



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 338 490**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **07823868 .0**

(96) Fecha de presentación : **27.09.2007**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2066807**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **10.06.2009**

(54) Título: **Procedimiento de diagnóstico *in vitro* de carcinoma broncopulmonar mediante detección de transcritos mayoritarios alternativos del gen *KLK8* que codifica kalicreína 8 y su utilización para el pronóstico de supervivencia.**

(30) Prioridad: **28.09.2006 FR 06 53983**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.05.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.05.2010

(73) Titular/es: **bioMérieux S.A.**
Chemin de l'Orme
69280 Marcy l'Etoile, FR
Université François Rabelais de Tours

(72) Inventor/es: **Ainciburu, Mireille;**
Courty, Yves;
Jolivet-Reynaud, Colette y
Planque, Chris

(74) Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de diagnóstico *in vitro* de carcinoma broncopulmonar mediante detección de transcritos mayoritarios alternativos del gen *KLK8* que codifica kaliceína 8 y su utilización para el pronóstico de supervivencia.

La presente invención se refiere al ámbito de la oncología. Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de diagnóstico *in vitro* del carcinoma broncopulmonar primitivo en un paciente ser humano, mediante determinación de la presencia, más allá de un umbral predeterminado, de un transcrito mayoritario del gen *KLK8* de kaliceína 8 en una muestra biológica procedente de este paciente.

El carcinoma broncopulmonar primitivo es la primera causa de muerte por cáncer en el hombre y esto en todos los países desarrollados. Datos recientes muestran un claro aumento de la incidencia en las mujeres. Se estima el número de nuevos casos al año en 25.000 en Francia y en más de 160.000 en los Estados Unidos, conllevando la muerte anual de aproximadamente 22.000 individuos en Francia y 155.000 en los Estados Unidos. A nivel mundial, el carcinoma broncopulmonar sería responsable de aproximadamente 900.000 muertes cada año, lo que correspondería aproximadamente al 18% de las muertes por cáncer. La etiología principal del carcinoma broncopulmonar es el tabaquismo. Aproximadamente el 90% de los carcinomas bronquiales en el hombre y aproximadamente el 50% en la mujer son atribuibles al tabaco. Otros factores ambientales o profesionales también pueden reconocerse en la carcinogénesis bronquial.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) distingue los carcinomas bronquiales microcíticos (CBM), que representan aproximadamente el 20% de los casos, y los carcinomas bronquiales no microcíticos (CBNM) que agrupan, entre otros, los carcinomas epidermoides, adenocarcinomas, y carcinomas macrocíticos, y que representan aproximadamente el 80% de los casos. Los carcinomas epidermoides y los adenocarcinomas son los cánceres más extendidos.

Hoy en día, el diagnóstico del carcinoma broncopulmonar se realiza esencialmente mediante radiografía pulmonar y escáner torácico. Una endoscopia bronquial que permite la realización de biopsias confirma a continuación el diagnóstico. Por desgracia, los síntomas evocadores son desafortunadamente tardíos y poco específicos, y el diagnóstico interviene de forma tardía, reduciendo de este modo en gran medida la eficacia y la factibilidad de los tratamientos existentes. Además, este tipo de diagnóstico requiere un material eficaz y personal cualificado, lo que es costoso.

Actualmente están disponibles diferentes métodos de tratamiento: cirugía, quimioterapia, radioterapia. Estos tratamientos pueden realizarse, de manera aislada, o de manera secuencial o combinada.

La tasa de supervivencia del cáncer de pulmón depende en gran medida del grado de diseminación del tumor en el momento del diagnóstico. La tasa global de supervivencia a 5 años es del orden del 15%. Esta tasa enmascara sin embargo disparidades importantes. La tasa de supervivencia de los pacientes que tienen un cáncer metastatizado a distancia durante el diagnóstico es inferior al 5%, mientras que los pacientes cuyo carcinoma "no microcítico" (CBNM) está localizado en el momento de su descubrimiento presentan tasas de supervivencia próximas al 50%¹. Estos últimos son tratados esencialmente mediante resección quirúrgica del tumor, enfoque que, por el momento, representa la única solución curativa para este tipo de cáncer. Sin embargo, menos de un paciente de cada 3 puede ser objeto de dicho tratamiento y un paciente de cada 2 tratados mediante cirugía fallece en los meses siguientes a la operación, después de una recidiva tumoral. Los avances recientes en el campo de la quimioterapia moderna del CBNM permiten prever tratamientos adyuvantes o neo-adyuvantes que mejoran la esperanza de vida de los pacientes operados². Dichos tratamientos no son, sin embargo, anodinos con una tasa de mortalidad asociada no despreciable. En este contexto, es importante poder identificar a los pacientes operables que presentan un alto riesgo de muerte por recidiva, para facilitar la decisión de aplicar o no una quimioterapia neo-adyuvante o adyuvante.

Desde hace años se investigan y estudian marcadores que permitan distinguir las células tumorales de las células sanas para todos los cánceres y particularmente del carcinoma broncopulmonar. Estos permitirían diagnosticar precozmente la enfermedad, establecer su pronóstico y su sensibilidad al tratamiento, y supervisar su evolución. En los últimos años, más de 100 candidatos se han sugerido como marcadores moleculares de diagnóstico del carcinoma broncopulmonar. Los estudios han previsto de este modo, el papel de diagnóstico de proto-oncogenes, de factores implicados en el ciclo celular, apoptosis o angiogénesis. Sin embargo, pocas correlaciones entre los resultados obtenidos mediante diferentes técnicas y de validaciones entre diferentes cohortes de pacientes pudieron obtenerse de acuerdo con la técnica empleada (inmunohistoquímica, dosificación inmunológica, chips de ADN que utilizan diferentes algoritmos) y la gran diversidad de tumores (tipo histológico, estadio, grado de diferenciación).

Otros marcadores, que pertenecen a una sub-familia de serina proteasas, las kaliceínas, de las que se enumeran 15, también se han ensayado. De este modo, en un estudio con chips de ADN, el gen *hKLK11* se ha identificado como marcador de los adenocarcinomas endocrinos de tipo C2³. Un estudio similar mostró que los genes *hKLK5* y *hKLK10* se sobre-expresan en los carcinomas epidermoides⁴. Del mismo modo, se ha mostrado que los genes *hKLK5* et *hKLK7*, que codifican respectivamente las proteínas hK5 y hK7, estaban sobre-expresados en los tejidos tumorales de carcinomas epidermoides, mientras que una sub-expresión del gen *hKLK7* en los tejidos tumorales se observa generalmente en los pacientes que presentan un adenocarcinoma⁵. Sin embargo, no se ha podido establecer ningún vínculo entre la expresión diferencial de estos genes *hKLK* y un pronóstico vital para los pacientes aquejados de un carcinoma broncopulmonar.

Los genes de las 15 kaliceínas presentan características comunes, entre ellas la presencia de varios transcritos para el mismo gen. Los transcritos de estos genes también se han estudiado como marcadores. De este modo, se ha indicado que tres transcritos alternativos de los genes *hKLK4*⁶, *hKLK5*⁷, un transcrito del gen *hKLK7*⁷ estaban sobreexpresados en tumores y/o en líneas celulares ováricas comparativamente al tejido no canceroso.

Se conoce que el perfil de expresión del gen *hKLK8* da lugar a al menos 4 transcritos diferentes, llamados NT1 a NT4. El transcrito NT1 o “neuropsina de tipo 1”, identificada por Yoshida S. *et al*⁸, codifica una preproenzima de 260 aminoácidos que contiene un péptido señal de secreción de 28 aminoácidos y un prosegmento muy corto de 4 restos que debe escindirse para liberar la forma activa de la kaliceína 8. El NT1 está considerado como la forma regular de expresión del gen. El transcrito NT2 o “neuropsina-T2”, identificado por Mitsui S. *et al*⁹, se diferencia de la forma NT1 por la inserción de una secuencia que codifica 45 aminoácidos suplementarios en la región carboxi-terminal del péptido señal. Los transcritos NT3 y NT4 fueron identificados por Magklara A. *et al*¹⁰ y codifican proteínas que contienen respectivamente 119 y 32 restos. La forma proteica predicha a partir de NT3 solamente posee una parte del péptido señal de kaliceína 8 y no conserva la zona de escisión de éste. La proteína predicha a partir de NT4 está constituida por los 23 primeros restos del péptido señal de kaliceína 8 y por 9 restos suplementarios sin identidad con kaliceína 8. Magklara A. *et al*¹⁰ mostraron que, aunque la forma regular de expresión del gen *KLK8*, NT1, tenga un valor de pronóstico en el marco del cáncer de ovario, las formas NT3 y NT4 no tienen ningún valor.

Los Solicitantes han demostrado ahora de forma sorprendente que los transcritos mayoritarios alternativos del gen *KLK8* que codifica kaliceína 8, seleccionados entre NT3 y NT4, en una tasa elevada, eran un buen marcador de diagnóstico, y particularmente de pronóstico desfavorable, en el marco de los carcinomas broncopulmonares, y en particular de los carcinomas bronquiales no microcíticos.

De este modo, la presente invención tiene como primer objeto un procedimiento de diagnóstico *in vitro* del carcinoma broncopulmonar, particularmente del carcinoma bronquial no microcítico, *caracterizado porque* comprende o consiste en la etapa de detección, en una muestra biológica procedente de un paciente sospechoso de estar afectado por dicho carcinoma broncopulmonar, de al menos uno de los transcritos mayoritarios alternativos del gen *KLK8* de kaliceína 8.

El procedimiento de la invención permite, por lo tanto, establecer un diagnóstico en el marco del carcinoma broncopulmonar mediante un simple ensayo que consiste en detectar los transcritos mayoritarios alternativos del gen *KLK8*, particularmente en una tasa elevada.

Por transcrito alternativo del gen *KLK8*, se entiende los productos de transcripción del gen *KLK8*. Dichos transcritos son tales como se han descrito anteriormente y se denominan, particularmente, NT1, NT2, NT3 y NT4. Como se observará a continuación, los Solicitantes han descubierto dos nuevos transcritos denominados NT5 y NT6.

Por transcrito mayoritario, se entiende los transcritos producidos en su mayoría a partir del gen de expresión de kaliceína 8. De acuerdo con una realización, los transcritos mayoritarios alternativos del gen *KLK8* se seleccionan entre los transcritos NT3 y NT4.

Por tasa elevada de transcrito mayoritario, se entiende una tasa superior a un valor umbral determinado.

Se sabe que, de forma general, los resultados de los ensayos de detección de analitos dependen en gran parte de las características de los socios de unión utilizados. De este modo, por ejemplo, en el caso de la detección de ARN mediante hibridación con sondas nucleotídicas, los resultados dependen en particular de las características de tamaño, de composición y de porcentaje de complementariedad de las sondas, y estas características influyen sobre los valores medidos con estas sondas. Se comprende por lo tanto que no es posible dar valores umbral precisos y que pueden determinarse valores umbral adaptados a cada socio de unión utilizado en cada caso, mediante sencillos experimentos rutinarios.

Es preciso comprender bien que en este documento se le llama valor umbral ya sea un valor discreto, ya sea un intervalo de valores correspondiente a una zona de indeterminación. Por supuesto, cuando el valor medido está incluido en el intervalo de indeterminación, o está muy próximo al valor umbral en el caso de un valor discreto, no se puede llegar a una conclusión definitiva y es conveniente realizar investigaciones suplementarias.

Las muestras biológicas en las que se emplea el procedimiento de la invención son cualquier muestra biológica susceptible de contener transcritos mayoritarios alternativos del gen *KLK8*. Como ejemplo de dichas muestras, pueden mencionarse las muestras sólidas tales como el tejido procedente de la biopsia del tumor, de ganglios linfáticos, metástasis del paciente, fluidos biológicos tales como la sangre, suero, plasma y expectoraciones, y las células purificadas a partir de estas muestras sólidas o líquidas.

Se entiende por detección de transcrito, en particular del transcrito mayoritario alternativo, la detección directa del transcrito, o la detección indirecta del transcrito, o cualquier otro procedimiento de determinación de la presencia de un ARN en una muestra, conocido por el experto en la materia.

Por detección directa del transcrito, en particular del transcrito mayoritario alternativo, se entiende la demostración de la presencia de dicho propio transcrito en la muestra biológica.

La detección directa del transcrito mayoritario alternativo en la muestra biológica puede realizarse mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia, como por ejemplo mediante hibridación con un socio de unión específico del transcrito mayoritario alternativo, llegado el caso después de amplificación mediante la técnica de PCR o NASBA.

Por hibridación, se entiende el proceso durante el cual, en condiciones apropiadas, dos fragmentos nucleotídicos se unen mediante puentes de hidrógeno estables y específicos para formar un complejo de cadena doble. Estos puentes de hidrógeno se forman entre las bases complementarias Adenina (A) y timina (T) (o uracilo (U)) (se habla de enlace A-T) o entre las bases complementarias Guanina (G) y citosina (C) (se habla de enlace G-C). La hibridación de dos fragmentos nucleotídicos puede ser total (se habla entonces de fragmentos nucleotídicos o de secuencias complementarias), es decir que el complejo de cadena doble obtenido durante esta hibridación comprende únicamente enlaces A-T y enlaces C-G. Esta hibridación puede ser parcial (se habla entonces de fragmentos nucleotídicos o de secuencias suficientemente complementarias), es decir que el complejo de cadena doble obtenido comprende enlaces A-T y enlaces C-G que permiten formar el complejo de cadena doble, pero también bases no unidas a una base complementaria. La hibridación entre dos fragmentos nucleotídicos depende de las condiciones operatorias que se utilizan, y particularmente de la rigurosidad. La rigurosidad se define particularmente en función de la composición en bases de los dos fragmentos nucleotídicos, así como por el grado de emparejamiento erróneo entre dos fragmentos nucleotídicos. La rigurosidad también puede estar en función de los parámetros de la reacción, tales como la concentración y el tipo de especies iónicas presentes en la solución de hibridación, la naturaleza y la concentración de los agentes desnaturantes y/o la temperatura de hibridación. Todos estos datos son bien conocidos y las condiciones apropiadas pueden ser determinadas por el experto en la materia. En general, de acuerdo con la longitud de los fragmentos nucleotídicos que se desea hibridar, la temperatura de hibridación está comprendida entre aproximadamente 20 y 70°C, en particular entre 35 y 65°C en una solución salina a una concentración de aproximadamente 0,5 a 1 M. Una secuencia, o fragmento nucleotídico, u oligonucleótido, o polinucleótido, es una sucesión de motivos nucleotídicos unidos entre sí mediante enlaces éster fosfórico, caracterizada por la secuencia informativa de los ácidos nucleicos naturales, susceptibles de hibridarse a un fragmento nucleotídico, pudiendo contener la sucesión monómeros de estructuras diferentes y obtenerse a partir de una molécula de ácido nucleico natural y/o mediante recombinación genética y/o mediante síntesis química. Un motivo se deriva de un monómero que puede ser un nucleótido natural de ácido nucleico cuyos elementos constitutivos son un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada; en el ADN el azúcar es la desoxi-2-ribosa, en el ARN el azúcar es la ribosa; Según sea ADN o ARN, la base nitrogenada se selecciona entre adenina, guanina, uracilo, citosina, timina; o bien el monómero es un nucleótido modificado en al menos uno de los tres elementos constitutivos; como ejemplo, la modificación puede intervenir a nivel de las bases, con bases modificadas tales como inosina, metil-5-desoxicidina, desoxiuridina, dimetilamino-5-desoxiuridina, diamino-2,6-purina, bromo-5-desoxiuridina o cualquier otra base modificada capaz de hibridación, a nivel del azúcar, por ejemplo la sustitución de al menos una desoxirribosa por una poliamida¹¹, o incluso a nivel del grupo fosfato, por ejemplo su sustitución por ésteres particularmente seleccionados entre difosfatos, alquil- y aril-fosfonatos y fósforotioatos.

Los socios de unión específicos del transcrito mayoritario alternativo son cualquier socio susceptible de unirse al transcrito mayoritario alternativo. Como ejemplo, pueden mencionarse las sondas nucleicas, los cebadores de amplificación, y cualquier otra molécula capaz de unirse al transcrito mayoritario alternativo.

Por sonda de hibridación, se entiende un fragmento nucleotídico que comprende de 5 a 100 motivos nucleicos, particularmente de 10 a 35 motivos nucleicos, que posee una especificidad de hibridación en condiciones determinadas para formar un complejo de hibridación con el material específico de un gen diana. En la presente invención, el material específico del gen diana puede ser una secuencia nucleotídica comprendida en un ARN mensajero procedente del gen diana (se habla entonces de ARNm específico del gen diana), una secuencia nucleotídica comprendida en un ADN complementario obtenido mediante transcripción inversa de dicho ARN mensajero (se habla entonces de ADNc específico del gen diana), o incluso una secuencia nucleotídica comprendida en un ARN complementario obtenido mediante transcripción de dicho ADNc, tal como se ha descrito anteriormente (se hablará entonces de ARNc específico del gen diana). La sonda de hibridación puede comprender un marcador que permite su detección.

Se entiende por cebador de amplificación, un fragmento nucleotídico que comprende de 5 a 100 motivos nucleicos, preferentemente de 15 a 30 motivos nucleicos que permite el inicio de una polimerización enzimática, tal como particularmente una reacción de amplificación enzimática. Por reacción de amplificación enzimática, se entiende un proceso que genera múltiples copias de un fragmento nucleotídico mediante acción de al menos una enzima. Dichas reacciones de amplificación son bien conocidas por el experto en la materia y pueden mencionarse particularmente las siguientes técnicas:

- PCR (Reacción en cadena de la polimerasa [*Polymerase Chain Reaction*]), tal como se describe en las patentes US 4.683.195, US 4.683.202 y US 4.800.159,
- LCR (Reacción en cadena de la ligasa [*Ligase Chain Reaction*]), expuesta, por ejemplo, en la solicitud de patente EP 0 201 184,
- RCR (Reacción de reparación en cadena [*Repair Chain Reaction*]), descrita en la solicitud de patente WO 90/01069,

- 3SR (Replicación de secuencia autosostenida [*Self Sustained Sequence Replication*]) con la solicitud de patente WO 90/06995,
- NASBA (Amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico [*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*]) con la solicitud de patente WO 91/02818, y
- TMA (Amplificación mediada por transcripción [*Transcription Mediated Amplification*]) con la patente US 5.399.491.

Cuando la amplificación enzimática es una PCR, el reactivo específico comprende al menos 2 cebadores de amplificación, específicos de un gen diana, y que permiten la amplificación del material específico del gen diana. El material específico del gen diana comprende entonces preferentemente un ADN complementario obtenido mediante transcripción inversa de ARN mensajero procedente del gen diana (se habla entonces de ADNc específico del gen diana) o un ARN complementario obtenido mediante transcripción de ADNc específico de un gen diana (se habla entonces de ARNc específico del gen diana). Cuando la amplificación enzimática es una PCR realizada después de una reacción de transcripción inversa, se habla de RT-PCR.

Por detección, se entiende un método físico, o un método químico con un agente colorante intercalante tal como SYBR® Green I o bromuro de etidio, o un método de detección con ayuda de un marcador. Existen muchos métodos de detección para la detección de los ácidos nucleicos¹²⁻¹³.

Por marcador, se entiende un indicador capaz de generar una señal que se puede detectar. Una lista no limitante de estos indicadores comprende las enzimas que producen una señal detectable por ejemplo por colorimetría, fluorescencia o luminescencia, como peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; los cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminescentes o colorantes; los grupos de densidad electrónica detectables mediante microscopía electrónica o por sus propiedades eléctricas como la conductividad, mediante métodos de amperimetría o de voltimetría, o mediante mediciones de impedancia; los grupos detectables mediante métodos ópticos como difracción, resonancia del plasmón superficial, variación del ángulo de contacto o mediante métodos físicos como espectroscopía de fuerza atómica, efecto túnel, etc.; las moléculas radiactivas como ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I.

La sonda de hibridación puede ser una sonda llamada de detección. En este caso, la sonda llamada de detección está marcada por medio de un marcador tal como se ha definido anteriormente. Gracias a la presencia de este marcador, puede detectarse la presencia de una reacción de hibridación entre una sonda de detección dada y el transcrito a detectar.

La sonda de detección puede ser particularmente una sonda de detección de tipo "molecular beacons" (sondas fluorescentes)¹⁴. Estas "molecular beacons" se vuelven fluorescentes durante la hibridación. Estas poseen una estructura de tipo varilla-bucle y contienen un fluoróforo y un grupo "quencher" (inhibidor de fluorescencia). La fijación de la secuencia de bucle específica con su secuencia complementaria de ácido nucleico diana provoca un desenrollado de la varilla y la emisión de una señal fluorescente durante la excitación a la longitud de onda conveniente.

La sonda de hibridación también puede ser una sonda llamada de captura. En este caso, la sonda llamada de captura está inmovilizada o es inmovilizable en un soporte sólido mediante cualquier medio apropiado, es decir directa o indirectamente, por ejemplo mediante covalencia o adsorción. Como soporte sólido, pueden utilizarse materiales de síntesis o materiales naturales, eventualmente modificados químicamente, particularmente los polisacáridos tales como los materiales a base de celulosa, por ejemplo papel, derivados de celulosa tales como acetato de celulosa y nitrocelulosa o dextrano, polímeros, copolímeros, particularmente a base de monómeros de tipo estireno, fibras naturales tales como algodón, y fibras sintéticas tales como Nylon; materiales minerales tales como sílice, cuarzo, vidrios, cerámicas; látex; partículas magnéticas; derivados metálicos, geles etc. El soporte sólido puede estar en forma de una placa de microvaloración, de una membrana como se describe en la solicitud WO-A-94/12670, de una partícula. También pueden inmovilizarse sobre el soporte varias sondas de captura diferentes, siendo cada una específica de un transcrito diana. En particular, puede utilizarse como soporte un biochip sobre el que pueden inmovilizarse gran número de sondas. Por biochip, se entiende un soporte sólido de dimensión reducida en el que se fija una multitud de sondas de captura en posiciones predeterminadas. El concepto de biochip, o chip de ADN, data de principios de los años 90. Este concepto se basa en una tecnología multidisciplinar que integra la micro-electrónica, la química de los ácidos nucleicos, el análisis de imágenes y la informática. El principio de funcionamiento se basa en un fundamento de la biología molecular: el fenómeno de hibridación, es decir el apareamiento por complementariedad de las bases de dos secuencias de ADN y/o de ARN. El método de los biochips se basa en el empleo de sondas de captura fijadas sobre un soporte sólido sobre las que se hace actuar una muestra de fragmentos nucleotídicos diana marcados directa o indirectamente con fluoróforos. Las sondas de captura se sitúan de manera específica sobre el soporte o chip y cada hibridación da una información particular, en relación con el fragmento nucleotídico diana. Las informaciones obtenidas son acumulativas, y permiten por ejemplo cuantificar el nivel de expresión de un gen/transcrito o de varios genes/transcritos diana. Después de la hibridación, el soporte o chip se lava, y los complejos de ADNc o ARNc marcados/sondas de captura se revelan mediante un ligando de gran afinidad unido, por ejemplo, a un marcador de tipo fluoróforo. La fluorescencia se lee, por ejemplo, mediante un escáner y el análisis de la fluorescencia se trata informáticamente. Pueden mencionarse a título indicativo, los chips de ADN desarrollados por la compañía

Affymetrix ("Accessing Genetic Information with High-Density DNA arrays")^{15,16}, para los diagnósticos moleculares. En esta tecnología, las sondas de captura son generalmente de tamaños reducidos, alrededor de 25 nucleótidos. Otros ejemplos de biochips se dan en muchas publicaciones^{17,18,19,20,21} o en las patentes US-A-4.981.783, US-A-5.700.637, US-A-5.445.934, US-A-5.744.305 y US-A-5.807.522. La característica principal del soporte sólido debe ser conservar las características de hibridación de las sondas de captura en los fragmentos nucleotídicos diana al tiempo que se genera un ruido de fondo mínimo para el método de detección.

Para la inmovilización de las sondas sobre el soporte, se distinguen tres grandes tipos de fabricación.

Existe, en primer lugar, una primera técnica que consiste en un depósito de sondas presintetizadas. La fijación de las sondas se realiza mediante transferencia directa, por medio de micropipetas, de micro-puntas o mediante un dispositivo de tipo chorro de tinta. Esta técnica permite la fijación de sondas de tamaño que varía entre algunas bases (5 a 10) y tamaños relativamente importantes de 60 bases (impresión) a varios cientos de bases (micro-deposición).

La impresión es una adaptación del procedimiento utilizado por las impresoras de chorro de tinta. Ésta se basa en la propulsión de esferas de fluido muy pequeñas (volumen < 1 nl) y a un ritmo que puede alcanzar 4000 gotas/segundo. La impresión no implica ningún contacto entre el sistema que libera el fluido y la superficie sobre la que se deposita.

La micro-deposición consiste en fijar sondas largas de varias decenas a varios cientos de bases en la superficie de una lámina de vidrio. Estas sondas se extraen generalmente de bases de datos y se presentan en forma de productos amplificados y purificados. Esta técnica permite realizar chips denominados micromatrices [*microarrays*] que portan aproximadamente diez mil puntos [*spots*], llamados zonas de reconocimiento, de ADN sobre una superficie de poco menos de 4 cm². No hay que olvidar, sin embargo, el empleo de membranas de Nylon, llamadas macro-matrices [*macroarrays*], que portan productos amplificados, generalmente por PCR, con un diámetro de 0,5 a 1 mm y cuya densidad máxima es de 25 puntos/cm². Esta técnica muy flexible es utilizada por muchos laboratorios. Se considera que esta última técnica forma parte de los biochips. Puede depositarse, sin embargo, en el fondo de la placa de microvaloración cierto volumen de muestra en cada pocillo, como es el caso en las solicitudes de patente WO-A-00/71750 y FR 00/14896, o depositar en el fondo de una misma placa de Petri cierto número de gotas separadas entre sí, de acuerdo con otra solicitud de patente FR00/14691.

La segunda técnica de fijación de las sondas sobre el soporte o chip se denomina síntesis *in situ*. Esta técnica conduce a la elaboración de sondas cortas directamente en la superficie del chip. Esta técnica se basa en la síntesis de oligonucleótidos *in situ* (véase particularmente las solicitudes de patente WO 89/10977 y WO 90/03382), y está fundamentada en el procedimiento de los sintetizadores de oligonucleótidos. Ésta consiste en desplazar una cámara de reacciones, en la que se desarrolla la reacción de elongación de oligonucleótidos, a lo largo de la superficie de vidrio.

Finalmente, la tercera técnica se denomina fotolitografía, que es un procedimiento originalmente de los biochips desarrollados por Affymetrix. También se trata de una síntesis *in situ*. La fotolitografía se deriva de las técnicas de los microprocesadores. La superficie del chip se modifica mediante la fijación de grupos químicos fotolábiles que pueden ser activados por la luz. Una vez iluminados, estos grupos son susceptibles de reaccionar con el extremo 3' de un oligonucleótido. Al proteger esta superficie mediante máscaras de formas definidas, pueden iluminarse y, por lo tanto, activarse selectivamente las zonas del chip en las que se desea fijar uno u otro de los cuatro nucleótidos. La utilización sucesiva de máscaras diferentes permite alternar ciclos de protección/reacción y, por lo tanto, realizar sondas de oligonucleótidos sobre puntos de aproximadamente varias decenas de micrómetros cuadrados (μm²). Esta resolución permite crear hasta varios cientos de miles de puntos sobre una superficie de varios centímetros cuadrados (cm²). La fotolitografía presenta ventajas: masivamente paralela, permite crear un chip de N-meros en solamente 4 x N ciclos. Todas estas técnicas son, por supuesto, utilizables.

La muestra biológica utilizada para la detección directa del transcrito mayoritario alternativo, susceptible de contener el transcrito mayoritario alternativo como tal, puede estar constituida por fluido biológico o un tejido procedente de la biopsia del tumor de ganglios linfáticos o de las metástasis del paciente en cuestión.

Para detectar el transcrito de la muestra biológica, generalmente es necesaria una etapa de extracción. Éste también puede detectarse sin extracción en cortes de tejido mediante técnicas de hibridación *in situ*. La extracción se realiza mediante todos los protocolos de extracción y de purificación de ácidos nucleicos bien conocidos por el experto en la materia. A título indicativo, la extracción de ácidos nucleicos puede realizarse mediante:

- una etapa de lisis de las células presentes en la muestra biológica, para liberar los ácidos nucleicos contenidos en las células del paciente. Como ejemplo, pueden utilizarse los métodos de lisis tales como los descritos en las solicitudes de patente:
 - WO 00/05338 sobre la lisis mixta magnética y mecánica,
 - WO 99/53304 sobre la lisis eléctrica,
 - WO 99/15321 sobre la lisis mecánica.

ES 2 338 490 T3

El experto en la materia podrá utilizar otros métodos de lisis bien conocidos, tales como los choques térmicos u osmóticos o las lisis químicas mediante agentes caotrópicos tales como las sales de guanidio (US 5.234.809).

- una etapa de purificación, que permite la separación entre los ácidos nucleicos y los otros constituyentes celulares liberados en la etapa de lisis. Esta etapa permite generalmente concentrar los ácidos nucleicos, y puede adaptarse a la purificación de ARN. Como ejemplo, pueden utilizarse partículas magnéticas eventualmente revestidas de oligonucleótidos, mediante adsorción o covalencia (véase a este respecto las patentes US 4.672.040 y US 5.750.338), y de este modo purificar los ácidos nucleicos que se fijan sobre estas partículas magnéticas, mediante una etapa de lavado. Esta etapa de purificación de los ácidos nucleicos es particularmente interesante si se desea amplificar posteriormente dichos ácidos nucleicos. Una realización particularmente interesante de estas partículas magnéticas se describe en las solicitudes de patente: WO-A-97/45202 y WO-A-99/35500. Una realización particularmente interesante de estas partículas magnéticas se describe en las solicitudes de patente de sílice en forma de columna, o en forma de partículas inertes²² o magnéticas (Merck: MagPrepTM Silica, Promega: MagneSilTM Paramagnetic particles). Otros métodos muy extendidos se basan en resinas de intercambio iónico en columna o en formato de partículas paramagnéticas (Whatman: DEAE- Magarosa)²³. Otro método muy pertinente pero no exclusivo para la invención es el de la adsorción sobre soporte de óxido metálico (compañía Xtrana: matriz Xtra-BindTM).

Cuando se desea extraer específicamente los ARN de una muestra biológica, puede realizarse particularmente una extracción con fenol, cloroformo y alcohol para eliminar las proteínas y precipitar los ARN con etanol al 100%. Los ARN pueden precipitarse entonces mediante centrifugado, lavarse y resuspenderse.

El fluido biológico puede necesitar un tratamiento particular. El transcrito mayoritario alternativo puede encontrarse en éste en solución o contenido en células tumorales circulantes. Si la búsqueda del transcrito alternativo apunta a la fracción contenida en las células tumorales, entonces, el fluido biológico se tratará previamente para aislar las células tumorales circulantes contenidas en dicho fluido.

Por aislar las células tumorales circulantes, se entiende obtener una fracción celular enriquecida en células tumorales circulantes.

El tratamiento del fluido para aislar las células tumorales circulantes puede realizarse mediante clasificación celular en un citómetro de flujo, mediante enriquecimiento en Ficoll, mediante enriquecimiento con perlas magnéticas recubiertas de anticuerpos específicos, o mediante cualquier otro método de enriquecimiento específico conocido por el experto en la materia.

Las células tumorales circulantes pueden aislarse gracias a una técnica de separación celular en Ficoll asociada a un agotamiento de las células sanguíneas utilizando anticuerpos anti-CD45 acoplados a perlas magnéticas (DynaL Biotech ASA, Noruega).

La detección directa del transcrito mayoritario alternativo puede realizarse entonces directamente a partir de células tumorales circulantes aisladas del fluido biológico. Por ejemplo, las células tumorales circulantes depositadas sobre una lámina por citocentrifugado pueden ponerse en contacto con una sonda específica del transcrito mayoritario alternativo para realizar una hibridación *in situ*.

Un ejemplo de método indirecto consiste en traducir *in vitro* los ARN extraídos de las muestras de proteínas, por ejemplo con ayuda de sistemas de expresión tales como *E. coli*, y después detectar el producto de traducción específica del ARN alternativo mediante un ensayo inmunológico tal como los ensayos de "sándwich", por ejemplo ELISA, o competitivos. Estos métodos son ampliamente conocidos por el experto en la materia y utilizan particularmente anticuerpos monoclonales y/o policlonales como socio específico de unión del péptido traducido del ARN.

El procedimiento de la invención puede emplearse mediante las etapas que consisten en:

- i) determinar la cantidad de transcrito mayoritario alternativo en la muestra biológica,
- ii) comparar la cantidad de transcrito mayoritario alternativo en la muestra biológica con un valor umbral predeterminado, seleccionado de acuerdo con el tipo de dosificación utilizado y representativo del límite de detección de la patología y
- iii) establecer el diagnóstico.

La cuantificación de la concentración de transcrito mayoritario alternativo puede realizarse mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia para cuantificar un marcador en una muestra biológica, tal como utilizando un ensayo de hibridación, como se ha descrito anteriormente.

También como se ha indicado anteriormente, se sabe que, de forma general, los resultados de los ensayos de detección de los ácidos nucleicos dependen en gran parte de las características de los socios de unión utilizados, de forma que no es posible dar valores umbral precisos y que pueden determinarse valores umbral adaptados a cada socio de unión utilizado en cada caso, mediante sencillos experimentos rutinarios.

ES 2 338 490 T3

El procedimiento de diagnóstico de la invención se puede mejorar incluyendo también una etapa suplementaria de detección de al menos otro transcrito del gen *KLK8*, lo que constituye una realización particular de la invención.

Por otro transcrito del gen *KLK8*, se entiende:

- los otros transcritos alternativos del gen *KLK8*, denominados transcritos minoritarios, tales como los ya conocidos como NT2, NT3 y NT4, así como nuevos transcritos descubiertos por los Solicitantes, denominados NT5 y NT6,
- el transcrito que codifica la kaliceína *KLK8* también denominado NT1.

Los nuevos transcritos NT5 y NT6, de secuencia SEC ID N° 7 y SEC ID N° 8, respectivamente, son nuevos y constituyen otro objeto de la invención.

El procedimiento de diagnóstico de la invención que incluye una etapa suplementaria de detección de otro transcrito alternativo del gen *KLK8* puede realizarse con las etapas que consisten en:

- i) determinar la cantidad de transcrito mayoritario alternativo del gen *KLK8* y de otro transcrito, llegado el caso alternativo, del gen *KLK8* en la misma muestra biológica, y
- ii) comparar la cantidad obtenida con un valor umbral predeterminado, seleccionado de acuerdo con el tipo de dosificación utilizado y representativo del límite de detección de la patología y
- iii) establecer el diagnóstico.

La determinación de la cantidad de transcrito mayoritario alternativo de *KLK8* y de otro transcrito, llegado el caso alternativo, del mismo gen *KLK8* puede realizarse secuencial o simultáneamente, de acuerdo con los procedimientos convencionalmente conocidos por el experto en la materia, como se ha indicado anteriormente.

Por misma muestra biológica, se entiende una muestra de la misma naturaleza tomada del mismo sujeto, a saber dos fracciones de una misma toma, o dos muestras procedentes de dos tomas diferentes, pero que deben ser de la misma naturaleza, por ejemplo de tejido canceroso. Se prefiere utilizar dos fracciones de una misma toma.

El procedimiento de diagnóstico de la invención también puede comprender una etapa suplementaria de detección de al menos un transcrito de un gen de otra kaliceína, lo que constituye otra realización de la invención.

El procedimiento detecta de este modo al menos un transcrito de un gen de otra kaliceína, así como:

- (a) al menos un transcrito mayoritario alternativo del gen *KLK8* o
- (b) al menos un transcrito mayoritario alternativo del gen *KLK8* y al menos un transcrito minoritario, llegado el caso alternativo, del gen *KLK8*.

Este procedimiento puede realizarse mediante las etapas que consisten en:

- i) determinar la cantidad de transcrito mayoritario alternativo del gen *KLK8*, y eventualmente del otro transcrito, llegado el caso alternativo, del gen *KLK8*, en la muestra biológica Q1,
- ii) determinar la cantidad del transcrito del otro gen de kaliceína en la misma muestra Q2,
- iii) calcular la proporción Q1/Q2 o Q2/Q1,
- iv) comparar dicha proporción con un valor umbral predeterminado, seleccionado de acuerdo con el tipo de dosificación utilizado y representativo del límite de detección de la patología y
- v) establecer el diagnóstico.

Como ejemplo de otro gen de kaliceína apropiado para los fines de la invención, pueden mencionarse los genes de kaliceínas que se expresan en el pulmón, tales como *KLK5*, *KLK6*, *KLK7*, *KLK10*, *KLK11*, *KLK13* y *KLK14*. Estos genes de kaliceínas se han descrito ampliamente en la bibliografía, de modo que son conocidos por el experto en la materia. Se prefieren los genes de kaliceínas *KLK5*, *KLK11* y *KLK13*, prefiriéndose particularmente *KLK11*.

Como se ha indicado anteriormente, la determinación de la cantidad de los transcritos de diferente naturaleza puede realizarse secuencial o simultáneamente, de acuerdo con los procedimientos convencionalmente conocidos por el experto en la materia, tales como los descritos anteriormente, y, por misma muestra biológica, se entiende una muestra de la misma naturaleza tomada del mismo sujeto.

Además de la detección del transcrito mayoritario alternativo del gen *KLK8*, el procedimiento de diagnóstico de la invención también puede comprender la etapa de detección de al menos un transcrito de otro gen que se expresa en el pulmón, sobreentendiéndose que es diferente de un gen que codifica una kalicreína.

5 Como ejemplo de otros genes que se expresan en el pulmón, pueden mencionarse los genes que codifican las cadherinas desmosomales, tales como desmocolina 2 o Dsc2 y desmogleína 2 o Dsg2.

El procedimiento que comprende además la etapa de detección de al menos un transcrito de otro gen que se expresa en el pulmón puede realizarse mediante las etapas que consisten en:

- 10 i) determinar la cantidad de transcrito mayoritario alternativo del gen *KLK8* en la muestra biológica Q1,
- ii) determinar la cantidad del transcrito del otro gen que se expresa en el pulmón en la misma muestra biológica Q4,
- 15 iii) calcular la proporción de Q1/Q4 o Q2/Q4,
- iv) comparar dicha proporción con un valor umbral predeterminado, seleccionado de acuerdo con el tipo de dosificación utilizado y representativo del límite de detección de la patología y
- 20 v) establecer el diagnóstico.

Como se ha indicado anteriormente, la determinación de la cantidad de los transcritos de diferente naturaleza puede realizarse secuencial o simultáneamente, de acuerdo con los procedimientos convencionalmente conocidos por 25 el experto en la materia tales como los descritos anteriormente, y, por misma muestra biológica, se entiende una muestra de la misma naturaleza tomada del mismo paciente.

En cada realización de la invención, la última etapa consiste en establecer el diagnóstico.

30 Por diagnóstico, se entiende tanto el diagnóstico en el sentido amplio del término, a saber tanto el diagnóstico precoz como el cribado, el seguimiento terapéutico, el pronóstico y el diagnóstico de las recaídas.

El tipo de diagnóstico dependerá de la naturaleza de la muestra biológica en la que se realiza el procedimiento de la invención. De este modo, los fluidos biológicos se utilizarán preferentemente en el marco del diagnóstico precoz, del 35 cribado, del diagnóstico de las recaídas y eventualmente del seguimiento terapéutico. Al tratarse de muestras sólidas, tales como el tejido canceroso, ganglios linfáticos o las metástasis, el cáncer ya está probado. El procedimiento de la invención será, por lo tanto, útil en el marco del pronóstico y eventualmente del seguimiento terapéutico.

El procedimiento de la invención es particularmente apropiado en el pronóstico de supervivencia de los pacientes aquejados de carcinoma broncopulmonar. En efecto, los Solicitantes demostraron que una tasa elevada de transcrito 40 mayoritario alternativo del gen *KLK8*, en particular de NT3 y NT4, es un factor de pronóstico desfavorable del cáncer y particularmente del CBNM.

De este modo, otro objeto consiste en la utilización del procedimiento de diagnóstico de la invención en el pronóstico de supervivencia de los pacientes aquejados de carcinoma broncopulmonar.

Como anteriormente, el pronóstico mejora mediante asociación de una de las siguientes etapas:

- 50 - etapa de detección de al menos otro transcrito, llegado el caso alternativo, del gen *KLK8*,
- etapa de detección de al menos un transcrito de otro gen de kalicreína, preferentemente *KLK5*, *KLK11* y *KLK13*, prefiriéndose particularmente *KLK11*, eventualmente en asociación con la detección de al menos otro transcrito alternativo del gen *KLK8*,
- 55 - etapa de detección de al menos un transcrito de otro gen que se expresa en el pulmón.

Para la realización del procedimiento de diagnóstico de la invención, la invención tiene como otro objeto un kit de diagnóstico que comprende las herramientas necesarias para la detección de los transcritos mayoritarios alternativos del gen *KLK8*.

A título no limitante de herramientas necesarias para la detección de los transcritos mayoritarios alternativos del gen *KLK8*, pueden mencionarse los socios de unión de dichos transcritos mayoritarios, tales como las sondas de hibridación y de detección.

65 La invención también se refiere a la utilización de al menos uno de los transcritos mayoritarios alternativos del gen *KLK8* que codifica kalicreína 8 en la producción de un agente utilizado en un procedimiento de detección en el marco del carcinoma broncopulmonar, particularmente del carcinoma bronquial no microcítico, estando el procedi-

ES 2 338 490 T3

miento *caracterizado porque* consiste en poner en contacto a dicho al menos un transcrito mayoritario alternativo del gen *KLK8* con una muestra biológica procedente de un paciente sospechoso de estar aquejado de dicho carcinoma broncopulmonar.

La invención se comprenderá mejor con ayuda de los siguientes ejemplos que se dan a título ilustrativo y no limitante, así como con ayuda de las figuras 1 y 2 adjuntas, en las que:

- la figura 1 es la fotografía de un gel de electroforesis que muestra los diferentes transcritos alternativos del gen *KLK8*, NT1 a NT6 obtenidos a partir de tejidos cancerosos de pacientes aquejados de adenocarcinoma (Ad) o de carcinoma epidermoide (C. EPI), correspondiendo la pista de la izquierda a la pista de los marcadores de peso molecular y

- la figura 2 es la fotografía de un gel de electroforesis que muestra la presencia de transcrito NT4 en la sangre de un paciente aquejado de carcinoma, correspondiendo la pista de la izquierda a la pista de los marcadores de peso molecular (MM).

Ejemplo 1

*Demostración de la presencia de transcritos pulmonares mayoritarios del gen *KLK8* y de nuevos transcritos*

Se extrajeron ARN totales a partir de tejidos cancerosos de pacientes aquejados de adenocarcinoma o de carcinoma epidermoide utilizando el sistema "RNAeasy Midi kit" (Qiagen S.A., Courtaboeuf, Francia) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Los ARN totales se transcribieron de forma inversa a ADNc con ayuda de la Transcriptasa Inversa de PowerScript [*PowerScript Reverse Transcriptase*] (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA).

Para cada muestra, se realizó una reacción de transcripción inversa a 42°C durante una hora en un volumen final de 20 µl. El medio de reacción estaba compuesto por 2 µg de ARN totales, 5 µM de oligonucleótidos decámeros asecuíficos (Random decamers RETROscript, Ambion, Cambridgeshire), de dNTP a la concentración cada uno de 1 mM, de 20 U de inhibidor de ARNasa (Roche Diagnostics, Meylan), por tampón de reacción concentrado una vez y por una unidad de Transcriptasa Inversa de PowerScript (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA).

Los ADNc se amplificaron por PCR. La mezcla de reacción de 25 µl contenía: 50 ng de ARN total transcrito de forma inversa, 1 unidad de Taq ADN Polimerasa de FastStart [*FastStart Taq DNA Polymerase*] (Roche Diagnostics, Meylan), tampón de reacción concentrado una vez (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 5 mM, MgCl₂ 2 mM), dNTP a la concentración de 0,3 mM y 0,2 µM de los cebadores específicos.

Estos cebadores se seleccionaron de uno y otro lado de la secuencia que codifica la kaliceína *KLK8* (NT1) y comportarían un punto de corte por una enzima de restricción (Not I o EcoR V). Estos cebadores eran:

- K8Not_for: TGG AGG GCG GCC GCA TGG GAC GCC CCC GAC (SEC ID N° 1) y

- K8Eco_rev: TCC TAG ATA TCG CCC TTG CTG CCT ATG (SEC ID N° 2).

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador con gradiente de temperatura (Master cycler Gradient, Eppendorf). Las condiciones de amplificación eran las siguientes: un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 95°C seguido de 45 ciclos que comprenden una etapa de desnaturalización a 95°C durante 20 segundos, una etapa de hibridación a 56°C durante 20 segundos y una etapa de elongación a 72°C durante 1,30 minutos. La reacción finalizó mediante un ciclo suplementario de elongación de 1,30 minutos a 72°C.

Diez microlitros de la reacción se depositaron sobre un gel de agarosa al 0,8% que contenía bromuro de etidio a 0,5 µg/ml. Los productos se separaron mediante electroforesis y se visualizan en luz UV. El marcador de tamaño utilizado (Gene Ruler DNA Ladder mix) fue suministrado por la compañía MBI-Fermentas.

La fotografía del gel de electroforesis que se da en la figura 1, demuestra la presencia de los diferentes transcritos procedentes de la expresión pulmonar del gen *KLK8* y la caracterización de transcritos mayoritarios de los NT3 y NT4. Debe observarse que estos transcritos fueron identificados mediante secuenciación nucleotídica (véase el ejemplo 2) como los transcritos ya descritos con el vocablo Neuropsina de tipo 1 a 4 (NT1 a NT4), habiéndose identificado los dos nuevos transcritos y denominados NT5 y NT6.

Ejemplo 2

*Caracterización estructural de los transcritos pulmonares del gen *KLK8* y diseño de cebadores específicos*

Los productos de PCR obtenidos en el ejemplo 1 se clonaron en el vector pcDNA5-FRT-V5-His TOPO (Invitrogen, Cergy Pontoise) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. La preparación de ADN plasmídico se realizó a partir de diferentes clones utilizando el sistema "Qiaprep MiniPrep" (Qiagen S. A, Courtaboeuf). El ADN plasmídico purificado se cuantificó a continuación mediante espectrofotometría a 260 nm, y después se secuenció en las 2 direc-

ES 2 338 490 T3

ciones con ayuda del par de cebadores T7 y pCR 3.1 (BGH_rev). Las secuencias obtenidas, que se dan a continuación, se compararon con las secuencias que se encuentran en los bancos de datos. La estructura de los transcritos clonados, que se da en la tabla 1, se determinó mediante alineamiento con la secuencia del gen *KLK8* con ayuda del programa CLUSTAL W.

- Secuencia del ADNc pulmonar YC170310.03 idéntica al transcrito NT1 (NM_007196): SEC ID N° 3
- Secuencia del ADNc pulmonar YC140710.03 idéntica al transcrito NT2 (NM_144505): SEC ID N° 4
- Secuencia del ADNc pulmonar YC090310.03 idéntica al transcrito NT3 (NM_144506): SEC ID N° 5
- Secuencia del ADNc pulmonar YC100310.03 idéntica al transcrito NT4 (NM_144507): SEC ID N° 6
- Secuencia del ADNc pulmonar YC210710.03 correspondiente a un nuevo transcrito (NT5): SEC ID N° 7
- Secuencia del ADNc pulmonar YC050710.03 correspondiente a un nuevo transcrito (NT6): SEC ID N° 8

TABLA 1

Transcrito pulmonar	Nombre genérico	Estructura
YC170310.03	NT1	EX1+EX2+EX3+EX4+EX5+EX6
YC140710.03	NT2	EX1+EX2+EX3 ALT+EX4+EX5+EX6
YC090310.03	NT3	EX1+EX2+EX5+EX6
YC100310.03	NT4	EX1+EX2+EX6
YC210710.03	NT5	EX1+EX2+EX4+EX5+EX6
YC050710.03	NT6	EX1+EX2+EX3+EX5+EX6
EX = exón; ALT = exón alternativo		

Como muestra la Tabla 1, los transcritos pulmonares solamente se distinguen unos de otros por combinaciones diferentes de exones idénticos. Por lo tanto, no es posible fijarlos como objetivo individualmente actuando sobre nuevas secuencias (salvo NT2 que posee una secuencia adicional en 5' del exón 2). El conocimiento del transcriptoma pulmonar del gen *KLK8* permite determinar, para cada transcrito, la combinación de exones que le distingue de los otros transcritos presentes en ese tejido, como se indica en la Tabla 2.

TABLA 2

Transcrito pulmonar	Nombre genérico	Combinación distintiva a nivel pulmonar
YC170310.03	NT1	EX2-EX3+EX4-EX5
YC140710.03	NT2	EX2-EX3ALT
YC090310.03	NT3	EX2-EX5
YC100310.03	NT4	EX2-EX6
YC210710.03	NT5	EX2-EX4
YC050710.03	NT6	EX3-EX5

ES 2 338 490 T3

La utilización en las sondas de hibridación o de detección de las secuencias de unión de los exones presentes en estas combinaciones es, por lo tanto, el único medio para fijar como objetivo específica e individualmente los transcritos pulmonares. Esto se ha aprovechado para generar el cebador de amplificación que otorga la especificidad de cuantificación de los transcritos mayoritarios NT3 y NT4 en ese órgano (véase la Tabla 3).

TABLA 3

Transcrito fijado como objetivo	Localización del cebador	Nombre del cebador específico sentido y secuencia (SEC ID N°)
NT3	Unión EX2-EX5	NT3_for: GGA GCC TGG GCA GAG AAT (SEC ID N° 9)
NT4	Unión EX6-EX6	NT4-2/6: TGG GCA GGG CGA TTC T (SEC ID N° 10)

Ejemplo 3

Cuantificación de los transcritos NT3 y NT4 en los tejidos tumorales de pacientes aquejados de cáncer de pulmón

Los transcritos NT3 y NT4 se dosificaron por PCR cuantitativa en tiempo real en presencia del fluoróforo intercalante "SYBR Green" en un termociclador *iCycler iQ Detection System* (Biorad, Marnes la Coquette). Cada ensayo incluía dos mediciones de cuantificación de los ADNc procedentes de muestras pulmonares tumorales, dos mediciones de controles sin ADN y una curva de calibrado construida utilizando diferentes diluciones de ADN plasmídico patrón aislado de los clones YC090310.03 (NT3) e YC100310.03 (NT4) (véase el ejemplo 2). Los valores encontrados para cada muestra se normalizaron con el determinado durante la cuantificación de los transcritos que codifican la sub-unidad ribosómica 18S. En este último caso, las curvas de calibrado se realizaron a partir de diferentes diluciones de una secuencia de este gen (853 pb) amplificada por PCR convencional y purificada directamente utilizando el kit Macherey Nagel de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Los oligonucleótidos utilizados para la obtención de esta secuencia eran:

- el oligonucleótido 18S_for: CTA CCA CAT CCA AGG AAG GCA GCA (SEC ID N° 11) y
- el oligonucleótido 18S_rev: GCT ATC AAT CTG TCA ATC CTG TCC (SEC ID N° 12).

La mezcla de reacción para la amplificación cuantitativa de NT3 y NT4 comprendía: 100 ng de ARN total transcrito de forma inversa (véase el ejemplo 1), 1 unidad de Taq ADN Polimerasa de FastStart [*FastStart Taq DNA Polymerase*], SYBR Green (Roche Diagnostics, Meylan) concentrado 0,2 veces, tampón de reacción concentrado una vez (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 mM, MgCl_2 2 mM), dNTP a la concentración cada uno de 0,2 mM y 0,2 μM de cada cebador oligonucleotídico sentido (Tabla III, ejemplo 2) y antisentido del transcrito estudiado. Los cebadores antisentido de los transcritos NT3 y NT4 eran respectivamente: el cebador NT3_rev (CCT CCA GAA TCG CCC T - SEC ID N° 13) que hibrida con la secuencia de unión de los exones 5 y 6, y el cebador NT4_rev (CAG TCC AGG TAG CGG CAG - SEC ID N° 14) cuya secuencia fijada como objetivo se encuentra en el exón 6.

Las mediciones de cuantificación del gen doméstico que codifica la sub-unidad ribosómica 18S se realizaron en el siguiente medio de reacción: 0,5 ng de ARN total transcrito de forma inversa, 1 unidad de Taq ADN Polimerasa de FastStart [*FastStart Taq DNA Polymerase*], SYBR Green concentrado 0,2 veces, tampón de reacción concentrado una vez (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 mM, MgCl_2 2 mM) a los que se añadieron MgCl_2 2 mM, dNTP a la concentración cada uno de 0,2 mM y 0,56 μM de cada cebador sentido (CGC GGT TCT ATT TTG TTG GTT TT - SEC ID N° 15) y antisentido (TTC GCT CTG GTC CGT CTT GC - SEC ID N° 16).

Las condiciones de amplificación para la PCR cuantitativa de los diferentes transcritos se indican en la Tabla 4.

TABLA 4

Número de ciclo(s)	Etapas	Duración	Temperatura	Transcritos
1 ciclo	Desnaturalización	5 minutos	95°C	NT3, NT4, 18S
50 ciclos	Desnaturalización	10 segundos	95°C	NT3, NT4, 18S
	Hibridación	10 segundos	59°C	NT3
		10 segundos	61°C	NT4
		10 segundos	65°C	18S
	Elongación	15 segundos	72°C	NT3, NT4
		20 segundos	72°C	18S
	Adquisición de fluorescencia	15 segundos	81°C	NT3, NT4
		15 segundos	84°C	18S

Las cuantificaciones se realizaron a partir de muestras de tejidos tumorales tomadas de pedazos de exéresis quirúrgica de pacientes operados de un carcinoma broncopulmonar entre enero de 2002 y junio de 2004. La cohorte estudiada comprendía 60 pacientes cuya edad variaba entre 45 y 83 años con una edad media igual a 65 años (véase la Tabla 5).

TABLA 5

Tipo tumoral	Número de pacientes
Adenocarcinoma	33
Carcinoma epidermoide	16
Carcinoma macrocítico	5
Carcinoma muco-epidermoide	1
Carcinoma neuroendocrino	1
Tumor carcinoide	4

Treinta y ocho pacientes tenían un cáncer de estadio 1 ó 2 de acuerdo con la clasificación pTNM²⁴, y 24 pacientes, un cáncer de estadio 3 ó 4. El análisis de supervivencia se realizó recogiendo las informaciones relativas a su estado de salud en enero de 2006. Se registraron 26 muertes en el periodo del estudio.

Para los valores normalizados de NT3 y NT4 expresados en unidades arbitrarias (UA), se determinó, con ayuda de un test de χ^2 , un valor umbral que permite predecir mejor la supervivencia global de la población. El valor umbral es de 50 UA para NT3 ($\chi^2 = 7,54$; $P = 0,006$) y de 1000 UA para NT4 ($\chi^2 = 7,54$; $P = 0,006$). Estos valores, que representan los 45° y 46° percentiles, se utilizaron para los análisis posteriores.

Los pacientes se clasificaron en dos grupos: un grupo corresponde a los individuos que presentan un nivel de expresión inferior al valor umbral determinado (Expresión débil; se habla de NT3 o NT4 débil), y un grupo que tiene un nivel de expresión superior (Expresión fuerte; se habla de NT3 o NT4 fuerte). Para cada grupo, se construyó una curva de supervivencia de acuerdo con el método de Kaplan-Meier y la significación de las diferencias entre las curvas se evaluó mediante el test de log-rank. El impacto de la expresión de los transcritos (comparación de Expresión fuerte frente a Expresión débil) sobre la supervivencia global de los pacientes se evaluó mediante el HR (riesgo relativo de muerte) que se calculó con el modelo de Cox (*Cox proportional hazards regression model*). El análisis se realizó de manera univariada. Éste también se realizó después del ajuste con el estadio tumoral (lo que permite eliminar la variable “estadio”) ya que esta variable está fuertemente vinculada a la supervivencia de los pacientes (se habla entonces de NT3 o NT4 fuerte ajustada).

Los resultados se indican en la tabla 6.

TABLA 6

Variables	Kaplan-Meier y test de log- rank	Modelo de Cox		
	<i>P</i>	HR	95% IC	<i>P</i>
NT3 fuerte vs NT3 débil	0,015	2,860	1,147-7,128	0,0241
Estadios 3+4 vs estadios 1+2	NC	3,609	1,583-8,229	0,0023
NT3 fuerte ajustada vs NT3 débil ajustada		2,300	0,911-5,804	0,0779
NT4 fuerte vs NT4 débil	0,005	3,608	1,448-8,994	0,0059
Estadios 3+4 vs estadios 1+2	NC	4,253	1,861-9,719	0,0006
NT4 fuerte ajustada vs estadios 1+2		3,712	1,478-9,323	0,0052
NC: no calculado e IC: intervalo de confianza, vs = <i>versus</i>				

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier demuestran diferencias significativas de supervivencia (test de log-rank, Tabla 6) entre los pacientes que expresan fuertemente NT3 o NT4 (NT3 o NT4 fuerte) y los pacientes que expresan débilmente estos transcritos (P calculado con respecto a NT3 o NT4 débil).

El modelo de Cox permite concluir que los pacientes que expresan fuertemente los transcritos tienen una supervivencia significativamente inferior a los otros pacientes. En efecto, el análisis de Cox muestra que el aumento del riesgo de muerte vinculado a una expresión fuerte de NT3 (aumentado en un factor 2,860; HR, Tabla 6) o de NT4 (aumentado en un factor 3,608; HR, Tabla 6) es estadísticamente significativo. Los niveles de expresión de estos transcritos constituyen, por lo tanto, indicadores de pronóstico de la supervivencia de los pacientes para el cáncer de pulmón.

Después del ajuste con el estadio tumoral (NT3 o NT4 fuerte ajustada), se constata que el aumento del riesgo de muerte vinculado a “NT3 fuerte” pierde la significación estadística (P = 0,0779). Esto indica que las dos variables (expresión de NT3 y estadio tumoral) estarían vinculadas en este estudio.

Sin embargo, la fuerte tendencia a la significación de “NT3 fuerte ajustada” sugiere que las dos variables podrían mostrarse independientes en un estudio más robusto que comprende un mayor número de eventos.

La situación es diferente para la variable “NT4 fuerte”, ya que el ajuste con el estadio tumoral no modifica la significación estadística del aumento del riesgo de muerte. Este resultado demuestra que la variable NT4 es un indicador de pronóstico independiente del estadio tumoral.

Ejemplo 4

Dosificación de los transcritos NT3 o NT4 en asociación con la dosificación de transcritos de otros genes de kaliceínas

La estrategia de dosificación de los transcritos de otros genes de las kaliceínas que se expresan en el pulmón (*KLK5*, *KLK6*, *KLK7*, *KLK10*, *KLK11*, *KLK13* y *KLK14*) es idéntica a la descrita en el ejemplo 3. En resumen, la cantidad de productos procedentes de la amplificación de los ADNc y de los controles se determinó después de cada ciclo con ayuda de la incorporación de SYBR green. Se realizaron curvas patrón a partir de ADN plasmídico procedente de clones de ADNc de los diferentes genes. Los valores encontrados para cada paciente y cada gen se normalizaron con los valores del 18S ribosómico y se expresaron en unidades arbitrarias. Las condiciones de reacción eran idénticas a las descritas para NT3 y NT4 (Ejemplo 3). Los cebadores de PCR utilizados se describen en la Tabla 7.

TABLA 7

Nombre	Secuencias	Genes	Orientaciones	SEC ID N°
K5.398_for	GCC ATC	<i>KLK5</i>	Sentido	17
K5.682_rev	ACT CCC TGT CAC CA GCA TCC TCG CAC CTT TTC TG		Antisentido	18
256.K6_for	TGA TGG	<i>KLK6</i>	Sentido	19
393.K6_rev	TGG TGC TGA GT ACA GTG GAT GGA TAA GGA C		Antisentido	20
547.K7_for	GAG CCC	<i>KLK7</i>	Sentido	21
615.K7_rev	AGA TGT CAC CTT TCC TTG TAA ACC TTC GTG C		Antisentido	22
2K10.210_for	GGA CCC	<i>KLK10</i>	Sentido	23
2K10.442_rev	CGA AGC CTA TG CCT GAG CCC TGG TGG TA		Antisentido	24
K11_for2	CAG GAT	<i>KLK11</i>	Sentido	25
K11_rev2	CAT CAA GGG GTT CG CAT TGC GGT GGT CTT TGT TG		Antisentido	26

ES 2 338 490 T3

576.K13_for	GTG CCA ACA TCC AAC TTC G	<i>KLK13</i>	Sentido	27
672.K13_rev	CCC TCA CAG GAC TCT TTG C		Antisentido	28
448.K14_for	TGG GTC ATC ACT GCT GCT C	<i>KLK14</i>	Sentido	29
500.K14_rev	CTC CYC AGG TTG TGC TTG C		Antisentido	30

TABLA 8

Número de ciclo(s)	Etapas	Duración	Temperatura	Transcritos
1 ciclo	Desnaturalización	5 minutos	95°C	Todos
50 ciclos	Desnaturalización	10 segundos	95°C	Todos
	Hibridación	15 segundos	57°C	KLK10 y 11
		10 segundos	59°C	KLK14
		10 segundos	60°C	KLK7
		15 segundos	65°C	KLK5, 6
		15 segundos	68°C	KLK13
	Elongación	15 segundos	72°C	KLK10 y 14
		20 segundos	72°C	KLK5, 6, 7, 11 y 13
	Adquisición de fluorescencia	15 segundos	80°C	KLK7
		15 segundos	81°C	KLK14
		15 segundos	84°C	KLK6, 11, 13
		15 segundos	86°C	KLK5, 10

Las cohortes utilizadas para la dosificación de los transcritos de los diferentes genes proceden de la población estudiada en el ejemplo 3. La distribución de los tipos histológicos tumorales en las cohortes estudiadas se da en la Tabla 9.

TABLA 9

Tipo tumoral	KLK5, 7	KLK6	KLK10, 11, 13	KLK14
Adenocarcinoma	29	33	28	33
Carcinoma epidermoide	16	16	16	15
Carcinoma macrocítico	4	5	3	5
Carcinoma muco-epidermoide	1	1	1	1
Carcinoma neuro-endocrino	1	1	1	1
Tumor carcinoide	3	4	1	4
Número total	54	60	50	59

Para cada paciente, se determinó el nivel de expresión de los diferentes transcritos y después sirvió para calcular una proporción con NT3 o con NT4 (Tabla 10 para NT3 y Tabla 11 para NT4). Para cada proporción, a continuación se determinó un valor umbral que permite predecir mejor la supervivencia global de la población con ayuda del método descrito en el ejemplo 3.

TABLA 10

Variable	Umbral	χ^2	P	percentil	mueres
NT3/KLK5	0,05	5,54	0,019	46	26
NT3/KLK6	0,005	5,54	0,019	42	26
NT3/KLK7	0,001	7,54	0,006	37	26
NT3/KLK10	0,01	10,66	0,001	36	24
NT3/KLK11	0,0015	8,17	0,004	40	24
NT3/KLK13	0,008	8M17	0,004	40	24
NT3/KLK14	0,10	6,00	0,014	53	24

TABLA 11

Variable	Umbral	χ^2	P	percentil	mueres
NT4/KLK5	2	3,84	0,049	53	26
NT4/KLK6	2	3,84	0,049	43	26
NT4/KLK7	0,1	7,50	0,006	39	26
NT4/KLK10	0,4	5,99	0,014	42	24
NT4/KLK11	0,1	10,66	0,001	44	24

ES 2 338 490 T3

NT4/KLK13	0,7	8M17	0,004	46	24
NT4/KLK14	0,5	5,99	0,014	52	24

Como en el ejemplo 3, los pacientes se clasificaron en dos grupos: un grupo corresponde a los individuos que presentan un nivel de expresión inferior al valor umbral determinado (Expresión débil), y un grupo que tiene un nivel de expresión superior (Expresión fuerte). Para cada grupo, se construyó una curva de supervivencia de acuerdo con el método de Kaplan-Meier y la significación de las diferencias entre las curvas se evaluó mediante el test de log-rank. El riesgo relativo de muerte (HR) se calculó con el modelo de Cox (*Cox proportional hazards regression model*). El análisis se realizó después del ajuste con el estadio tumoral, ya que esta variable está fuertemente vinculada a la supervivencia de los pacientes.

Los resultados para NT3 se dan en la Tabla 12.

TABLA 12

Variables	Kaplan-Meier y test de log- rank	Modelo de Cox		
		HR	95% IC	P
NT3/KLK5 fuerte vs NT3/KLK5 débil	0,214	NC	NC	NC
Estadios 3+4 vs estadios 1+2	NC	3,549	1,553-8,110	0,0027
NT3/KLK5 fuerte ajustada vs NT3/KLK5 débil ajustada		2,570	1,064-6,211	0,0360

ES 2 338 490 T3

5	NT3/KLK6 fuerte vs NT3/KLK6 débil	0,0378	NC	NC	NC
10	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	NC	3,662	1,609-8,335	0,0020
15	NT3/KLK6 fuerte ajustada vs NT3/KLK6 débil ajustada		2,245	0,891-5,657	0,864
20					
25	NT3/KLK7 fuerte vs NT3/KLK7 débil	0,0564	NC	NC	NC
30					
35	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	NC	3,572	1,564-8,158	0,0025
40	NT3/KLK7 fuerte ajustada vs NT3/KLK7 débil ajustada		2,337	0,925-5,906	0,0727
45					
50	NT3/KLK10 fuerte vs NT3/KLK10 débil	0,0126	NC	NC	NC
55	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	NC	3,476	1,517-7,966	0,0032

ES 2 338 490 T3

5	NT3/KLK10 fuerte ajustada vs NT3/KLK10 débil ajustada		2,439	0,962-6,182	0,0602
10	NT3/KLK11 fuerte vs NT3/KLK11 débil	0,0085	NC	NC	NC
15	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	NC	3,958	1,743-8,990	0,0010
20	NT3/KLK11 fuerte ajustada vs NT3/KLK11 débil ajustada		2,969	1,244-7,086	0,0142
25	NT3/KLK13 fuerte vs NT3/KLK13 débil	0,0041	NC	NC	NC
30	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	NC	3,473	1,520-7,935	0,0031
35	NT3/KLK13 fuerte ajustada vs NT3/KLK13 débil ajustada		2,923	1,160-7,364	0,0229
40	NT3/KLK14 fuerte vs NT3/KLK14 débil	0,0205	NC	NC	NC

Estadios 3+4 vs estadios 1+2	NC	3,669	1,604-8,392	0,0021
NT3/KLK14 fuerte ajustada vs NT3/KLK14 débil ajustada		1,823	0,814-4,082	0,1444
NC: no calculado e IC: intervalo de confianza				

Este estudio establece que los pacientes que tienen proporciones de NT3/KLKx superiores al valor umbral presentan una tasa de supervivencia significativamente reducida con respecto a aquellos cuyo valor de la proporción es inferior al valor umbral (con excepción de NT3/KLK7; test de log-rank).

Los resultados del test de Cox muestran que las proporciones de NT3/KLK5, NT3/KLK11, NT3/KLK13 son indicadores de pronóstico independientes del estadio tumoral ($P < 0,05$ para la variable ajustada). La constitución de una proporción de la expresión de NT3 sobre la expresión de los genes KLK5, KLK11 y KLK13 mejora, por lo tanto, el poder predictivo de NT3, ya que esta variable sola no es totalmente independiente de la variable "estadio tumoral" en la población estudiada (véase el ejemplo 3).

Los resultados para NT4 se dan en la Tabla 13.

TABLA 13

Variables	Kaplan-Meier y test de log- rank	Modelo de Cox		
		HR	95% IC	P
NT4/KLK5 fuerte vs NT4/KLK5 débil	0,0054	NC	NC	NC
Estadios 3+4 vs estadios 1+2	NC	3,703	1,621-8,456	0,0019

ES 2 338 490 T3

5	NT4/KLK5 fuerte ajustada vs NT4/KLK5 débil ajustada		3,131	1,349-7,270	0,0079
10	NT4/KLK6 fuerte vs NT4/KLK6 débil	0,0629	NC	NC	NC
15	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	NC	3,802	1,678-8,617	0,0014
20	NT4/KLK6 fuerte ajustada vs NT4/KLK6 débil ajustada		2,073	0,864-4,974	0,1024
25	NT4/KLK7 fuerte vs NT4/KLK7 débil	0,0010	NC	NC	NC
30	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	NC	4,468	1,948-10,245	0,0004
35	NT4/KLK7 fuerte ajustada vs NT4/KLK7 débil ajustada		3,657	1,458-9,178	0,0057
40	NT4/KLK10 fuerte vs NT4/KLK10 débil	0,0012	NC	NC	NC

ES 2 338 490 T3

5	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	NC	3,807	1,672-8,667	0,0014
10	NT4/KLK10 fuerte ajustada vs NT4/KLK10 débil ajustada		3,802	1,521-9,503	0,0043
15	NT4/KLK11 fuerte vs NT4/KLK11 débil	0,0001	NC	NC	NC
20	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	NC	4,437	1,917-10,269	0,0005
25	NT4/KLK11 fuerte ajustada vs NT4/KLK11 débil ajustada		6,362	2,330-17,366	0,0003
30	NT4/KLK13 fuerte vs NT4/KLK13 débil	0,0018	NC	NC	NC
35	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	NC	3,789	1,669-8606	0,0015
40	NT4/KLK13 fuerte ajustada vs NT4/KLK13 débil ajustada		3,255	1,410-7,510	0,0057

NT4/KLK14 fuerte vs NT4/KLK14 débil	0,0018	NC	NC	NC
Estadios 3+4 vs estadios 1+2	NC	3,718	1,634-8,459	0,0017
NT4/KLK14 fuerte ajustada vs NT4/KLK14 débil ajustada		2,821	1,217-6,537	0,0156
NC: no calculado e IC: intervalo de confianza				

Como muestra la Tabla 13, los pacientes que tienen proporciones de NT4/KLKx superiores al valor umbral presentan una tasa de supervivencia significativamente reducida con respecto a aquellos cuyo valor de la proporción es inferior al valor umbral (con excepción de NT3/KLK6; test de log-rank). Los resultados del test de Cox muestran que, excepto la proporción de NT3/KLK6, todas las demás proporciones constituyen indicadores de pronóstico independientes del estadio tumoral ($P < 0,05$ para la variable ajustada). En este estudio, la proporción de NT4/KLK11 parece particularmente efectiva, puesto que el riesgo relativo de muerte calculado con esta variable es superior al obtenido con el estadio tumoral.

Ejemplo 5

Cuantificación del transcrito NT3 en asociación con otros transcritos del gen KLK8 (NT1, NT2, NT5 y NT6), eventualmente en asociación con otros transcritos de kaliceína

En los ejemplos anteriores, los transcritos NT3 y NT4 se dosificaron por separado gracias a la utilización de cebadores de PCR discriminantes. Este ejemplo pretende evaluar el valor de pronóstico de estos transcritos cuando se dosifican con ayuda de cebadores de PCR no discriminantes. Hemos utilizado oligonucleótidos dirigidos a los exones 5 y 6 y que permiten, de este modo, la cuantificación global de los transcritos NT1, NT2, NT3, NT5 y NT6. La variable medida se denominó "KLK8". Las secuencias de estos cebadores son:

- 719.K8_for: CCA GAA GAA GTG TGA GGA TG (SEC ID N° 31) y
- 890.K8_rev: GGT ATA GAC GCC AGG TTT G (SEC ID N° 32).

La mezcla de reacción utilizada era idéntica la del ejemplo 3 mientras que las condiciones de amplificación eran: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C y después 50 ciclos que comprenden una etapa de desnaturalización de 20 segundos a 95°C, una etapa de hibridación de 20 segundos a 60°C, una etapa de elongación de 20 segundos a 72°C y una etapa de adquisición de fluorescencia de 15 segundos a 84°C. El procedimiento fue idéntico al de los ejemplos anteriores, a saber: (1) cuantificación de la variable con ayuda de una curva patrón, (2) normalización con el nivel de expresión del ARN ribosómico 18S, (3) expresión en forma de valor arbitrario y eventualmente establecimiento de una proporción con la expresión de otro gen, (4) definición mediante test de χ^2 de un valor umbral (Tabla 14), (5) binarización de la población (Expresión fuerte > umbral; Expresión débil < umbral), (6) tests estadísticos (Tabla 15).

Las cohortes estudiadas eran las mismas que en el ejemplo 3 para la variable "KLK8", y que en el ejemplo 4 para la expresión en forma de proporción con otros genes de kaliceína.

ES 2 338 490 T3

TABLA 14

Variable	Umbral	χ^2	P	percentil	muerres
KLK8	250	7,54	0,006	42	26
KLK8/KLK5	0,33	5,53	0,018	43	26
KLK8/KLK6	0,10	7,54	0,006	22	26
KLK8/KLK7	0,020	15,39	0,00008	22	26
KLK8/NT4	0,020	12,46	0,0004	19	26
KLK8/KLK10	0,2	8,16	0,004	44	24
KLK8/KLK11	0,02	8,16	0,004	42	24
KLK8/KLK13	0,1	13,49	0,0002	40	24
KLK8/KLK14	0,050	8,16	0,004	39	24

TABLA 15

Variable	Modelo de Cox		
	HR	95% IC	P
Estadios 3+4 vs estadios 1+2	3,753	1,654-8,515	0,0016
"KLK8 fuerte" ajustada vs KLK8 débil	2,0152	0,856-5,412	0,1033

	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	3,878	1,712-8,784	0,0012
5	"KLK8/KLK5 fuerte" ajustada vs KLK8/KLK5 débil	2,221	0,922-5,351	0,0752
	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	4,129	1,830-9,132	0,0009
10	"KLK8/KLK6 fuerte" ajustada vs KLK8/KLK6 débil	0,752	0,299-1,889	0,5440
	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	3,824	1,684-8,684	0,0013
15	"KLK8/KLK7 fuerte" ajustada vs KLK8/KLK7 débil	3,152	0,938-10,585	0,0633
	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	4,152	1,833-9,401	0,0006
20	"KLK8/NT4 fuerte" ajustada vs KLK8/NT4	0,851	0,290-2,501	0,7695
	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	3,952	1,742-8,964	0,0010
25	"KLK8/KLK10 fuerte" ajustada vs KLK8/KLK10 débil ajustada	3,054	1,320-7,062	0,0091
	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	3,725	1,639-8,470	0,0017
30	"KLK8/KLK11 fuerte" ajustada vs KLK8/KLK11 débil	3,247	1,352-7,797	0,0084
	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	3,268	1,423-7,504	0,0052
35	"KLK8/KLK13 fuerte" ajustada vs KLK8/KLK13 débil ajustada	3,415	1,265-9,218	0,0153
	Estadios 3+4 vs estadios 1+2	3,249	1,487-7,911	0,0039
40	"KLK8/KLK14 fuerte" ajustada vs KLK8/KLK14 débil justada	2,178	0,852-5,573	0,1042
45	IC, intervalo de confianza			

Los pacientes que tienen un fuerte valor de la variable "KLK8" presentan una supervivencia inferior a los demás (test de log-rank, $P = 0,0353$); sin embargo, esta variable está vinculada a la variable "estadio tumoral" como muestra el P no significativo de la variable ajustada (Tabla 17).

La variable "KLK8" se vuelve independiente cuando se combina en forma de proporción con los niveles de expresión de otros genes de kaliceína ($P < 0,05$; Tabla 17). Éste es el caso de las proporciones KLK8/KLK10, KLK8/KLK11 y KLK8/KLK13. Estas variables constituyen, por lo tanto, indicadores de pronóstico desfavorables e independientes para el cáncer de pulmón.

Ejemplo 6

Demostración de la presencia del transcrito NT4 en la sangre de pacientes aquejados de un cáncer de pulmón

Una detección sensible de carcinoma latente a partir de la sangre periférica de pacientes que tienen un cáncer podría tener implicaciones de pronóstico o terapéuticas importantes. Hemos realizado, por lo tanto, este experimento para verificar que era posible detectar la presencia de los transcritos NT4 en la sangre y que esta detección podía estar asociada a un cáncer de pulmón.

Se extrajo sangre de sujetos aquejados de un cáncer de pulmón en tubos "PAXgene™ Blood RNA" (Europe BD) y después los ARN totales se prepararon con ayuda del sistema *PAXgene Blood RNA System* (Qiagen, Francia) de

acuerdo con las recomendaciones de los proveedores. Estos ARN totales se transcribieron de forma inversa a ADNc de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1. La búsqueda del transcrito NT4 se realizó con ayuda de una "PCR anidada" [*Nested PCR*] (2 PCR consecutivas). En la primera PCR, hemos utilizado los cebadores K8Not_for y K8Eco_rev descritos en el ejemplo 1. El medio de reacción era idéntico al de ese ejemplo, así como las condiciones de PCR. Sin embargo, solamente se realizaron 30 ciclos de amplificación. Para la segunda PCR, hemos utilizado los cebadores NT4-2/6 y NT4_rev descritos respectivamente en el ejemplo 2 y 3. El medio de reacción (que contiene 1 µl de la primera PCR) y el programa de amplificación eran idénticos al ejemplo 1, excepto por el hecho de que la fase de hibridación de los cebadores se realizó a 62°C. Se realizaron cincuenta ciclos y se depositaron 10 µl del medio de PCR sobre un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Los resultados se indican en la figura 2, que es una fotografía del gel de electroforesis obtenido de este modo a partir de dos pacientes aquejados de cáncer y de dos pacientes sanos.

Como muestra la figura 2, no es posible detectar el transcrito NT4 en la sangre de sujetos sanos. Esta observación indica la ausencia de este transcrito en las células sanguíneas normales. El transcrito NT4 se detectó en uno de los pacientes aquejados de un cáncer de pulmón. Este enfoque permite, por lo tanto, detectar la presencia de células tumorales circulantes en algunos sujetos que tienen un cáncer de pulmón.

Bibliografía

- 1: Etzioni R. *et al.*, 2003, *Nature Reviews Cancer*, 3: 1-10
- 2: Pisters KM *et al.*, 2005, *J Clin Oncol*, 23: 3270-3278,
- 3: Bhattacharjee A. *et al.*, 2001, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 13790-13795,
- 4: Garber M.E. *et al.*, 2001, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 13784-13789,
- 5: Planque C. *et al.*, 2005, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329: 1260-1266,
- 6: Dong Y. *et al.*, 2001, *Clin Cancer Res*, 7: 2363-2371,
- 7: Dong Y. *et al.*, 2003, *Clin Cancer Res*, 9: 1710-1720,
- 8: Yoshida S. *et al.*, 1998, *Gene*, 213: 9-16,
- 9: Mitsui S. *et al.*, 1999, *Eur J Biochem*, 260: 627-634,
- 10: Magklara A. *et al.*, 2001, *Clin Cancer Res*, 7: 806-811,
- 11: P.E. Nielsen *et al.*, 1991, *Science*, 254: 1497-1500,
- 12: Kricka *et al.*, 1999, *Clinical Chemistry*, nº 45(4): 453-458,
- 13: Keller G.H. *et al.*, 1993, *DNA Probes*, 2nd Ed., Stockton Press, secciones 5 y 6, p.173-249,
- 14: Tyagi & Kramer, 1996, *Nature biotech*, 14: 303-308
- 15: M. Chee *et al.*, 1996, *Science*, 274: 610-614,
- 16: A. Caviani Pease *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5022-5026,
- 17: G. Ramsay, 1998, *Nature Biotechnology*, 16: 40-44,
- 18: F. Ginot, 1997, *Human Mutation*, 10: 1-10,
- 19: J. Cheng *et al.*, 1996, *Molecular diagnosis*, 1(3): 183-200,
- 20: T. Livache *et al.*, 1994, *Nucleic Acids Research*, 22(15): 2915-2921,
- 21: J. Cheng *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology*, 16: 541-546,
- 22: Boom R. *et al.*, 1990, *J. Clin. Microbiol.*, 28(3): 495-503,
- 23: Levison PR *et al.*, 1998, *J. Chromatography*, p. 337-344,
- 24: Mountain, CF., 1997, *Chest*, 111: 1710- 1717.

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* de carcinoma broncopulmonar, particularmente de carcinoma bronquial no microcítico, **caracterizado** porque comprende la etapa de detección, en una muestra biológica procedente de un paciente sospechoso de estar aquejado de dicho carcinoma broncopulmonar, de al menos uno de los transcritos mayoritarios alternativos del gen *KLK8* que codifica kalicreína 8.

10 2. Procedimiento de pronóstico *in vitro* de carcinoma broncopulmonar, particularmente de carcinoma bronquial no microcítico, **caracterizado** porque comprende la etapa de detección, en una muestra biológica procedente de un paciente sospechoso de estar aquejado de dicho carcinoma broncopulmonar, de al menos uno de los transcritos mayoritarios alternativos del gen *KLK8* que codifica kalicreína 8.

15 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque los transcritos mayoritarios alternativos del gen 1 *KLK8* se seleccionan entre los transcritos NT3 y NT4.

4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 ó 3, **caracterizado** porque emplea las etapas que consisten en:

- 20 i) determinar la cantidad de transcrito mayoritario alternativo en la muestra biológica,
- ii) comparar la cantidad de transcrito mayoritario alternativo en la muestra biológica con un valor umbral predeterminado, seleccionado de acuerdo con el tipo de dosificación utilizado y representativo del límite de detección de la patología y
- 25 iii) establecer el diagnóstico.

5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 ó 3, **caracterizado** porque comprende también la etapa de detección de al menos otro transcrito del gen *KLK8*.

30 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado** porque el al menos otro transcrito del gen *KLK8* es el transcrito que codifica kalicreína *KLK8*, también llamado NT1.

35 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado** porque el al menos otro transcrito del gen *KLK8* es un transcrito alternativo.

8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado** porque el o los transcritos alternativos se seleccionan entre NT2, NT3, NT4, NT5 y NT6.

40 9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, **caracterizado** porque emplea las etapas que consisten en:

- i) determinar la cantidad de transcrito mayoritario alternativo del gen *KLK8* y la cantidad del otro transcrito del gen *KLK8* en la misma muestra biológica, y
- 45 ii) comparar la cantidad obtenida con un valor umbral predeterminado, seleccionado de acuerdo con el tipo de dosificación utilizado y representativo del límite de detección de la patología y
- iii) establecer el diagnóstico.

50 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 ó 5, **caracterizado** porque comprende también la etapa de detección de al menos un transcrito de un gen que codifica otra kalicreína.

11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado** porque emplea las etapas que consisten en:

- 55 i) determinar la cantidad de transcrito mayoritario alternativo del gen *KLK8* y eventualmente del otro transcrito del gen *KLK8* en la muestra biológica Q1,
- ii) determinar la cantidad del transcrito del gen que codifica la otra kalicreína en la misma muestra Q2,
- 60 iii) calcular la proporción Q1/Q2 o Q2/Q1,
- iv) comparar dicha proporción con un valor umbral predeterminado, seleccionado de acuerdo con el tipo de dosificación utilizado y representativo del límite de detección de la patología y
- 65 v) establecer el diagnóstico.

ES 2 338 490 T3

12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 ó 3, **caracterizado** porque comprende también la etapa de detección de al menos un transcrito de otro gen que se expresa en el pulmón, gen que no codifica una kaliceína.

13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado** porque emplea las etapas que consisten en:

- i) determinar la cantidad de transcrito mayoritario alternativo del gen *KLK8* en la muestra biológica Q1,
- ii) determinar la cantidad del transcrito del otro gen que se expresa en el pulmón en la misma muestra Q3,
- iii) calcular la proporción Q1/Q3 o Q3/Q1,
- iv) comparar dicha proporción con un valor umbral predeterminado, seleccionado de acuerdo con el tipo de dosificación utilizado y representativo del límite de detección de la patología y
- v) establecer el diagnóstico.

14. Utilización de un kit de diagnóstico que comprende socios de unión de los transcritos mayoritarios alternativos del gen *KLK8*, preferentemente sondas nucleicas o cebadores de amplificación, para la realización del procedimiento tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 12.

15. Transcrito NT5 alternativo del gen *KLK8* que codifica kaliceína 8, **caracterizado** porque tiene la secuencia SEC ID N° 7.

16. Transcrito NT6 alternativo del gen *KLK8* que codifica kaliceína 8, **caracterizado** porque tiene la secuencia SEC ID N° 8.

Figura 1

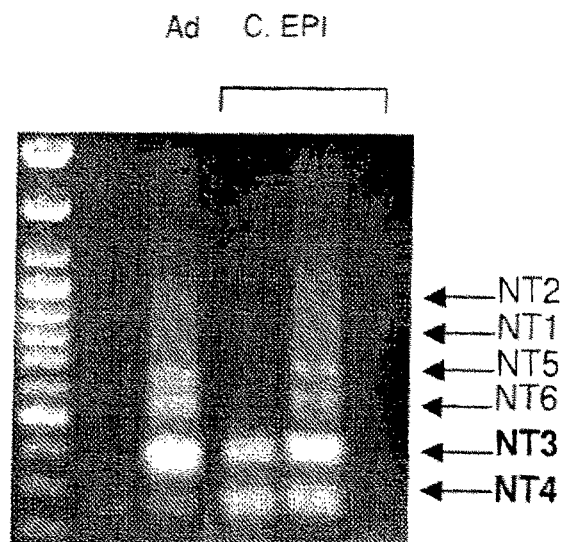
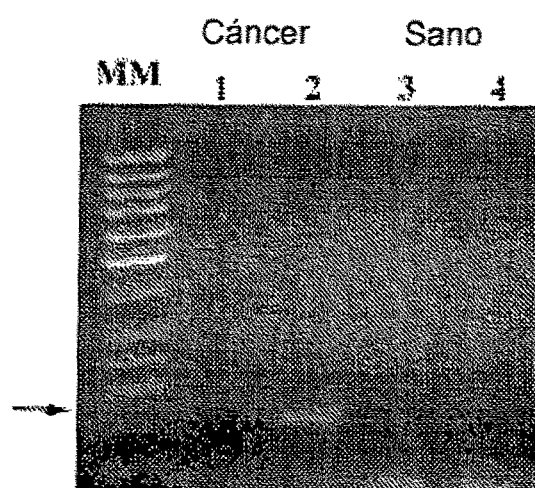


Figura 2



ES 2 338 490 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> bioMérieux Université François Rabelais	
	<120> Procedimiento de diagnóstico <i>in vitro</i> de carcinoma broncopulmonar mediante detección de transcritos mayoritarios alternativos del gen KLK8 que codifica kaliceína 8 y su utilización para el pronóstico de supervivencia	
10	<130> Trans KLK8	
	<160> 32	
15	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
	<211> 30	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador de amplificación	
	<400> 1	
30	tggagggcgg ccgcatggga cgccccgac	30
	<210> 2	
	<211> 27	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> cebador de amplificación	
	<400> 2	
45	tcctagatat cgcccttgct gcctatg	27
	<210> 3	
	<211> 806	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Transcrito NT1 de kaliceína 8	
60		
65		

ES 2 338 490 T3

<400> 3

5	tggaagggcg gccgcatggg acgccccga cctcgtgcgg ccaagacgtg gatgttcctg	60
	ctcttgctgg ggggagcctg ggcaggacac tccagggcac aggaggacaa ggtgctgggg	120
	ggtcattgagt gccaacccca ttgcagacct tggcaggcgg ccttggtcca gggccagcaa	180
10	ctactctgtg gcggtgtcct tgtagggtgg aactgggtcc ttacagctgc ccactgtaaa	240
	aaaccgaaat acacagtacg cctgggagac cacagcctac agaataaaga tggcccagag	300
15	caagaaatac ctgtggttca gtccatccca caccctgct acaacagcag cgatgtggag	360
20		
	gaccacaacc atgatctgat gcttcttcaa ctgcgtgacc aggcatccct ggggtccaaa	420
	gtgaagccca tcagcctggc agatcattgc accagcctg gccagaagtg caccgtctca	480
25	ggctggggca ctgtcaccag tccccgagag aattttcctg acactctcaa ctgtgcagaa	540
	gtaaaaatct tccccagaa gaagtgtgag gatgcttacc cggggcagat cacagatggc	600
30	atggctctgtg caggcagcag caaaggggct gacacgtgcc agggcgattc tggaggcccc	660
	ctgggtgtgtg atgggtgact ccagggcacc acatcctggg gctcagacc ctgtgggagg	720
	tccgacaaac ctggcgtcta taccaacatc tgccgctacc tggactggat caagaagatc	780
35	ataggcagca agggcgatat ctagga	806

<210> 4

<211> 940

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Transcrito NT2 de kalicreína 8

ES 2 338 490 T3

<400> 4

5	tggaaggcgg ccgcatggga cgcggccgac ctggtgcggc caagacgtgg atgttcctgc	60
	tcttgctggg gggagcctgg gcagcgtgtg gaagcctgga cctcctcact aagttgtatg	120
	cggagaactt gccgtgtgtc catttgaacc cacagtggcc tccccagccc tcgcaactgcc	180
10	ccagagggtg gcgatccaac cctctccctc ctggtgcagg acactccagg gcacaggagg	240
	acaagggtgt ggggggtcat gagtgcgaac cccattcgca gccttggcag gcggccttgt	300
15	tccagggcca gcaactactc tgtggcgggtg tccttgtagg tggcaactgg gtccttacag	360
	ctgcccactg taaaaaaccg aaatacacag tacgcctggg agaccacagc ctacagaata	420
	aagatggccc agagcaagaa atacctgtgg ttcagtccat cccacacccc tgctacaaca	480
20	gcagcgtatg ggaggaccac aacctgatc tgatgcttct tcaactgcgt gaccaggcat	540
	ccctggggtc caaagtgaag cccatcagcc tggcagatca ttgcacccag cctggccaga	600
25	agtgcaccgt ctgaggctgg ggcactgtca ccagtcccc agagaatddd cctgacactc	660
	tcaactgtgc agaagtaaaa atctttcccc agaagaagtg tgaggatgct taccgggggc	720
30	agatcacaga tggcatggtc tgtgcaggca gcagcaaagg ggctgacacg tgccagggcg	780
	attctggagg cccctgggtg tgtgatgggt cactccaggg catcacatcc tggggctcag	840
	acccctgtgg gaggtccgac aaacctggcg tctataccaa catctgccgc tacctggact	900
35	ggatcaagaa gatcataggc agcaaggggc atatctagga	940

<210> 5

<211> 383

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Transcrito NT3 de kaliceína 8

<400> 5

55	tggaaggcgg ccgcatggga cgcggccgac ctggtgcggc caagacgtgg atgttcctgc	60
	tcttgctggg gggagcctgg gcagagaatt ttctgacac tctcaactgt gcagaagtaa	120
	aaatctttcc ccagaagaag tgtgaggatg cttaccggg gcagatcaca gatggcatgg	180
60	tctgtgcagg cagcagcaaa ggggctgaca cgtgccaggg cgattctgga ggccccctgg	240
	tgtgtgatgg tgcaactccag ggcattcacat cctggggctc agaccctgt gggagggtccg	300
	acaaacctgg cgtctatacc aacatctgcc gctacctgga ctggatcaag aagatcatag	360
65	gcagcaaggg cgatatctag gga	383

ES 2 338 490 T3

<210> 6
 <211> 248
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Transcrito NT4 de kalicreína 8
 10
 <400> 6
 tggaaggcgg ccgcatggga cgcggcgac ctctgctggc caagacgtgg atgttcctgc 60
 15 tcttgctggg gggagcctgg gcaggcgat tctggaggcc cctgggtgtg tgatggtgca 120
 ctccagggca tcacatcctg gggctcagac cctgttggga ggtccgacaa acctggcgtc 180
 20 tataccaaca tctgccgcta cctggactgg atcaagaaga tcataggcag caagggcgat 240
 atctagga 248

 <210> 7
 25 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Transcrito NT5 de kalicreína 8

 <400> 7
 35 tggaaggcgg ccgcatggga cgcggcgac ctctgctggc caagacgtgg atgttcctgc 60
 tcttgctggg gggagcctgg gcaggaaata cacagtacgc ctgggagacc acagcctaca 120
 40 gaataaagat ggcccagagc aagaaatacc tgtgggtcag tccatccac acctctgcta 180
 caacagcagc gatgtggagg accacaacca tgatctgatg cttcttcaac tgcgtgacca 240
 45 ggcacccctg ggggtccaaag tgaagcccat cagcctggca gatcattgca cccagcctgg 300

 50 ccagaagtgc accgtctcag gctggggcac tgtcaccagt ccccgagaga attttctga 360
 cactctcaac tgtgcagaag taaaaatctt tcccagaag aagtgtgagg atgcttacct 420
 55 ggggcagatc acagatggca tgggtctgtg aggcaacagc aaaggggctg acacgtgcca 480
 gggcgattct ggaggccccc tgggtgtgtga tgggtgcactc cagggcatca catcctgggg 540
 60 ctccagacccc tgtgggaggt ccgacaaacc tggcgtctat accaacaatct gccgctacct 600
 ggactggatc aagaagatca taggcagcaa gggcgatatc tagga 645

 65 <210> 8
 <211> 542
 <212> ADN

ES 2 338 490 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Transcrito NT5 de kaliceína 8

<400> 8

10	tggaaggcgg ccgcatggga cgcggcgac ctctgcggc ctagacgtgg atgttcctgc	60
	tcttgctggg gggagcctgg gcaggacact ccagggcaca ggaggacaag gtgctggggg	120
	gtcatgagtg ccaaccccat tcgcagcctt ggcaggtggc cttgttccag ggccagcaac	180
15	tactctgtgg cgggtgcctt gtaggtggca actgggtcct tacagctgcc cactgtaaaa	240
	aaccagaatt ttcttgacac tctcaactgt gcagaagtaa aaatctttcc ccagaagaag	300
20	tgtgaggatg cttaccggg gcagatcaca gatggcatgg tctgtgcagg cagcagcaaa	360
	ggggctgaca cgtgccaggg cgattctgga ggccccctgg tgtgtgatgg tgactccag	420
25	ggcatcacat cctggggctc agaccctgt gggaggtccg acaaacctgg cgtctatacc	480
	aacatctgcc gctacctgga ctggatcaag aagatcatag gcagcaagg cgatatctag	540
	ga	542

30 <210> 9

<211> 18

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de amplificación

40

<400> 9

ggagcctggg cagagaat

18

45

<210> 10

<211> 16

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de amplificación

55

<400> 10

tgggcagggc gattct

16

60

<210> 11

<211> 24

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 338 490 T3

	<223> cebador de amplificación	
	<400> 11	
5	ctaccacatc caaggaaggc agca	24
	<210> 12	
10	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
	<400> 12	
20	gctatcaatc tgtcaatcct gtcc	24
	<210> 13	
25	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
	<400> 13	
35	cctccagaat cgcctt	16
	<210> 14	
40	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
	<400> 14	
50	cagtcaggt agcggcag	18
	<210> 15	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
	<400> 15	
65	cgcggttcta tttgttggt ttt	23

ES 2 338 490 T3

	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
10	<400> 16	
	ttcgctctgg tccgtcttgc	20
15	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
25	<400> 17	
	gccactactc cctgtcacca	20
30	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
40	<400> 18	
	gcatcctcgc accttttctg	20
45	<210> 19	
	<211> 17	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
55	<400> 19	
	tgatggtggt gctgagt	17
60	<210> 20	
	<211> 19	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 338 490 T3

	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
5	<400> 20	
	acagtggatg gataaggac	19
10	<210> 21	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
20	<400> 21	
	gagcccagat gtgacctt	18
25	<210> 22	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
35	<400> 22	
	tccttgtaaa ccttcgtgc	19
40	<210> 23	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
50	<400> 23	
	ggaccccgaa gcctatg	17
55	<210> 24	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
65	<400> 24	
	cctgagccct ggtggta	17

ES 2 338 490 T3

	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
10	<400> 25	
	caggatcatc aaggggttcg	20
15	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
25	<400> 26	
	cattgcggtg gtctttgtg	20
30	<210> 27	
	<211> 19	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
40	<400> 27	
	gtgccaacat ccaacttcg	19
45	<210> 28	
	<211> 19	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
55	<400> 28	
	ccctcacagg agtctttgc	19
60	<210> 29	
	<211> 19	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 338 490 T3

	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
5	<400> 29	
	tgggtcatca ctgctgctc	19
10	<210> 30	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
20	<400> 30	
	ctcctcaggt tgtgcttgc	19
25	<210> 31	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
35	<400> 31	
	ccagaagaag tgtgaggatg	20
40	<210> 32	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> cebador de amplificación	
50	<400> 32	
	ggtatagacg ccaggtttg	19
55		
60		
65		