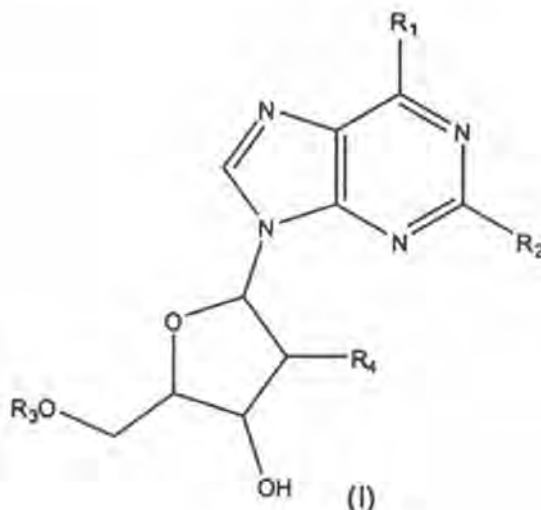
Análisis de kinasas eucariotas con similitud estructural a APH(3')-IIa.

30 Los estudios cristalográficos de APH(3')-IIa 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')-IIa son ERK (*extracelular regulated MAP kinase*) y cAMPK (la subunidad catalítica de la kinasa activada por
35

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')-IIa (Figura 11A). Se obtuvieron resultados
5 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_1 se selecciona de entre NH_2 o OCH_3 ,

R_2 se selecciona de entre un halógeno o NH_2 ,

R_3 se selecciona de entre H o PO_3H_2 ,

R_4 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_1 es NH_2 .

3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde R_2 es F, Cl o NH_2 .

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R_4 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 reivindicaciones 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 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) 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.

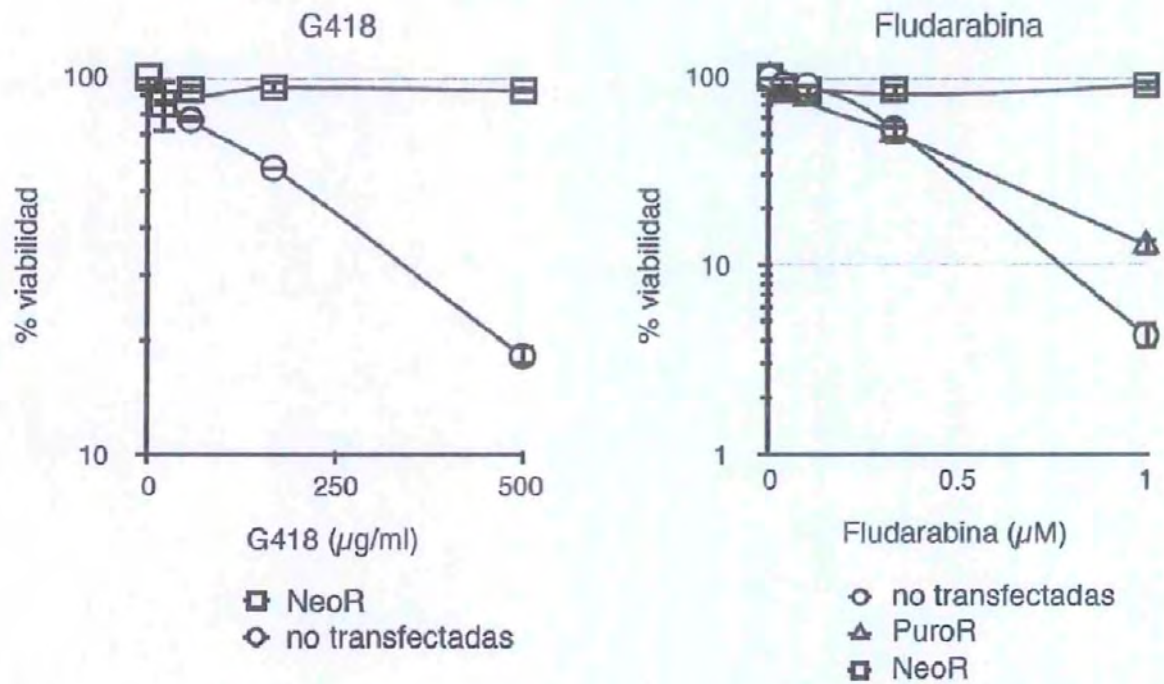


FIG. 1

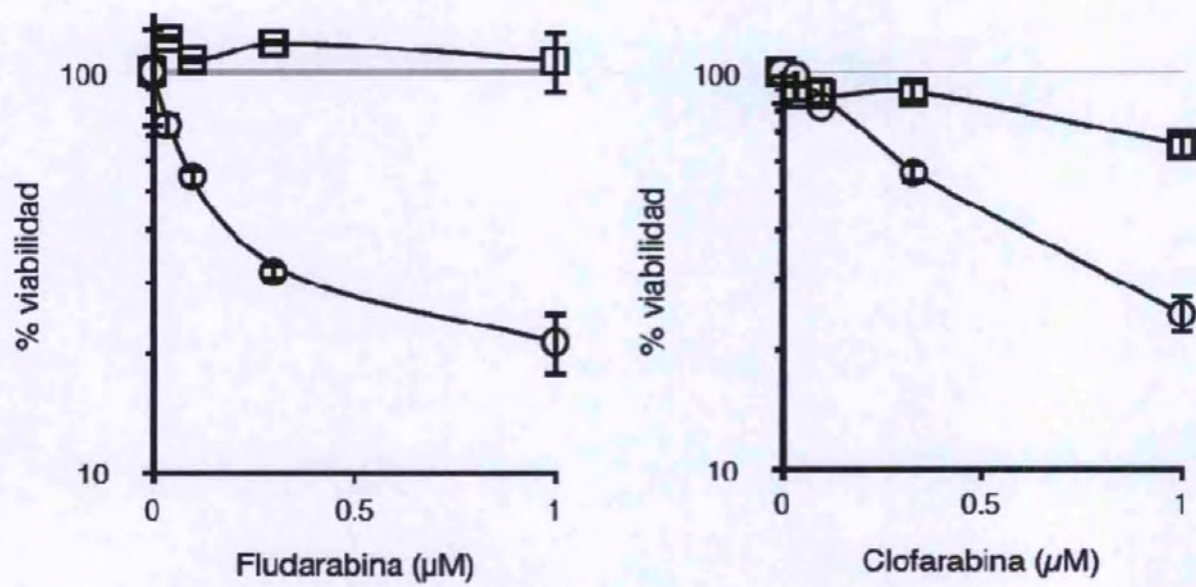


FIG. 2

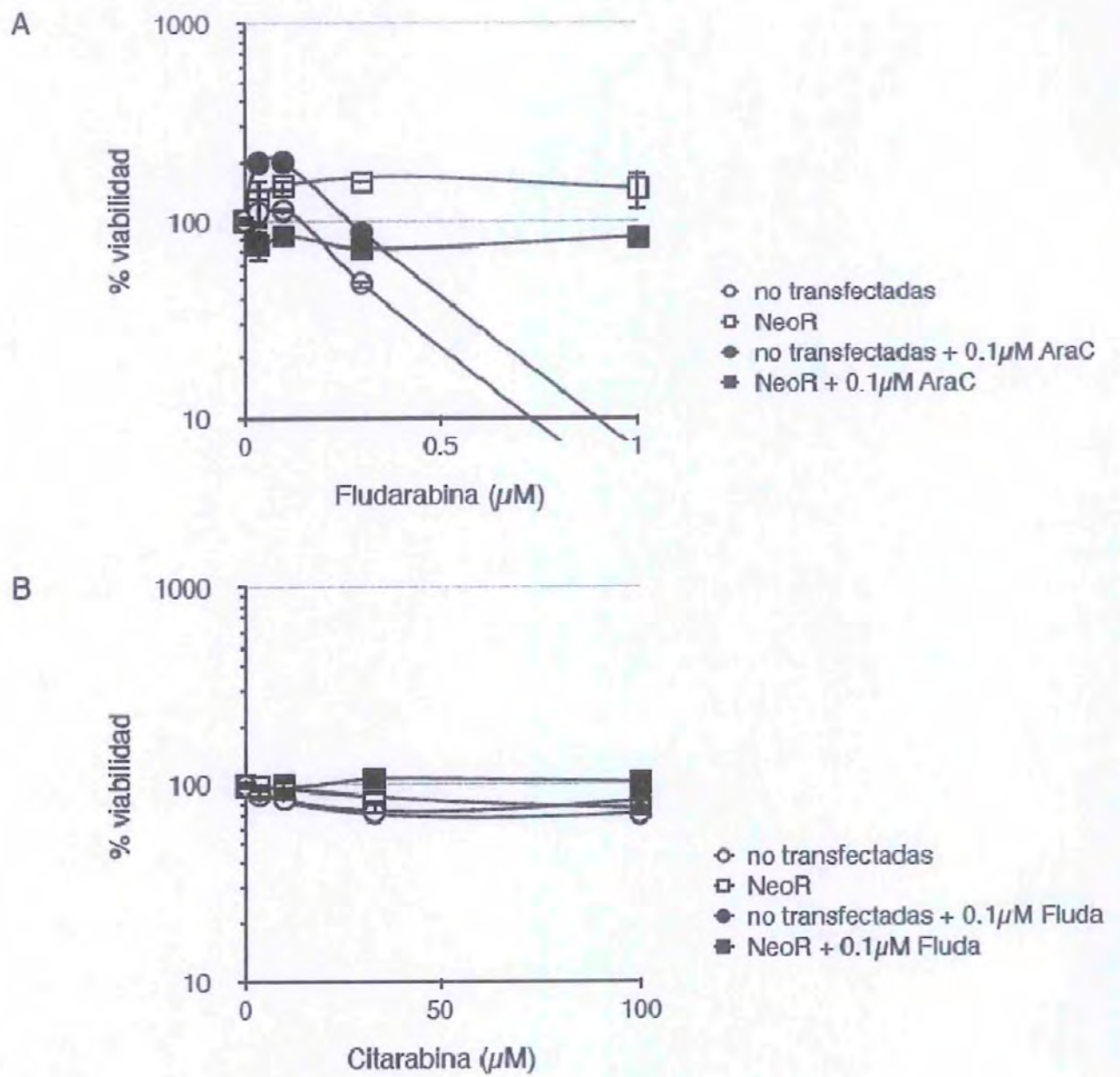


FIG. 3

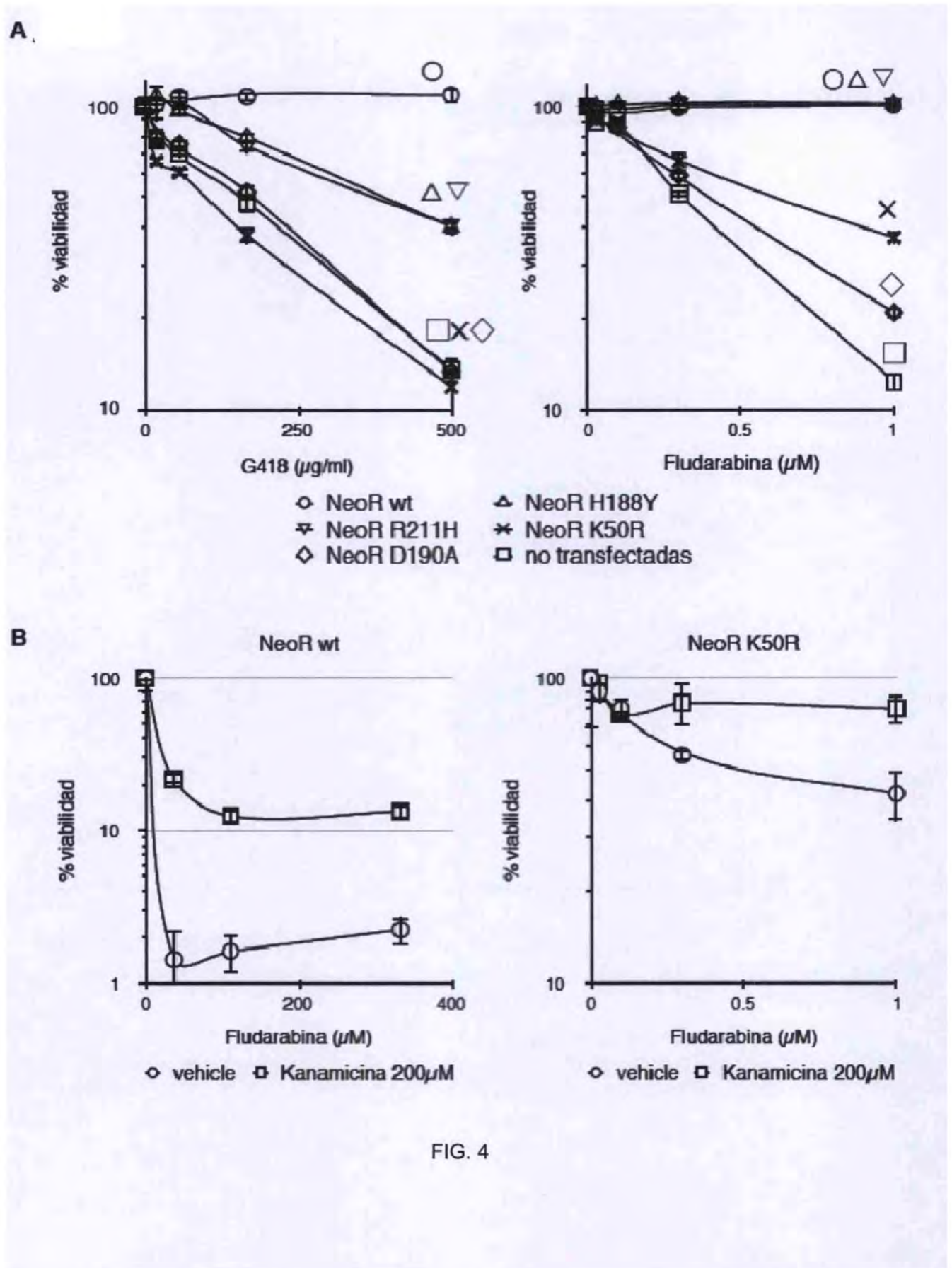


FIG. 4

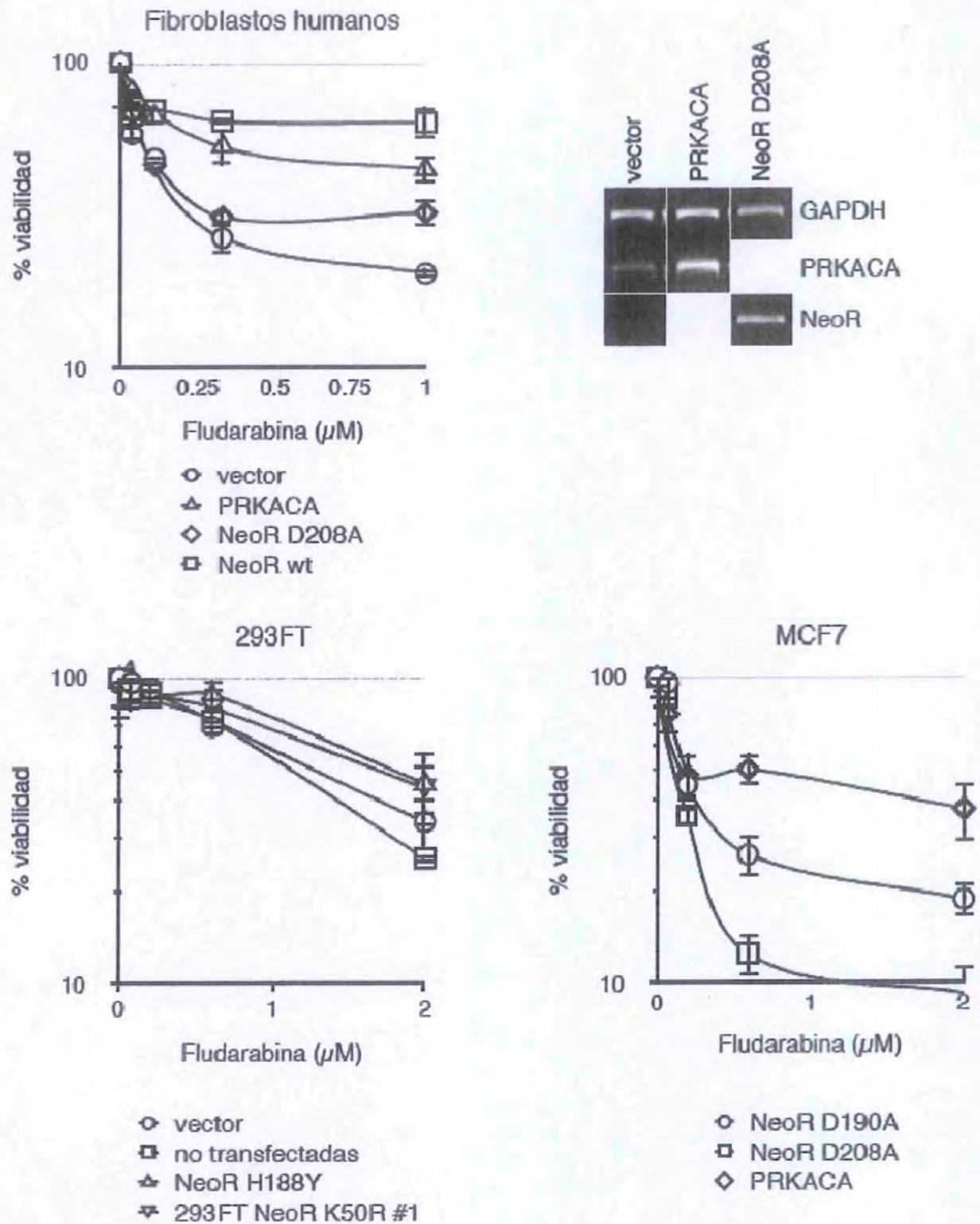


FIG. 5

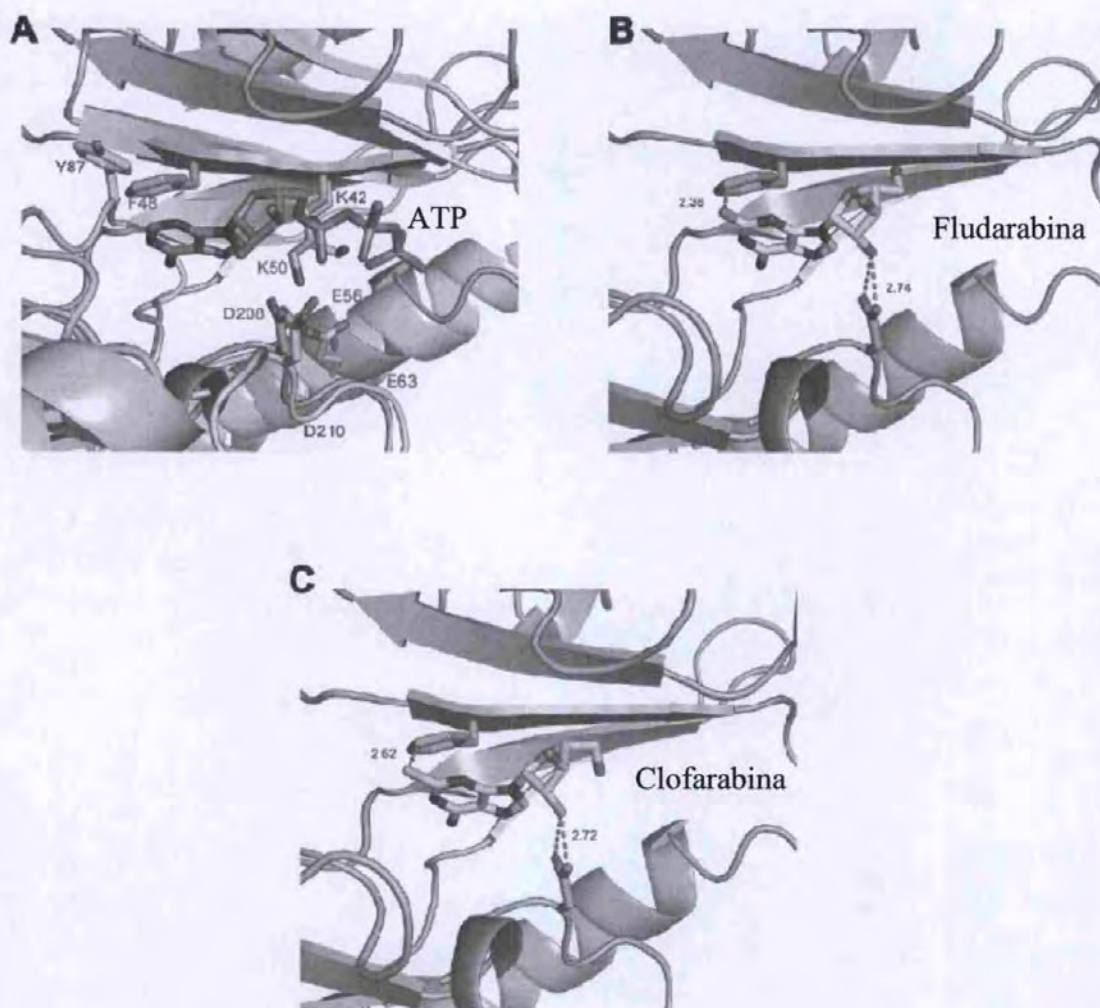
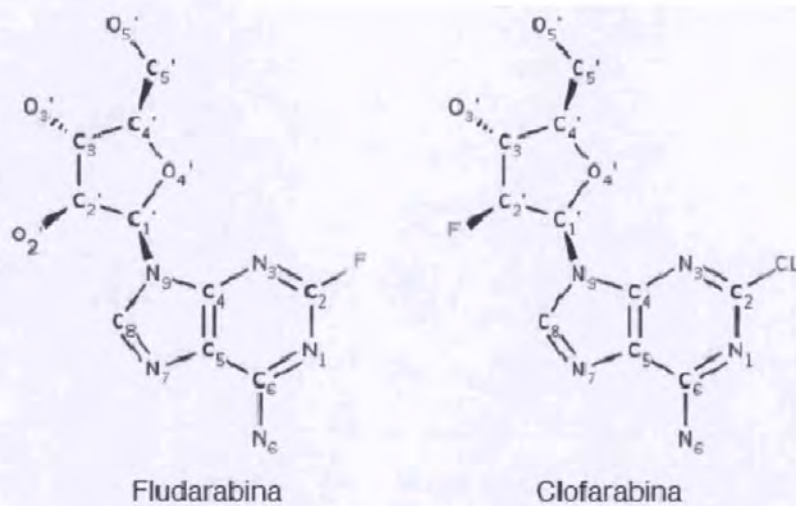


FIG. 6

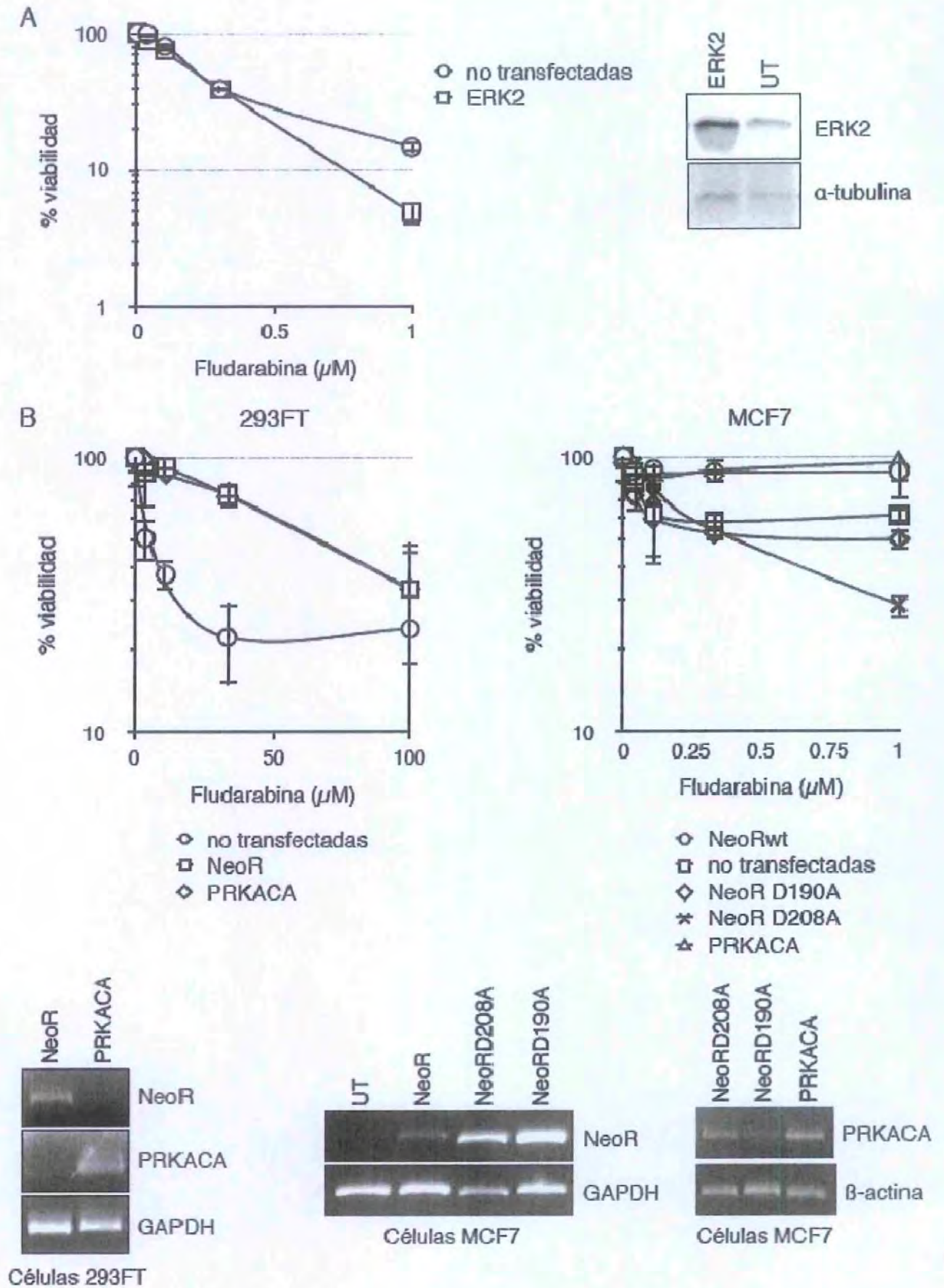


FIG. 7

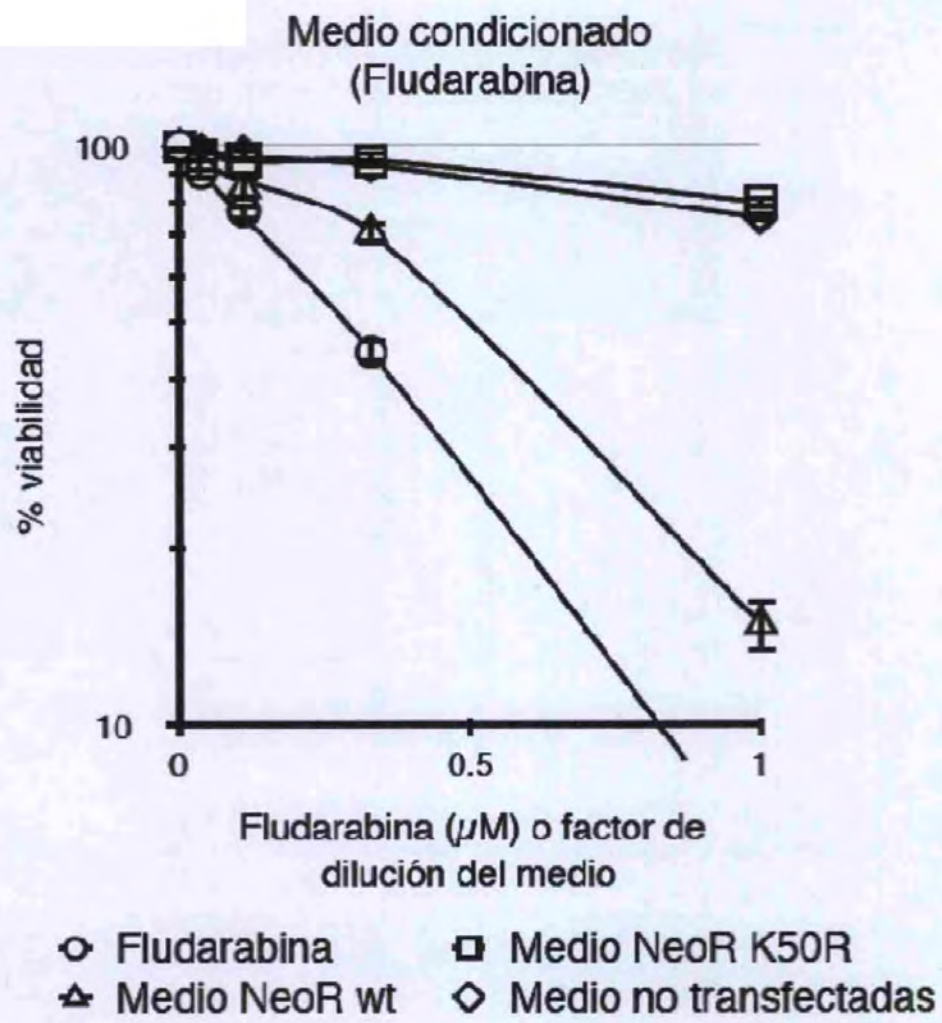


FIG. 8

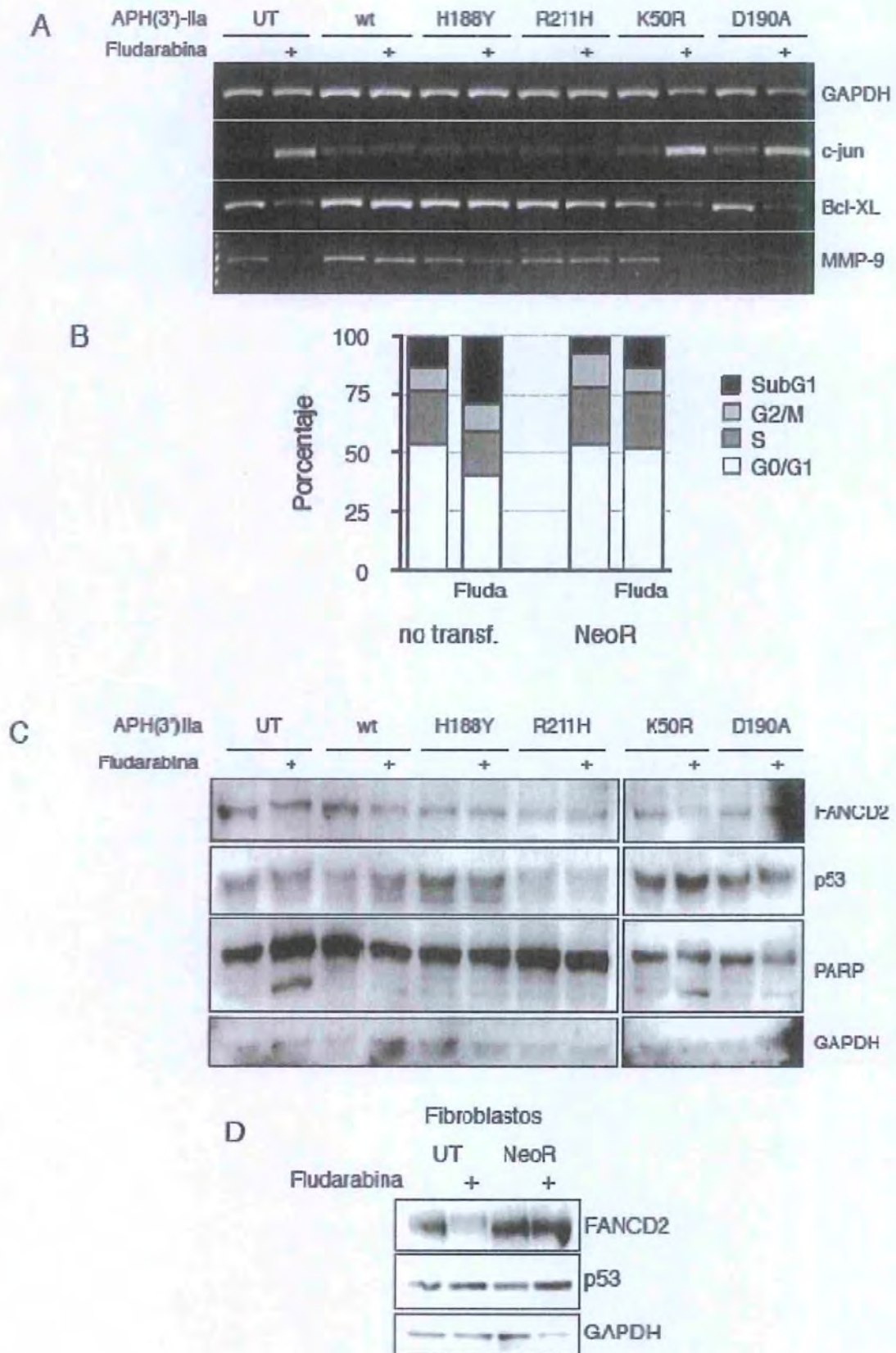


FIG. 9

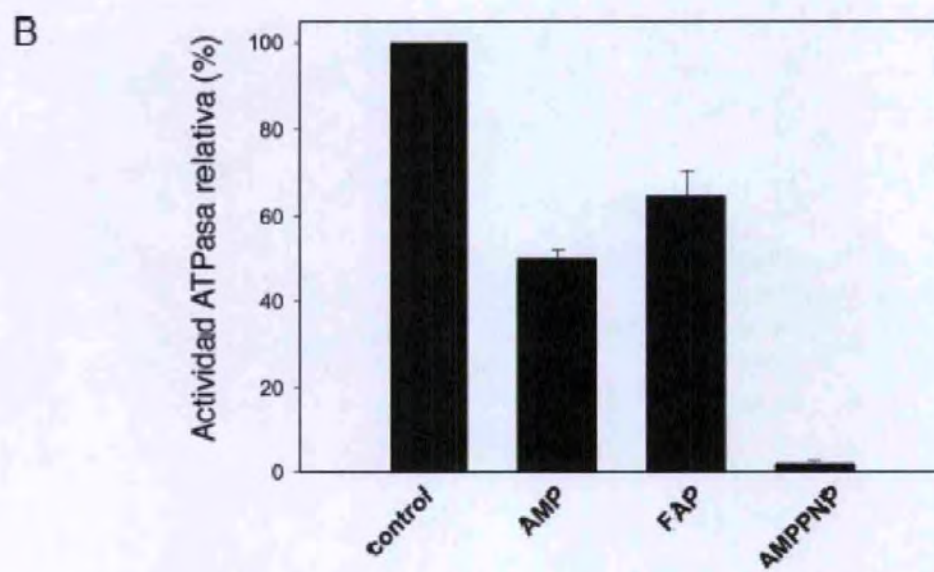
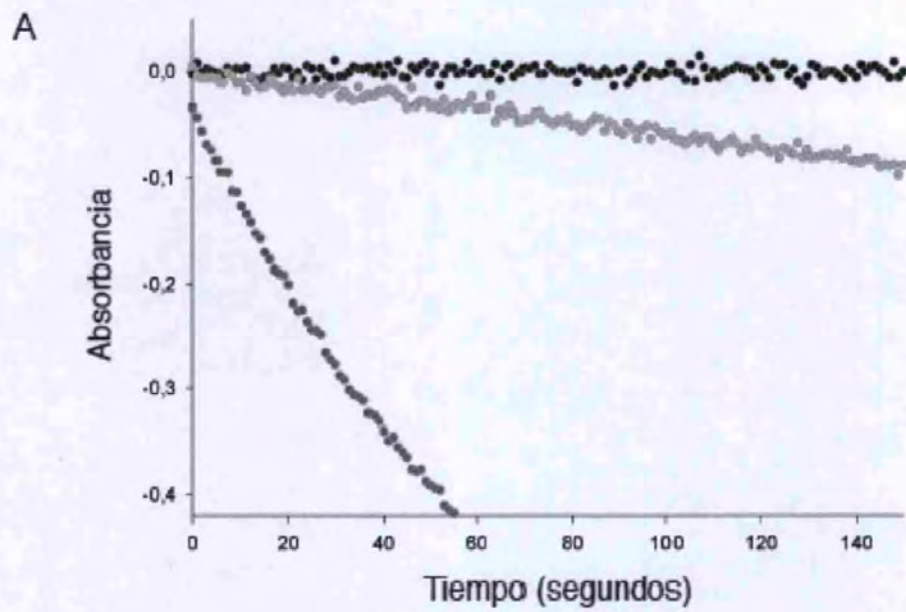


FIG. 10

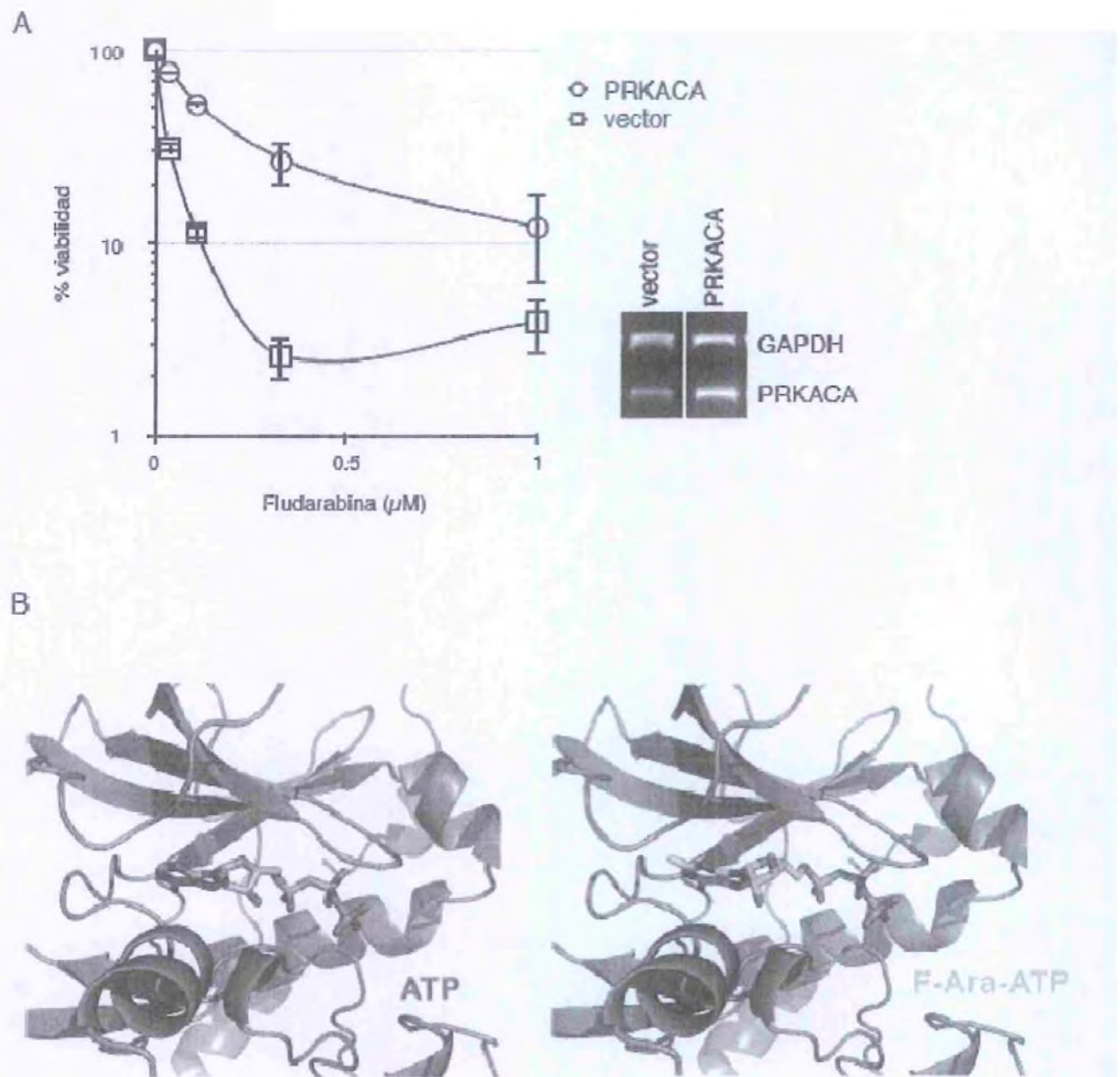


FIG. 11

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 gcacctctcc ctgccacagt caacgttttg tagtcatttg tgggattgat 60
tctgtgtttc catcagttga caactcctgg ctgggcacag tgactcacac ctgtaatccc 120
agcccttttg gaggtgagg tgagaggatc gcttgagccc aggagtttga gaccagcctg 180
ggcaacatgg agaaaccctg tctctacaaa aaataatttg ctagacatgt tggcacacac 240
cgttgtccca gctatttggg aggctgaagc aggaggattg cttgagccca ggagttcaag 300
gatgcagtga gccatgatgg cgccattgca ctccagcctg ggtaacagag ggaggccaga 360
ccctgtgtaa aaaaaaaaaa agtccaggcg caatggctca cacctgtaat cccaacactt 420
tgggaggccg aggtgggcag atcacctgaa gtcaggagtt taagaccagc ctggccaaca 480
tggtgaaatc ccgtctgtac taaaaataca aaaaaaggc tgggcgcagt ggctcacacc 540
tgtaatcca acactttagg agtccaagac gggtggatca cctgagggtca ggagttcgag 600
accagcctgg ccaacatggc gaaaccccat ctctactaaa aatacaaaaa ttagccgggc 660
atggtggtgg gcacctgtaa tcccagctac tcgggaggct gaggcaggag aatcgcttga 720
acccgtgagg cggagggttg agtgagccga gatcgacca ttgcacttca gcctgggcaa 780
cagagcaaaa ctccattaaa aaaaaatacc aaaaaaaaaa aaaagtttagc cgggtgtggt 840
ggtgtgtgcc tgtagtccca gctgcctggg atgctgaggc agaattgttt gaacccgaga 900
ggcagaagta aaaaaaagaa aactgagggc agagagcata ctttttgctc agtaaataca 960
tgatgcttgg gaatctttgt actaatgaca tcgaggcatg gctgtggcac tgctaaggcc 1020
taggatgtgt ctcccctagg ccgacgcccc caaccatcc ctcatcccag agactgatgc 1080
cgtgggtgtg actgtggtcc tcatcacctg cacctaccat ggacaggagt tcatccgagt 1140
gggctactac gtcaacaacg agtacctcaa ccctgagctg cgtgagaacc cgcccatgaa 1200
gccagatttc tcccagggtg ggcctgtttc cacttcctgc tcccacaag gccgttcttt 1260
atacttgggg ggagttcagc cattcaaatt gagagtcaag gtcacttctt aaggttttca 1320
agtaatatc agttcttaca gtactgtgtt agaagaggag aaaaagacct ttgtctctca 1380
aaggcatgtc ttagagaatt aagattaggc cagcctgggc aacatagtga gaccctgtcc 1440

ctaaccctcg	caaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aatgagccag	acatgggtgg	tgtgctctac	1500
tctggaggct	gaggtgggag	gatcgcttga	gcccaggagt	ttgaggctgc	agtgagctca	1560
gatcgtgcc	ctgcattcca	gcctgaccaa	cagagtgaga	ctgtccctta	aaaaaaaaaa	1620
gtcctgggcc	aggcacagt	gctcacgcgt	tgtaatccca	gcactttggg	aggccgaggc	1680
tgtaggatca	cctgaggtca	ggagtttgag	accagcctgg	ccaacatggt	gaaagcccgt	1740
ctctactaaa	aatacgaaaa	tgagccaggt	atggtgcctt	gcacctgtag	tcccagctac	1800
acaggaggct	gaggcaagag	aatcgcttga	acccggaagg	cagaggttgc	agtgagacga	1860
gatcacagca	ttgcactcca	gcctgggcaa	caaaagcaaa	actccgtctc	aaaaaataaa	1920
taaataaata	aataaataag	gtcctggcca	cagggtgtttt	ctggagttcc	atatgtaggt	1980
tgctcttgct	gggcttgaga	tgggtgattg	ggggtgtcct	ggctctatgg	gaccaaggag	2040
agggcgtagc	tacaaggggt	gacgttcctc	ttcctgcccc	agctccagcg	gaacatcttg	2100
gcctcgaacc	cccgggtgac	ccgcttccat	atcaactggg	acaacaacat	ggacaggctg	2160
gaggccatag	agaccagga	ccccctccctg	ggctgcggcc	tcccactcaa	ctgcactcct	2220
atcaagggct	tggggctccc	tggctgcac	cctggcctcc	tccttgagaa	ctccatggac	2280
tgcatctaac	tgcaggaacc	cagagtgtcc	cagcacgccg	ggaggggcaa	ccaggcctcc	2340
cagcgagtcc	tgcagggccc	atctagagga	ctttgggggc	catcagctgc	aatccaggtc	2400
tgtcaaaactc	agcccctagg	aaagaacagg	ccttgggtct	cccctagtcc	tggccagaag	2460
gatgatctcg	cttttcctct	acaggcctat	aagaagcagg	tacttcagtt	ctaaattctg	2520
acttgtgttc	ttttcgtctt	cataaattct	aactaaggcc	actgtgccac	tgtgcaccct	2580
tgagtaccat	tgatccaaag	ctttcccaca	gacctccctg	gcccacctag	aggctttctt	2640
ggtcagtgcc	tgtcaaggct	ccagtcctgc	tgagccaaag	gctttgtcat	tcctttctct	2700
tcctgtacat	ctgagcagac	ccactccagc	tttctggtgt	cacaggcggg	aatgttagtt	2760
agtaggtaga	cttagatccc	atttctgtcc	tgctcccagg	aagattctta	ggcctcttc	2820
aatccagcag	ccccctccag	aggtgtgatc	agcaggatgc	tgaggaacca	tgttgccctt	2880
cctgtcaatc	acagccacct	tcctgttatc	tcctaaatgg	atctggcttt	tcctggaggc	2940
tgccatgggt	ggaagatggt	atcagagggc	ctgcctgggc	agtctgtctc	cgggccaggg	3000
tcagggaccc	tctgcctctg	gcagccttaa	cctgtcctct	gctaggacca	gggtgatttc	3060
aagccaggga	agcaactggg	accctgaaaa	ctgtccctcc	ccagcccgtc	ccccctctct	3120
gtgccctggg	ccccttgctg	ccatgtggat	gctgttgtga	ttgctgtttg	tatattatca	3180
aaatgttttt	atattaaaaa	tgtttggtct	gaaaattaaa	agcacttcat	ttagaatgat	3240
tgtttgtgct	tttgtctctg	gtggactgaa	gcaactttgt	ccactctccc	ccagaagtgg	3300
cctcttgccc	tgtccagtgg	gttggctgtc	ccacgtcttc	tttccagctt	cctactccag	3360
tccttaattgg	ttctacagtt	gtattccaga	ctgaggttcc	aggagggggt	tttctttgtc	3420
aaaacttaaa	ccagctgtcc	tgcagataga	ttataatgag	tgatttttca	gactttgccc	3480

ttgacccaca	ggaaattaac	atcgtgatcc	caacacacaa	acagcaatgc	ttttattaaa	3540
ttttactaaa	ccttaccatg	tatctatcca	tccagaggcg	gagtggtcag	ccatttcccc	3600
atagttcaca	gaaaggctct	gactctccct	ccctggaact	gtggttgatc	tgggaacatg	3660
ggggcagaca	gcagctggag	aaggtggagg	ctattcaagt	cgaagcagca	gatcggcttg	3720
tagttaagcc	cagctagccc	ttccgagtcg	gggtgacctg	gcttctcccc	ttccctgacc	3780
ctctcttaag	tgcttctcaa	tcaggagcag	ttcggccccc	caagagcaca	ttcaccaatg	3840
tcaggagaca	gcggttgcca	cagccagcag	gaagatagag	gaggggctac	tggcatccag	3900
tgggtagagg	cgggggatgt	tgctcaacac	ccagtgggtg	acaagacacc	ccccagcaga	3960
aaatgatcca	gcctcaccgt	cagtagtgct	gcagttggga	aaccccgact	gtcctctgct	4020
aagtgtgtac	tgaaagagga	tcctgaagga	aggggcaggt	tcccttcgca	ttgccagac	4080
aggaaataca	gacggggaac	aggagcaggg	aatctgcctg	gctgtacccc	agattcctca	4140
tctgtgcaat	gggagtgatg	atggtagcac	ctacgcgatg	ggagtgtggt	gcgaaggagc	4200
gttaagtggg	tgccagctct	tactactggc	aggagcccag	ggctagggcc	cagcaaaggg	4260
gtggacactg	agcgccccct	cccagccacc	ccttgcgccg	ggcccggcat	cctcctgagt	4320
gcggctggga	aaacccagga	ggccccgcgg	cctggccccc	aagcaggcct	ggcctcggcc	4380
gcccagcgcc	aggccttatg	aatgacgccg	gcggcgggccg	ggcgacctct	gaccgcgcgc	4440
ccggccgcgc	ccctcccccg	ctggcaggtg	gacagcggct	gcgccgggca	ggccgcggcg	4500
ccaactccgg	ctggccgaca	gccgctgccg	cactgagcgg	gggcggggga	ctgcggcgcg	4560
cgcgggggccg	gccggggcgc	cgccggggcc	gcctcctgag	cctcggagcg	ctgcgcggcc	4620
gccagccagc	ctccgcgcgc	ccgccccgcc	ggccccggcc	cgcagactgc	gtctccgccc	4680
cgccctctca	cccccggtt	gacactgagc	gttctgctgg	ggggcttggc	ggaccggca	4740
cctccgcaa	tcggcggcct	cgcagggcgg	accccgggcc	cagtccagcg	tctcggcaa	4800
tcggagcgt	ctgcccgcgc	agctgcggcc	tcgcgagcga	gtgaatggcc	gagagtccgc	4860
ggtgcgtgtc	ccgaggctga	gagcctatag	tggcgcgga	aggtcgcggg	agggccaatg	4920
ggaggcggcg	ctgagccgtc	agtcagggcg	gcctaggcca	atgagcggcg	ggctgcgggg	4980
gcgtcacaga	cagcggcaga	gatcttgggc	tgaggttccc	gggcggggcg	gcgcggagag	5040
acgcgggaag	caggggctgg	gcgggggtcg	cggcgccgca	gctagcgcag	ccagcccagag	5100
ggccgccgcc	gccgccgccc	agcgcgtcc	ggggccgccg	gccgcagcca	gcacccgccg	5160
cgccgcagct	ccgggaccgg	ccccggccgc	cgccgccgcg	atgggcaacg	ccgccgccgc	5220
caagaagggc	agcgagcagg	agagcgggtga	gtgcccgggc	tgtgaccccg	atcttgggcc	5280
tgcgtgcca	gccctggcct	tgtccatcat	cgcttgccc	ctccccctac	ggggccctc	5340
atcctctctg	cctaccccc	agcgcctt	gccccggcct	gtccaaggct	ggggcccgcg	5400
ggccgcaga	gtacccctg	taggggtccc	cttcccctag	ggccgcccc	tgctgcaaag	5460
accgtgctcc	ccccagctg	tcactgcaa	ccatggcacg	tatgaccgct	ggggccccac	5520

atgggcccct	gtcaccagcc	tacccccctcc	tttcttgccc	cctcttccca	gattctaatac	5580
ccccacttc	ctcactcacc	tctctcacct	atgggatcct	ctgcctgacc	ccgaccagg	5640
tttctaccag	tttggaatg	cgatgaggtc	tgctgcctc	caccgcgcag	ggacctggc	5700
cacttgctga	ccacaccct	ccccctcca	gccccgcga	tctttctcct	gccctttccc	5760
tcttcacctt	agcacagccc	ccccttccaa	accctcctg	ccccctgaac	atttcccaga	5820
gccacctcca	gcattatatt	tttcttctgt	gtcacttggc	atgggggaca	ggatctttct	5880
gggtccctct	gcctctctca	tctgtcact	ctgtcattct	gctgctctgc	ttgtgctccg	5940
tcctccaagc	aagcgtctgt	ccctggctgg	ggtagcagac	tgtttatgaa	cgtagagaat	6000
tgcttcagtg	cttccaaagc	caagtttgag	ctggctctgt	tgggattcat	tgcatcctct	6060
ttcctgcgtt	ggggtaaggg	gggtgtggca	gagccccctc	tcatttctctg	tcttgcatgt	6120
agctctaggc	tccatggagg	gccccctaat	aaatggctgt	ttcacaactg	aggctccgtc	6180
attcaccag	tccctggggc	ttcttccacc	actcctggct	tgggatgaaa	agtgtctggg	6240
tttagcgagg	ttcattcggg	tctaactgag	atggtcagaa	agagcactgg	ggaggaggag	6300
gcagtcaaag	agagtaatgg	gtgacgtcta	gtgatttgc	ttgacgtcta	gtgattctga	6360
tcattcccag	ggctcagcca	gagagagacc	tgtttcaccc	acttgccac	acattagggt	6420
ggctctttcc	agccagccag	agaaagagat	tctctatctg	gaaataccat	cagaaatggg	6480
cttgaacccc	attcccaatt	tttacagctc	ttaaattggt	gtcactccag	tctgaaagct	6540
ggaaggcagc	tgggatcccc	tgtccactta	cccagaaata	gtcggaaacta	ttggctgaaa	6600
aggaaggcca	gtttttgggc	tcaaacccca	gcatctgagt	ttcctgaatg	ccccctccca	6660
gaaaggatat	aaagccaggg	aactttattc	ccatacggat	tcaaatagca	gaactcagag	6720
tcacagagcg	atcatgaaga	ggcctgacat	gtcaccaatg	ggtagggggct	ggggagggaa	6780
atgcctgtag	ctgagtgcct	gatgacagag	gagcaggtgg	gtagtgtcca	aaaaaggctc	6840
gggcatgagc	ttggagggga	cttggccggg	gggggaggag	tcaggccccc	agcaggtgag	6900
gccagctggg	aggtggaagg	tagaggcagg	cagctatata	ttgcggtagc	tcagttgaaa	6960
gttggggaga	tgacagtcct	ggaaaacctt	caaggctatc	agacacatgt	ggtaggggggt	7020
ggaaagccac	acaagaaaaa	ggatcccaag	aaaaagatca	gaggctctgg	aagggaaccac	7080
tgattctctc	agagcacagg	tcagacaccc	aggaatgaat	gatcatggta	aaatagagct	7140
actatttatt	gggcatctag	gctgtgccac	aggctaaatg	gccaggcgga	tagagatacc	7200
tactctggtg	actttcataa	cgggctgtta	tccaaatttt	ccaaaggagc	cctctggtag	7260
aaatgacatc	catgacatag	atgatgtcac	agaggcagga	ttcacatcca	gatccatcta	7320
ccagcaaact	tcttggaccc	cagaattccc	cgactttgac	atttttcagc	agcctcccag	7380
atttttactc	tatcatattt	tcttaattta	aaataataaa	agttttactc	acttgtgttc	7440
agatgtaaac	ttggagctca	ttctaaacaa	taatataaat	gaaatcatgg	gattgccatg	7500
ccagttatat	tttctctgat	acgcattaaa	tacagtgtaa	ctagataaat	gaaacatccc	7560

gaaaatcatg	tcatgttctg	ccaatgggac	tatgtcacac	gttgagaaac	gcccgaagct	7620
gtacttcctc	ccagaggctc	ccagagaagg	aaataagatg	aggaaggaag	tccctctttg	7680
ctttgaggcg	ctctgattct	gagaggatgg	agttagacaa	aatttgcctt	cttagaaggg	7740
tggggcaggg	gcaggggcag	tagccaggcc	agcctgcagg	gggcacctgg	atttcatctg	7800
ccagacgccg	gcccgactgg	ggtcaggaaa	atgcccaggc	cttgggaggc	accagttaag	7860
catcctgcag	tcccctgtgg	taccatctct	gtgccagggc	aggacagagt	ccgcctcctc	7920
ccaagaggcc	agggatccag	aatgaaccct	ggagtggagt	tgggggaatc	tacacccaaa	7980
gatggcaaag	ccattgggag	agctgagagg	gccaagaaaa	aagactaagg	cccaggctct	8040
ggccaagtgt	gaagaatgga	gagggagcag	cggccccagg	gggcaggcgc	ccaggtcaga	8100
cagccaagtg	gggctcaggt	cgtggctggc	actggctgaa	gatacccctg	ggagctggcc	8160
cacaggggaa	ggggcagagc	tagtaaaagg	gagccccga	tccccaggac	acaagcagat	8220
cctggcaaag	agagaaaagc	accccccaag	aagaccctag	atgggaagaa	ctagtgccgt	8280
gtaacatcct	atggatgcct	aagacggcca	aacaccttct	gtgccttggc	agttgtatgg	8340
gtgccaaga	ggctttatca	aggcagctct	ccccttagcg	caaccgcgtc	tacagaaact	8400
cggagggccc	tatctgtccc	tcctccacac	ccagtggcct	ctgggttggg	tttctcttcc	8460
tgctcccacc	ccacggctcc	ctagctcccc	ctgcaggcag	ggttctgggg	acagacagcc	8520
gaacagacac	ggcaggctct	atgagccttc	ccagccaccg	tagtgccggt	gccctgagaa	8580
caggactgag	tgatggcttc	caactccagc	gatggtgagg	ctgagtcctg	ttactatagc	8640
aacttcctag	gcacactctg	ccccttaagt	cagggagggg	ctgcagcggg	gtctggggca	8700
caggcgaaga	gaagaaggat	gtgaaccctt	ggctggccct	ggaaacgcct	cctgtacagc	8760
cccgggctgt	gcggcctggg	gaagagagag	gggatcgggt	gcccagttca	gacaagggag	8820
gatggtccac	ccggcagggg	gccagctcag	agaggggtgg	tggagtggtc	catcccagtg	8880
ttggggttca	gctcagactg	taggatgagc	catcccagtg	ttgggggtcca	gctcagaatg	8940
ggggctggtc	cagccagtgt	tgggggtccag	ctcagagttg	tgtcatttag	gtaagcccag	9000
agcagggaat	ccagggtcca	ctggaggaat	cagccagcct	cgagtagggg	gcccagccca	9060
ggctgggcat	tcctgcccc	gaattcccag	gacagccaga	tttcaaaagg	gcagaaggct	9120
tgagattgtt	gtccggagga	aggggggttct	gtggctgggc	tccttccgag	agagacccca	9180
agccccctgc	ccaaattgat	attctgctgt	tgcaattccc	cattcccagg	gcgagtttct	9240
agatttctgc	tttctgctgt	ggctcctggct	tttcaagggg	tgtcaaggag	ttttccctat	9300
gaacccaaat	ggaatctgga	ccagagttag	agctggcacc	ccccgtgtgg	gagatgtggg	9360
cagggcggca	ggctgtacag	gccagcagct	ggctgggtta	ccatcctctg	ccacttcctg	9420
ttgctagcag	gggtcctgga	tgccgggcac	actcaaagag	gctgccactg	accctctgct	9480
tcttttggga	tctggaaaga	aggaggaaga	tgggtcaaggc	tgccctcccc	tccccacccc	9540
ctgggttttag	ccgctcgttt	ccggttttga	ctttcatggc	cgagagtaga	gccaagcaca	9600

gggcaagggtt tgagagagggc caaggacatc ccgggatgcc tttccctctt ccacccccgc	9660
ataggagcaa aacaaaagag tcagatatac ccattttctc tctcaggata gcaggatttg	9720
ggggttccac attgaaaggg agttcagggg aggaggcagg gtggctcttg tcgcccccg	9780
ccccaagcct ttctctccag ctgttctttc agcgaattaa gggagctctg gggcctcttt	9840
agcccctaag gagtctctgg ctgttgccctg atcctgaacc ttaactcttt cccctctgcc	9900
cagtgggcac tgctctgggc acatcaggcg ctgtcctctg cacagtccag tgcccactga	9960
ggaaggcagg gcctggcgtc ctgggagcag tgaagtccgt ggaaagggaa gttagtttta	10020
tcgccccgcc ctggggcacg caggccagcc agagggacac cctcgggaga atcttcccat	10080
tgctcctgc caagggagcc ctctgcaaac cttggctagc ttggagcagg tacctttaaa	10140
agcttctgtg gcaaccagct cctcctccct ggtccctga ggccatcca aggaagctga	10200
cttagaggct ctgcgttttc ctggtttctc agcaaaagga agattccagg gagagccaa	10260
gggggctggg gatggatctg ggatcaggca gcagccaggg tggggacttg gagaccacct	10320
tccagctgtg gctgcagctg ctctctggg cccacctggc tgtacgtttc ctgggctacc	10380
tgaccgcac cttccggggg cctaagccac agccagcacc ctgagcctcc ctggccaggg	10440
ggcagaaggc cgccagatca ccccatccca cccacccttt attctaccct ttcttgaag	10500
agacaggaag cagaggtgag tgtggggcct cttgattgag gttacctgcc cctcccccc	10560
atcatccctc tctctgcctg ctctcctgg cactggcctc ccccatgccc catccccaaa	10620
tctgacaagc taacagggct agtggacca gaggggacag agcctgggcg ctctggctct	10680
ttgagaggcc agagaagggc catgctaaca gcaaggcacc ctgtggagcg actctgtggg	10740
gcaccagcgg acagccaggg gctgggagct cagcgagtcg gggaggtgca ggattcagca	10800
attctttcct ttttgctaag agcaaagggg aaacggacca gaccttttg attcccttca	10860
agcctggcac ctctctgcct tcttgtgtgg gtgaaggtag aatcccaaga gggcaccctc	10920
caccctcccc acccactgct gaattctgtg tggattattt ggaggtttcc aaggaagatg	10980
ttttctgtca caaaggttct atgactgaag ccaggcacag tggctcatgc ccgtaatccc	11040
agcactttgg gagactaagg tgggggaatc cattgaggcc agaagttgga gaccagcctg	11100
ggcaacatag caagacccca tctcaaaaaca aaataaaaaca ctcaaacaaa ggttctgcta	11160
gtgaaagtgt tggatttggt gtgaccccca ggctcaggcc cctgggctag ttggtggccc	11220
agccaggcac ccatctagga ctcttgcca ttcatcgct atccctctc cgcttggtca	11280
tttattgtgg ggccttcttg gccacggtct ctctccatct gccatctacc actttctttt	11340
tttttttttt gagacagagt ttactcttg ttgtccaggc tggagtgcaa tggcgcgatc	11400
tgagcccact gcaacctctg cctccggggt tcaagcaatt ctctgcctc agcctcctga	11460
gtagctggga ttacaggcat gtgccaccac gccagctaa ttttgattt ttagtagaga	11520
cagggtttct ccatgttggt caggctggc tcaaactccc aacctcagg gatctgcctg	11580
tctcagcctc ccaaagtgtg gggattacag gcgtgagcca ctgcaccag ccaccatcta	11640

ccacttttcta gctccatgag ggctcttctc tctgaatgct gagggaaagc tctggagaca	11700
ggtagtgggg gtggctcccc acaaggccat gtgggattac tggcaggcag ataaccagca	11760
atgccaaagg gcaagtgtac agggccctc ggtggcagca aaccaggaa catcaggggg	11820
ttgaaggcag ctctgtccac attggccacc ctggtgcact ggactcagca ctgaaaccaa	11880
tggctgagtt ggcagtgaag tagttaatct catgggatgt gggggcaggc aagtgacctc	11940
agacctgata agtcttctcc tctgtacagt ggggaataaca gcagctccca cccacaggg	12000
tgagaacgaa gcatagaaaa tactcagcaa ggggctggc ccttgtagcc ctaggtggtg	12060
gttaaaagga caagtcata atgcaagaat ctgtcaggct gcgcatttaa gatttgagca	12120
ctcagtgtat ctctatatatt tgtttttggg gtttttttat tattactttt ttttttgaga	12180
cagggcctca ctctgtcacc cagcctgcag tgtaatggct cagtcacggc tctactgcagg	12240
ctctatgtcc cgggcttgaa caatcctccc acctctgcct cctgagtagc tgggactaca	12300
ggtgcatacc accacacctg gctaattgtt ttattttttg tagagggtt tgatgttgtc	12360
caggctggc tcgaattcct gtattcaagc aatccccca actcggcctc ccagagtatt	12420
attatttttt tgagaaagag tctcactctt gctcaggctg gagtgtagt gtgtgatcat	12480
agctcactgc aacctcaatc tcctgggctt taagcaatct tcctgcctca gcctcctgct	12540
tagctgaaac tgcgggcatg ggccactatg ctgagctaatt tttttaattg ttttatTTTT	12600
tgtagagatt gggctcttgc atgttgccaa ggctggctc taattccagg cctcaagcga	12660
tcctccaacc tcggccttct aaagcactgg gattacaggc atgagccacc gttcccggct	12720
ctccctatgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtat atatatatat atatatatat atatatatat	12780
attttttttt tttttttttt tttttttttt gagacagagt ctactctgt cgcctaggct	12840
ggagtgcagt ggcatgatct cagctcactg taacctctgc ctccaagtt caagagattt	12900
tcctgccccca gcctcccaaa tagctgggat tacaggcatg cgccaccgtg cccagctaatt	12960
ttttgtattt ttagtagaga cggggtttca ccatgttggc caggctgggt tcaaactcct	13020
gacctcaagt gatctgcctg cctcggcctc ccaaagtgt gggattatag acgtgagcca	13080
ccatgcccga tcgctcccca tttttcttt tcttttttct tttttttttc ttagacgagt	13140
cttgctctgt caccaggct ggagtgcagt ggtgcaatct cggctcactg caacctcagt	13200
ctcccggatt caagcaattc tcctgcctca gcctcccagg tagctaggat tacaggcaca	13260
catcaccacc acgcctggct aatttttttg ttttgtttg gagacagagt ctgccccgt	13320
cgcctaggct ggagtgcaat ggcatgatct cagctcactg caacttctgc ctcccgggtc	13380
gaagcgattc tcctgccacc atgcccggct gatttttttg tacttttagt agaaacgggg	13440
ttttaccatg ttgaccacgc tggctcttgaa ctctgacct caagtgatct acccgcttg	13500
gcctcccaaa gtgctgggat tatagggtgtg acccaccgtg cctggcctca tttttttatt	13560
tttagtagag atggggtttc gccatgttgg ccaggctggt ctggaactcc tgacctgtg	13620
atccaccac cttggcctcc cagagtgtg ggattacaga cgtcagccac ctccaccagc	13680

ctctctcccc	atattttata	cctcaattta	gaaaataata	ggctgggcac	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	tgcaagtgagc	tgagattgtg	ccactgcact	ccagcctggg	13980
caacaaagtg	ggactccatc	tcaaaaaaaaa	aaataataat	aattaaaaaa	aataaattgg	14040
ccgggcatgg	tggctcacgc	ctgtaatccc	agcactttgg	gaggccgagg	cgggtggatc	14100
acgaggctag	gagatcgaga	ccatcctggc	taacacgggtg	aaacccccgtc	tccactaaaa	14160
aaaatacaaa	aaattctctg	ggcgtggtgg	caggcgtctg	tagtcccagc	tactcaggag	14220
gctgaggcag	gagaatggcg	tgagcacggg	aggcggagct	tgcaagtgagc	ggagattgcg	14280
ccactgcatt	ccagcctggg	cgacagaggg	agactccgtc	tcaatcaatc	aatcaatcaa	14340
tcagtcaata	gatagataaa	taaaaaataa	taatagctga	catttatctg	gcactatcat	14400
cacacggggc	caactgttcaa	ctccctttgt	caagatgaac	tcattcattc	ctcaaaacca	14460
ccccacttta	cagatgagga	aaactgaggc	ctagagaggt	gagatcagtt	acccaaagtc	14520
acagagttca	tcagagacca	ggctgggctc	tgaactggat	cttgacccca	agtcctggcc	14580
cttagccact	ttgctgggct	gtgtctcagc	agagacgaga	atgactgttt	tcaagcctgt	14640
ttcctggggt	gttaagtggg	gacaatggat	acaaggcagg	ttgccgagtg	agtcagatga	14700
gacagtgtag	acagcagccg	gcacaggggtc	tgccggggaa	gtttcaacat	tagccaggcg	14760
gtgatgttca	ccttggggata	ccatgggggcc	gaggagtggg	catcgggcca	gacttccctt	14820
gaaccagctc	tggagcaatg	cccttgcgat	tgccacggag	aggaacaggg	ccagctgggg	14880
gccaaaggta	cagctgagcc	ccccaaaggc	acctgctacc	cgagcccccg	aggcctccat	14940
cccaggcccc	gcctccccag	agaagggggc	agaggaacag	ccaaatccca	aggctataaa	15000
tacctcggtc	ggcgtcggcc	ctggccatgg	aatgtcgggtc	agaactgggg	cgagtggggg	15060
tgggctgggtc	tgccctgggca	cctccctccg	ttcccttgcg	agtgaccctt	gagactctct	15120
gtacccccact	ttggatggag	tggcagctgg	atccccacctc	tctgtagcaa	gggaggccca	15180
ggccacggcc	cagccaaggc	cccagaggca	ccagaaaaag	gtcaggctct	gggttggaac	15240
tgcacccac	tttccaccaa	gtatctcccc	agaaatcacc	tgaaccacc	ccggtgagac	15300
ggcgtctct	gtataactct	cccctctctc	cctttcagtg	aaagaattct	tagccaaagc	15360
caaagaagat	tttcttaaaa	aatgggaaaag	tcccgtctcag	gtaaggctgc	cgggtgcaga	15420
gcccaggagg	gggtgagctg	ctaacccccca	gcccctgggt	gtgtcccagc	aacacagcta	15480
gaatttcaga	aaccccatag	aaggcttcag	accctccccca	tttgtccctt	aggtgccccat	15540
gggggctcct	gtgtggagac	acctgactgc	ccaatgccag	gcacccccat	cccaccaccc	15600
ctcccaacgg	cccgccccctg	cccccagcac	agctgccagc	agcttccagg	ccccaggcca	15660
gggccggatc	tggccccctgc	cacccgcctt	aagggaatgtg	ccctctgcca	tcttgatttt	15720

ccgccccctg	tcctcacccc	gctgacccca	cgtgctcccc	ggggccccct	ctgccggtgg	15780
cagaggggat	gccccagacc	ttagccaagc	aggccgcggg	gagggcgtgc	cctgagccta	15840
ccgacccctc	tgcccacaga	acacagccca	cttgatcag	tttgaacgaa	tcaagaccct	15900
cggcacgggc	tccttcgggc	gggtgatgct	ggtgaaacac	aaggagaccg	ggaaccacta	15960
tgccatgaag	atcctcgaca	aacagaaggt	gaggtggcct	gtcctcgctc	agggcctgcc	16020
tgtcaggcct	ttgcctggac	tgtgcccact	ccttagagt	ccctatccac	ccgttcactc	16080
acttgctttt	ttttgattca	gagtctcgct	ctgtcgctca	ggctggagta	cagtggcgtg	16140
atctcggtc	actgcaacct	ccacctccct	agttcaagcg	attctcctgc	ctcagcctcc	16200
cgagtagctg	ggattacagg	cgcctgccac	cacaccagc	taatttttgt	atttttagta	16260
gagatgggtt	ttcgccatgt	tggccaggat	ggtttcgaat	tcctgacctc	aggtgataca	16320
cctgcctcag	cctcccaaag	tgctgggatt	acaggcgtga	gccaccgcgc	ctggccgctt	16380
ggtttttttg	tgggggacag	gacctcgctc	tgttgcccaa	gcaggaaagt	gcagtgcagt	16440
gatcatagct	cactgtagcc	tcaaactcct	gagctcaaga	gacctcctg	agtagctggg	16500
actacaagcg	cacactacca	tgcctggcta	attttttttt	gttgtttgtt	tgttttttgt	16560
tttagacagg	gggtcttgct	gtgttgccca	ggctggctct	gaactcctgg	cctcaagtga	16620
tctcctactt	cagcctccca	aagcacaggg	attacaggca	tgagccacca	tgccaggctc	16680
accactatt	ccccgagccc	ccataatgtg	ccagccccag	gggtcagaag	ggccctgtgc	16740
cgccttccca	aagctccctc	tccaggccgg	ccatggattc	aaagccaggc	actgtgacac	16800
agggtcagac	accagcccaa	caggaggaga	acaagagcac	tcttggggga	agtgggtgtt	16860
atgtgcactt	tcttcccgta	aatatttttg	tgatcggact	ttataaccagg	cactgctata	16920
aagcagcaat	gtaactagca	gaaatgtaac	ctgagccaca	gaagcaattt	taaattttct	16980
gtttgctcca	tcataaacag	taaaaacagc	caagcacggt	ggcgcacgcc	tgtagtccca	17040
gctactagac	aggctgaggt	gggaggatca	cttgaaccca	ggagttcaac	tccagcctcg	17100
acaacacagc	cagaccccat	ctctaaaaaa	acacccaaag	tttgtaatta	aaagagaaaa	17160
tgaagaaac	aggtgtcatt	catgaaattc	attttaatga	catgtttggg	gctttttttt	17220
atgttttttt	ttttttgaga	cagagtctca	ctcttgctgc	ccaggctgga	ctgcagtggc	17280
gtgatctcag	ctcactgcaa	cctccacctc	ccaggttcaa	gtgattctcc	tgctcagct	17340
tccaagtag	ctgggattat	gggtgccacc	accacgccc	gctaactttt	gtatttttag	17400
tagacttggg	gtttcaccat	gttggtcagg	ttggtctcga	actcctgacc	tcaggtaatc	17460
cgcgcgctc	agccttccaa	agtgtggga	ttacagatgt	gagccaccac	acctggccta	17520
atgatatgtt	ttaattaagc	cagtatatct	acagtattac	cctttccata	tattatcaat	17580
gtgaaaatat	cattaatgaa	acattttaca	ttccttttgt	ttttttccca	gtcctccatg	17640
acttcggaaa	tatttccttt	ttttctgtac	tgaagtatct	ttaaaatcca	gtgtctattg	17700
tatgcttaca	acagttctca	actctgatgg	taaatttttc	ctggaaagat	aagaaaaagc	17760

aggggaagttg	aaaaagcaga	ttcacatgcc	caagttgttc	caaccatgcc	tgaaagtcac	17820
cagtacctgc	atcaagagtt	taatttttgt	tttgttttgt	tttgttttgt	ttttgagatg	17880
gagtttcgct	cttgttgccc	aggctggagt	gcaatggcat	gatctcagct	cactacaacc	17940
tctgcctccg	ggtttcaagc	gattcttgtg	ctccagcctc	ctgagtagct	ggaattacag	18000
gcgcccggcta	ccacgcccag	ctaatttttt	aatttttttt	tttttttttt	ttgagatgga	18060
gtctcgctct	gtcgctcagg	ctggagtgca	gtggcacgat	cttggtcac	tgcaacctct	18120
gcctcccggg	ttcacgccat	tcttctgcct	cagcctcctg	agtagctggg	actacaggcg	18180
cccaccacca	cgctgggcta	attttttgta	tttttagtag	agatgggggt	tcaccgtgtt	18240
agccaggatg	gtctccatct	cctgaccttg	taatccaccg	gcctcggcct	cccaaagtgc	18300
tgggattaca	ggcgtgagcc	accacacctg	gccagttttt	aaatattttt	agtagagaca	18360
gggtttcacc	attttggcct	ggctggttgt	tgtttttttt	tttttttttt	tgagacggag	18420
tctcgctctg	ccaccaggc	tggactgcag	tgggtgtatc	tcagctcact	gccagctcca	18480
cctcccgggt	tcatgccatt	ctcctgcctc	agcctcccga	gtagcaggga	ctacaggcgc	18540
ccgccaccac	acccggctaa	ttttttgtgt	tttttagtag	gacgggggtt	caccatgtta	18600
gccaggatgg	tctcgatctc	ctgacctcgt	gatccacctg	cctcggcctc	tcaaagtgtc	18660
gggattacag	gcgtgagcca	ccgtacccgg	cctggttgtt	ttgtttttga	gacagggtct	18720
tgctctgttg	cccaggctga	agtgcagttg	ggctcaaagt	atcctcccac	ctcagcctct	18780
ggagctgctg	ggaccatagt	cgtgccatgc	ccagctaatt	gcttttgttg	tccttgttgt	18840
tgttttaga	gatgggggtct	cgctacattg	cccaggctag	tctcaaactc	ctgggctcaa	18900
gcgatttacc	tgcttgggcc	tcccaaagtg	ctgggattac	gggcgtgagc	caccatgccc	18960
agctggtgtc	agttttttaa	tttatatttt	agatacttaa	aatttttgaa	tttggtcccc	19020
catccgacca	gccatatttc	aaggggcccag	catccccctg	tggctaattg	ggactgaact	19080
gggtagggca	ggtatagact	ctgaggacac	agctatgtga	gcaaagcagt	tgacagctga	19140
ctgagggacc	aggctggcca	catgttacac	accagcctga	catcagccag	ctgtgtgacc	19200
ttggacaagt	cacctcccct	ctgtgtctgg	tcttccaaac	tggcgtactc	ccagcatggg	19260
cctctagggc	ttctatcctg	attcagtgag	agactgggtg	ccaggtgcct	gctcatggca	19320
tctgctatta	ggggacagct	gatggctgag	gagctgttag	cctgagggtc	aggttgctgt	19380
gtggagtgtt	ctagacaagg	gtaaggcagg	tcctaaacce	cccacctctt	gggcttctcc	19440
tgctgtcttt	ttcaattttca	gttcagctgc	cccttctctc	agaaagcgct	gtctgattcc	19500
cccttcccca	gaccacgcca	ggtactttac	atgggcttct	tgggggctgc	ttctccacaa	19560
cccaagata	ccctccacca	cggctctgac	ctctgtgggg	gtaaccatg	tattctttgc	19620
cctggactta	gtgccgtgca	aggacaagca	gcccctagcc	tccctgatgc	tgtgtcctca	19680
gcatcagcta	agggcccgc	aggccacagg	cacacaaatg	attctggctg	aaggaaccgg	19740
cctggctccg	gcatccctag	ttccaggcat	taggggaaat	gaggccctc	tcacctcccc	19800

ctcctttctg	ccctcccctc	cttcccttcc	caggtggtga	aactgaaaca	gatcgaacac	19860
accctgaatg	aaaagcgcat	cctgcaagct	gtcaactttc	cgttcctcgt	caaactcgag	19920
ttctccttca	aggtgggggtc	ccagtggcca	agggcggggg	gtcactgcat	tgggtcccag	19980
ccttctggcc	cccagggctg	gggtcggagc	tgaggacaat	cagtggctgc	tctcttttgt	20040
ggaagaacaa	gatcccttga	ggagggagat	caggggacag	gagtcaggct	gggactctgg	20100
tagacccaag	ttcagttcct	ggtccagcca	gtttgtagtt	cgataccctt	ggtgagtcac	20160
ccaacctcag	taacatccct	caaaagcagc	acctggttta	tggtaaagagc	ctgaccacag	20220
agcacaaact	ctgccccag	cagccgggggt	tcatttccca	gttcagtact	tcttgatgtg	20280
tggccccggg	caagagactt	atctcccaa	gcctcagctt	tctcatggta	aaatggggat	20340
cataccagtt	ccagcctggt	ggggttgtca	tgacagttcc	aggcacgtct	tgagcgccct	20400
ttgggagccg	ttttgggtgc	catccaaagc	tgtggtcatg	agaaacagga	aaggccactc	20460
agggccagct	tcatggacgt	ttgaccaga	gaagcacaag	ggcctgttct	ccgagggacc	20520
ccacacctgg	tttaacgctt	tgctgctgct	gctgtcttga	gatccgtaat	aatttttttt	20580
tgttgagaca	gagtctcact	ctgttgctca	ggctggagag	cagtggcgca	atcttggtct	20640
actacaacct	ctgcctcctg	ggttcaagca	attctcctgc	ctcagcctcc	tgagtagcgg	20700
ggattacagg	tgcccaccac	catgcccagc	ttatgtttgt	attttttagta	gagacaggat	20760
tttgccatgt	tgctcaggct	ggtcttgaac	tcctgacctc	aagtgatctg	cctgccttgg	20820
cctcccaaag	tgctgggatt	acaggcatga	gccactgtgc	caagcctaata	ttttattttt	20880
tttattgaga	cagagtttgg	ctgttggtgc	ccaggctgga	gtgcaatgat	gcgatctcag	20940
ctcaccacaa	cctctgactc	ctgggttcaa	gcaattcttc	tgccctcagcc	tcccagtag	21000
ctgggattac	aggcatgtgc	catcacatct	ggctaatttt	gtatttttta	gtagagacag	21060
ggtttcccca	tgttggtcag	gctggtcttg	aactcctgac	ctcaggtgat	ctgcctgcct	21120
cgacctcca	aagtgtctgg	attgcagggtg	tgagccgtgc	ccggccattt	tgttttgttt	21180
tgtttaagat	aaggtcttac	cctgttgccc	aggctggagt	gcagtggcgc	aattacagct	21240
cacaaccttt	gcctcccagg	ctcaagcaat	cctccacct	cagtctcctg	agtatgagac	21300
tacaggtgca	cgccatgatg	cccagctaata	ttttgtattt	ttgcagagac	ggggtctcac	21360
tatgttgccc	aggctggtct	caaactccta	ggctcaagtg	atccaccac	cttggcctcc	21420
caaagtactg	ggattataca	ggcatgagcc	accacaccg	accctctgta	ataatttttt	21480
aaccaggggc	catctttttt	attctgggccc	ccactaattc	tgcagcctat	catgatccca	21540
ttttacagat	gacaaaactg	tggcctcaga	gccttactca	agctcccaga	gcaagggtact	21600
acagagttct	ctctccagcc	aaggcaggct	aaccagggtcc	tgacatacct	ctgagccagc	21660
cctcactttc	acccattaac	agcaggataa	gggtcgcccc	tgtagaacat	gattcctaca	21720
gggagccagg	atcgctgttg	tcatttaatg	tttgaacacc	agccggggag	gcccccaagg	21780
ccttcagatc	gggtccaagt	ctcaggggtg	ggcccttgac	cagccactgc	ttcccacagg	21840

acaactcaaa cttatacatg gtcattggagt acgtgcccgg cggggagatg ttctcacacc	21900
tacggcggat cggaagggtc aggttaagcgg gccaccccc atcacatcag gctgtcaggg	21960
tgtccacagg tggcagtgcg cgaccaagcc ccctgggaat gcagaggagt ccagcatact	22020
tcaacatgca ggtgggtctc cagaccctgt gggtttctgt ttcccctctg ctgaggaata	22080
tgtgatattt caaccaccac aaaacaaaac agagcaaaca gggcaactta ggtgtccaaa	22140
ctgaagttgc tgccaggcac ggtgggtctc accagtaatc ccagcacttt gggaggccaa	22200
ggtgggcaga tcacctgagg tcaggagttt gagaccagcc tggccaacat ggcaaaaccc	22260
tgtctccact aaaaatacaa aactgagctg ggcattggtg tgggcacctg taatcccagc	22320
tacttgggag gctgaggcag gagaatcact tgaaccagg agacagagggt tgcagtgagc	22380
caagatcaca ccaactgtact ccagcctggg tgagagagt acatgccgtc tcaaaaaaaaa	22440
aaattgaagt tggtgatttt gtgcattttt tgagcccaa aaggtggcat gcatctgtag	22500
tcccactagt cctgaggctg aggtgagaag atcatttgag ctcaagaatt tgagaccagc	22560
ctgggctgca tagtgagggt ttgtctcttt taaaaaaaa aaattggctg ggcgcagtgg	22620
ctcgtgcctg taatcctaga actttgggag gccgaggcgg gcggatcacg aggtcaggag	22680
atcaagacca tcctgggtta catggtgaaa ccccgctctt actaaaaaaaa taaaaaaaa	22740
ttagccgggt gtgatggcgg gcgcctatag tcccagctac tcgggagggt gaggcagaat	22800
ggcgtgaacc cgggaggcgg agtttgagc gagccgagat gcgcgacctg cacttcagc	22860
ctgggtgaca gagcgagact ccgtctcaaa aaaataaaat aaaaattata ctattatttt	22920
attttatata ggtggacagt tttatatgtg tagattttta tatatatattt tatacataaa	22980
ataaatctat atacagaaat ttgtaagttt aagatacagg ctgggtactg tggctcatgc	23040
cctataatcc cacttgggga ggccaagggt ggagattgc tagagcccag gaatttgaga	23100
ccagccttac atagcaagac cccatctcta caaaaaata caaaaaaaa aaaaaaagt	23160
cagggtgtgtt ggcacattcc ttagtccca gtcctgggg aggctgagggt gggagatca	23220
cctgagtctg ggagggtcaag actgcatgag cccaccttca tccctaggat gcaaggctgg	23280
ttcaacatat gcaaaaaaaaa aaaaagactg cataagccgt gatcacgctg ctgcagtcca	23340
gactgggttg taaccagtc agaccctgct gaaagaaaa aaaaattttt aacttataaa	23400
tttgtcttat taacttataa gtttacatac gtagttttat ttgattttat tttttgagac	23460
agagtttcac tcttgtcacc caggctggag tgagtgaggc cgatctcggc tccatgcaaa	23520
ctctgcctcc cgggttcaag tgattctctt gtctcagcct cccaagtagc tgggactaca	23580
ggtgcatgcc ccttgcctg gctaattttt gtatttttag tagagatggg gtttcacat	23640
gttggccagg ctggtctcga actcctgacc tcagggtgat cggccccccc gccttggcct	23700
ctcaagatgc tgggattaca ggcattggcc accgcgctgg ccttgtagtt gtattttaga	23760
tagataacta tagattcact ttacatacaa caaatgcac agttcttcaa tgttccatgc	23820
tacaagtttt gacagttgta tatagctacc taacctccac ccaaacagat atatggaact	23880

tttctatcac	ctaagaaaat	tcccttgaat	cccttttttt	tttttttttt	tttccaataa	23940
catacagagg	tggaggcccg	gtgccatggc	tcacgcctgt	aatcccagca	ctttgggagg	24000
ccgaggcggg	cgaatcacia	ggtcaggagt	tcgagaccag	cctgaccaac	atggtgaaac	24060
cccgtctcta	ctaaaaatat	aaaaattagc	cgggcgtggg	ggtgcacacc	tgtaatccca	24120
gctactcagg	aggctgaggc	aagagaatca	cttgtttcca	ggaggcaaag	gttgacgtga	24180
gccgagatta	tgccattgca	ctccagcctg	ggcaagagag	cgagactgtc	ttaaaaaaaa	24240
taaattaatc	aaaaaaaaat	atatatatat	atatacacac	acacacacat	atctacatac	24300
atacagaggt	gaggctctgc	ctatatggcc	caggctgggtc	tcgaactcct	gggctcaagc	24360
gatcttccca	cctcgacccc	ccaaaatgct	gggattacag	gggtgagcca	ccgcaccggg	24420
ccgaatccct	ctcttgacac	gtcacctccc	caccaaaggc	agttgtcctt	tctgacttca	24480
aacaccgtgc	ctttgttttg	tctgggcgtg	gacatgatat	aaatggaatc	attcatgttc	24540
ttttgtgtct	tcttttgctt	aacataatca	gtttgaaatg	cagccacatt	gttgagtggg	24600
tgcattgggt	gtcctgttgg	cgggtggtgg	ggtgagtggg	attccattgt	atgactatag	24660
ctcagtctgt	gattccattt	tcctgtggat	ggaccacag	gctgtttccc	atgtcgggct	24720
atctaagaat	cagggtgcctt	gcgtttctga	cggctggact	ggagggtgtc	tcctctgggg	24780
taggctctgc	agggccacct	gctggaccat	tttggggcat	gaccactgac	gttcacctcc	24840
ccatttgtcc	ccatcagtga	gccccatgcc	cgtttctacg	cggcccagat	cgctctgacc	24900
tttgagtatc	tgcactcgct	ggatctcatc	tacagggacc	tgaagccgga	gaatctgctc	24960
attgaccagc	agggctacat	tcagggtgcc	accaggccgg	gcgaggggca	gccctgggga	25020
agccgtggcc	tggacccttc	ctccctgcca	actgcctggt	cttgtgcca	cagggtgacag	25080
acttcggttt	cgccaagcgc	gtgaagggcc	gcacttggac	cttgtgcggc	accctgagt	25140
acctggcccc	tgagattatc	ctgagcaaag	taggagcctc	cccagccctc	cccttcccc	25200
gaggccggct	ctgctctcct	gctctgcct	cctcctcacc	ctgtgcccc	ccatcttgtc	25260
ccagggctac	aacaaggccg	tggactggtg	ggccctgggg	gttcttatct	atgaaatggc	25320
cgctggctac	ccgcccctct	tcgcagacca	gcccattccag	atctatgaga	agatcgtctc	25380
tgggaagggt	aggtccggat	gtggggacac	agccctggaa	gaaacagacc	gttcctgtct	25440
cacccatcct	attccctggg	gagccctgct	tggtgtcaga	ataatctaga	agttccttaa	25500
gtcaggccag	gtggtgaagc	tggacgcgcc	ggccacactg	aggccaacac	ctcaagcccc	25560
cttgctgtcc	agccccaacc	ccgcggttcc	agaatcccat	gggcttccaa	aatcccagac	25620
ctcacgggaa	catcttggcc	acagaacaca	aaccgccctg	ccagacgacc	ctccttttcg	25680
ctcctcatcc	cagttagtgt	gagttttcgc	aaattccaag	gcagaaaaac	gaatgtattt	25740
ggttcctgtt	cccagggtgt	gtccatagcc	tcaccagga	ttgccctcac	ttagcattta	25800
tagcccatgc	ttcctctccc	aaaccagac	ttgcctaact	ctgagggttc	agatgagggg	25860
tggtgaagcc	atctcagctc	acatctatga	cagggtgcaa	gtgccacca	tccaccaggc	25920

cccagaatcc	ccatcagtca	caccctgaga	tagtggcacc	ctctgtagga	gaggtgagga	25980
aacaggctgg	gaaaagggat	gtgtcttggc	caagatcaca	ctttgggtgag	taggtaatca	26040
ccgtaggcaa	tcattgtagg	cactgatggc	cggagagagg	ttggggaccc	cacctctgcc	26100
ctcagctcaa	ccaccttgct	gggaagaccc	gaccatcccc	cgacttggtc	cagcatctcc	26160
tacacaggag	cttttggttg	gcccggagtc	atgacactgt	ggtgggagca	ccctcaggct	26220
cagcctgggc	cccagtccca	gctctgccac	cgactggctt	tgaaactttg	gggctgggta	26280
caatggctca	cacctgtaat	gccagcacct	tgggaagtgg	aggcttgagg	ccaggagttc	26340
cagaccagcc	tgggcaacat	agccagaccc	catctctaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaca	26400
ctggccgggc	gcggtggctt	acacctgtaa	tcccagcact	gtgggaagcc	aaggcgggca	26460
gatcacctga	ggtcgggagt	tcgagaccag	cctgactaac	atggtgaaac	tccgtctcta	26520
ctaaaaacac	acacaaaaaa	aattagctgg	gtatagtgg	gggcgcctgt	aatcccagct	26580
acttgggagg	ctgaggcagg	agaatcactt	gaacccagga	ggcggagggt	gcagtgagcc	26640
aagatcacac	cattgtactc	cagcctgggc	aacagggcag	gactctgtct	caaaaaaaaa	26700
aaaaaaaaaa	aaaaactaaa	aattagctgg	gcgtgatgg	gcacccctgt	gttcccagct	26760
catcgggagg	gtgaggcagg	aggatcgctt	gagcccagaa	gtgagctgtg	agctgtgatt	26820
gcatcactgc	agtctagcct	gggtcacaga	gccagaccct	gtcttttaaa	aaaattcagg	26880
caagtggggg	gccccagctg	gacacatagc	atcactaaaa	gagaaagatg	aaggccaggc	26940
gcggtggctc	acacctataa	tcccagcatt	ttgggaggcc	aaggcagggt	gatcacgagg	27000
tcaggagtgc	aagaccagcc	tggctaacat	ggtgaaaccc	tgtctctact	aaaaatacaa	27060
aaattagctg	ggcgtgggtg	cgggtgcctg	taatcccagc	tactcgggag	gctgaggcag	27120
agaactgctt	gaacccggga	gacagagggt	gtagtgagcc	gagattgcgc	cactgcactt	27180
cagcctgggt	gacagagcaa	gactctgtct	caaaaaaagg	gaaagatgag	gcatctgcca	27240
ccggaccaaa	agaaactgcc	aagaaaatgg	cccagagttg	gccgggtgtg	gtggctcacg	27300
cctgtaatcc	cagcactttg	ggaggccgag	gcgggcggat	cacgaggcca	ggagttaag	27360
accagcctga	ccaacatgg	gaaaccccg	ctctactaaa	aatacaaaaa	ttagccggat	27420
atggtggcac	acacctgtaa	tcccagctac	tcaggagtct	gaggcaggag	aatcacttga	27480
aaccgggagg	cagagggtgc	agtgagctga	gattgtgcca	ctgcactcca	gcctgggcaa	27540
cagagcaaga	ctccatctca	aaaaaaaaaa	agaaaaaaag	aaaaaaaaat	gtcccagagt	27600
gggaaaaaaa	agaaagaaaa	aaacacagaa	gatccccacag	gagaagatgc	acatgactcc	27660
cttctttgta	gcattttcta	gttccccgc	accgtcagtg	gtattatctc	cctcgtgcag	27720
ccctggcata	tctgccccac	atctgagagg	catgcgcagg	cccagagagg	ttaagggcca	27780
tggccaagg	cacacagcgt	gtaagaggca	cagcaggaac	aagaagtcgt	ttcttgcaac	27840
tataactcca	gtgatgactt	gcatacaagg	cgtgggctca	gagggtttgg	ggaaaacttt	27900
caagaagagt	tgagctgggc	tttaaagaac	ggaagagcct	tagctatgca	gaaagagagg	27960

agagaaaaag	tttgtcataa	gcaagaatat	ttcagaagtc	tccagacccc	agcagagatg	28020
ccttaagcag	cagcagcagc	agctgagaat	gcaagttcta	gagtccagta	gacctgagat	28080
ggaattgccc	catcacacac	ctcaatgtga	cctaggaaga	gctgtttaac	ccaagcctca	28140
gtttcccctt	ctctgaaatg	gaaatcatca	tagcacttgc	cttagagcaa	tggttcttaa	28200
aagggacccc	tttccagcag	caccattgct	ggggaatttg	ttagaaatgc	agattcttgg	28260
gccaggcacg	gtggctcaca	cctgtaatcc	caacactttg	ggaggccaag	gcaggtggat	28320
cacctaaggt	caagagttca	agaccagcct	gaccaatatg	gtgaaacccc	gtctctacta	28380
aaaatacaaa	aattagccag	gtgtcttggc	gtgagcctgt	aatcccagct	actcaggagg	28440
ctgagacagg	agaattcctt	gaaccagga	ggcggagggt	gcagtgagcc	cagatcgcac	28500
cactgcactc	cagcctgggc	tacagagtga	ggctatTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	28560
ttcaaaaaaa	gaaatgcaga	ttcttgctgg	gtgtgggtggc	tcacgcctat	aatcctagca	28620
ctttgggagg	ccaaagcagg	aggatcgctt	gagcctagaa	gttcaagacc	agcctgggca	28680
acgtagtgag	accctgtctc	tacaaaaact	tcttaaaata	actaactctt	gaatttttaa	28740
agtttttaaa	gaaatgcaga	ttctcaggcc	acagtatcag	acttcctaaa	ttggaaactg	28800
tagggtaggc	tcaaggagct	gttttacaag	atgctggcag	gcactctgct	ttggaggccc	28860
acaccagta	ggaccgttgg	atggagaaa	aagcatcatg	ggcttcccaa	gttcagacc	28920
agcttccac	cctgtccttg	tacccttcc	tccaggtgcg	cttcccttcc	cacttcagct	28980
ctgacttgaa	ggacctgctg	cggaacctcc	tgcaggtaga	tctcaccaag	cgctttggga	29040
acctcaagaa	tgggggtcaac	gatatcaaga	accacaagtg	gtttgccaca	actgactgga	29100
ttgccatcta	ccagaggaag	gtgggcctcc	cctccttaag	cctgctgagg	gtttgggagc	29160
aggccaagag	tcagggagga	cagccaatag	agaaatagag	aagagaacac	aggttcagga	29220
gcaacctaga	gtagagagct	tagagcagtg	gggtctagaa	atgggattct	ggggtcattt	29280
ggccattcca	tgaccttggt	caacagatgc	ctctctctgg	gaagtaattt	cccctttgat	29340
gagttgtac	attaagagtt	tcgggctgtt	aagaggaatc	cataacctaa	tggtaaagcac	29400
aggcctgagt	cagagtaa	atctcttgaa	tgtaggcca	ttcgatttta	ttgttgta	29460
aatgattatg	ttgaatgctg	aggctctgggt	gattcttgat	ccctctccag	gtggaagctc	29520
ccttcatacc	aaagttaaa	ggccctgggg	atacagta	ctttgacgac	tatgaggaag	29580
aagaaatccg	ggctccatc	aatgagaagt	gtggcaagga	gttttctgag	tttaggggc	29640
atgcctgtgc	ccccatgggt	tttctttttt	cttttttctt	ttttttggtc	gggggggtgg	29700
gaggggttga	ttgaacagcc	agagggcccc	agagttcctt	gcattctaatt	tcacccccac	29760
cccacctcc	agggttaggg	ggagcaggaa	gccagataa	tcagagggac	agaaacacca	29820
gctgtcccc	ctcatcccc	tcacctcct	gccccctctc	ccacttttcc	cttcctcttt	29880
ccccacagcc	ccccagcccc	tcagccctcc	cagcccactt	ctgcctgttt	taaacagatt	29940
tctcaactcc	agtcagacca	ggtcttgctg	gtgtatccag	ggacagggtg	tggaagagg	30000

ggctcacgct taactccagc cccacccac acccccatcc caccacaacca caggccccac	30060
ttgctaaggg caaatgaacg aagcgccaac ctctctttcg gagtaatcct gcctgggaag	30120
gagagatttt tagtgacatg ttcagtgggt tgcttgctag aattttttta aaaaaacaac	30180
aattttaaaat cttattttaag ttccaccagt gcctccctcc ctcttctctc tactcccacc	30240
cctcccatgt cccccattc ctcaaatacca ttttaaagag aagcagactg actttggaaa	30300
gggaggcgct ggggtttgaa cctccccgct gctaatactcc cctgggcccc tccccgggga	30360
atcctctctg ccaatcctgc gaggggtctag gcccttttag gaagcctccg ctctcttttt	30420
cccaacaga cctgtcttca cccttgggct ttgaaagcca gacaaagcag ctgcccctct	30480
ccctgccaaa gaggagtcac cccccaaaaa gacagagggg gagccccaag cccaagtctt	30540
tcctcccagc agcgtttccc cccaactcct taattttatt ctccgctaga ttttaacgtc	30600
cagccttccc tcagctgagt ggggagggca tccctgcaaa agggaacaga agaggccaag	30660
tcccccaag ccacggcccc ggggtcaagg ctagagctgc tggggagggg ctgcctgttt	30720
tactaccca ccagcttccg cctcccccat cctgggcgcc cctcctccag cttagctgtc	30780
agctgtccat cacctctccc ccactttctc atttgtgctt ttttctctcg taatagaaaa	30840
gtggggagcc gctggggagc caccctatc atccccgtat ttccccctct cataacttct	30900
ccccatcca ggaggagtcc tcaggcctgg ggtggggccc cggtgggtg cgggggcgat	30960
tcaacctgtg tgctgcgaag gacgagactt cctcttgaac agtgtgctgt tgtaaacata	31020
ttgaaaact attaccaata aagttttgtt taaaaaaaaa gtgtcgctgg tgttctcgac	31080
ttcgatcacc caccacaca cccccagggg gttggaaagg gaatttcgga cccagcgtg	31140
caggccgatc aggtcctggc ttgaagtcct tgtaaccagg gtttagctga aattccggca	31200
ctccttcggc cccgcaggag aaacgagcgt caaactgccc ttgaccca gattcgggg	31260
ccccaaatct gcggcgccg ccctcggcgt ccagcccggg accgagaggg cgctctaggg	31320
aggcgctggg gctggcgccg caggaggccg agcggcgccg ggggcggccc tggcagggg	31380
agtagaaggg ggagaggggtg cgcgcccccc ttcccgcatc ctgagcgccg ggccaggcgc	31440
gcctgagggg cgcgggggcg gcggcagcag gaggtcccc gcagaccct gcgagcgcg	31500
cagccccggc ccgcgggcgg cgagttcccg gtaagtgcgg tcccagagagc ggagcgcgct	31560
ggagaggcgt ggagaggggg gctgggcgcc ggggacgtct ggggtcccgcg cccaatggct	31620
ggagggcggc cgagcgccgc ccgcccgcc tgcccgccct ctctccactc cccccggcac	31680
tccccctccc ctccccgcc cgccgtttc ccccgcccc gcccgggcc aactccgcgg	31740
cgcctcctta aaaagcgccg gggagttgta agggggggcc ggagcgagcc ggagtgaagc	31800
agagcgaggg gtaaaggggg cgggcggggg gcccgggctc caccttaaaa gcgggcgcgt	31860
gggggtggga gggaggaagg cgggcggcgg ggaggaggga gggaggggaag gaaggggggc	31920
cggagtgtcc cgggcgcagg gcgcgcgtgc ggcggcgccg gcggcgggga ggggccggcc	31980
gcgcccgcgt cccctcctcc ccctcgcatc cccggccccg cgcgcgcca gcagaagcgg	32040

```

gtctgtgtgt gcgtgcgtgc gactgagtga gtgtgtgcat atttttttct ctcttttctt 32100
tctctctcac tgttttttcc tctctctctc tctccctctc tctctctttt tttttttttt 32160
ttttttgcaa agaaacagca gcgccgccgc cgctccgccg aggcgctgcg cccccgggg 32220
ggggaggcgg aggaggcggg cagcggcgga gggaggggag ccggggaggg gggcgccgcg 32280
ctgggagggg ggcagcgcg acggtgcagc cgggccgggc gggaggcatg gcggggcccc 32340
cggccctacc cccgccggag acggcgggcg ccgccaccac ggcggccgcc gcctcgctgt 32400
ccgccgcttc cccgcactac caagagtgga tcctggacac catcgactcg ctgcgctcgc 32460
gcaaggcgcg gccggacctg gagcgcatct gccggatggt gcggcgggcg cacggcccgg 32520
agccggagcg cacgcgcgcc gagctcgaga aactgatcca gcagcgcgcc gtgctccggg 32580
tcagctacaa ggggagcatc tcgtaccgca acgcggcgcg cgtccagccg ccccggcgcg 32640
gagccacccc gccggccccg ccggcgccgc cacagcagca gcagccgccg ccgccgcagc 32700
cacagccgcc gccggagggg ggcgcgggtg gggccggcgg cgcgggcgcg cccgtgagcc 32760
tgcgggaagt cgtgcgtac ctcgggggca gcggcgggcg cgcggtcgc ctaaccgcg 32820
gccgcgtgca ggggctgctg gaggaggagg cggcggtcgc aggcgctctg gagcgaccc 32880
gtctcggagc gcttgcgctg ccccgcgggg acaggcccgg acgggcgccg ccggccgcca 32940
gcgcccgcc gtctcgagc aaggtgagcg cgccggggag cgggggcgcc gcgcggtggg 33000
caggtgcggg cgaagtgtgt ggcggggggc cgagtcccg gaggaactgg gtggcggggtg 33060

```

```

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

```

```
<400> 2
```

```

Met Gly Asn 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

```


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 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 gggaagcttg 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
 ggcaacccat cctggcacct 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador diseñado para amplificar el gen Bcl-XL
 <400> 10
 ctgcgtagc atgagttggc 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador diseñado para amplificar el gen MMP-9
 <400> 11
 cggagcacgg agacgggtat 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador diseñado para amplificar el gen MMP-9
 <400> 12
 tgaaggggaa gacgcacagc 20

<210> 13
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador diseñado para amplificar el gen Neor
 <400> 13
 gactgggcac aacagacaat cggct 25

<210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador diseñado para amplificar el gen Neor
 <400> 14
 tgatattcgg caagcaggca tcgcc 25



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 TÉCNICA

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 micrnas 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 micrnas 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.