

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
05 de julio de 2018 (05.07.2018)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2018/122438 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
G01N 33/541 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2017/070862

(22) Fecha de presentación internacional:
28 de diciembre de 2017 (28.12.2017)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201631711 29 de diciembre de 2016 (29.12.2016) ES

(71) Solicitantes: **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD DE SEVILLA** [ES/ES]; Pabellón de Brasil, Pº de las Delicias; s/n, 41013 Sevilla (ES).

(72) Inventores: **GONZÁLEZ MONTELONGO, María del Carmen**; IBIS: Instituto de Biomedicina de Sevilla, Campus Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot, s/n, 41013 Sevilla (ES). **EGEA GUERRERO, Juan José**; IBIS: Instituto de Biomedicina de Sevilla, Campus Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot, s/n, 41013 Sevilla (ES). **MURILLO CABEZAS, Francisco**; IBIS: Instituto de Biomedicina de Sevilla, Campus Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot, s/n, 41013 Sevilla (ES). **UREÑA LÓPEZ, Juan**; IBIS: Instituto de Biomedicina de Sevilla, Campus Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot, s/n, 41013 Sevilla (ES).

(74) Mandatario: **FUSTER, Gustavo**; Paseo de la Castellana 140. Planta 3ª., Edificio Lima, 28046 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,

NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: BIOMARKER FOR SUBARACHNOID HEMORRHAGE AND VASOSPASM

(54) Título: BIOMARCADOR PARA LA HEMORRAGIA SUBARACNOIDEA Y EL VASOESPASMO

(57) Abstract: The invention relates to the use of the *RhoA* gene, the protein and the activity thereof for the diagnosis, classification and/or monitoring of subarachnoid hemorrhage resulting from an aneurysm and for predicting or providing an early indication of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage resulting from an aneurysm, a method for obtaining data that can be used for the diagnosis, classification and/or monitoring of subarachnoid hemorrhage, a method for obtaining data that can be used for predicting or providing an early indication of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage, kit or device, and uses thereof.

(57) Resumen: Uso del gen *RhoA*, la proteína y su actividad para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de la Hemorragia Subaracnoidea de origen aneurismático y para predecir o pronosticar el vasoespasmo cerebral tras la hemorragia subaracnoidea de origen aneurismático método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de la Hemorragia Subaracnoidea, método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar el vasoespasmo cerebral tras la hemorragia subaracnoidea, kit o dispositivo y usos



WO 2018/122438 A1

Biomarcador para la Hemorragia Subaracnoidea y el Vasoespasmo

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuentra dentro del campo de la Biomedicina y la Biotecnología, y específicamente se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de la Hemorragia Subaracnoidea y a un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar el vasoespasmo cerebral tras la hemorragia subaracnoidea. Dichos métodos se realizan cuantificando el producto de expresión del gen *RhoA* o su actividad.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La patología cerebrovascular hemorrágica de origen aneurismático (aHSA), supone alrededor del 80% de todos los sangrados extravasados al espacio subaracnoideo de origen no traumático y es la causa más habitual de muerte súbita por ictus. La patocronia de la misma es bien conocida: durante las primeras 24-48 horas acontecen la hidrocefalia y el resangrado. A partir del 4º día hasta la segunda semana, el vasoespasmo podría ser responsable del deterioro neurológico e incluso del fallecimiento de un 15-20% de los pacientes. Así, el tratamiento y detección temprana del mismo es de gran relevancia en la práctica clínica. Dado que el vasoespasmo es un proceso complicado que incluye engrosamiento de la pared arterial e incremento de la vasoconstricción, el descubrimiento de moléculas que reduzcan ambas alteraciones sería una buena estrategia para reducir la mortalidad y morbilidad en estos pacientes. Por lo tanto, sería importante realizar estudios donde se identifiquen moléculas específicas que participen en la cascada inflamatoria y en la contracción arterial y que pueden servir como dianas para el tratamiento y el diagnóstico temprano de la evolución del paciente con aHSA.

Con este fin, los inventores han estudiado en pacientes con aHSA la proteína monomérica RhoA, dado que participa en la contracción arterial e inflamación. El efecto de RhoA sobre la contracción arterial está mediado por la activación de su efector Rho Kinasa (ROCK) y la inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLC) del músculo liso arterial. Esto implica la permanente fosforilación de la MLC y como consecuencia la arteria permanece contraída (Somlyo *et al.*, 2003. *Physiol. Rev.* 83:1325-1358).

Además de la contracción microvascular, existen evidencias que demuestran que la inflamación, y más concretamente la interacción leucocito-endotelio, juega un papel central en el desarrollo del vasoespasmo y en el mal pronóstico de esta patología (Chaichana *et al.*, 2010. *World Neurosurg.* 73:22-41). En diversos estudios clínicos y experimentales se demuestra que

numerosas moléculas que participan en la adhesión celular están muy elevadas en suero sanguíneo y líquido cefalorraquídeo (LCR) (Miller *et al.*, 2014. *Biomed. Res. Int.* 384-342). Por lo tanto, las terapias orientadas a prevenir la inflamación pueden evitar o revertir el estrechamiento arterial en pacientes con aHSA (Hong *et al.*, 2014. *Biomarkers* 19:95-108). Los linfocitos y otras células sanguíneas juegan un papel importante en el desarrollo de procesos inflamatorios, debido a su interacción con el endotelio vascular (Imhof y Aurrand-Lions *et al.*, 2004. *Nat. Rev. Immunol.* 4:432-444). Así, moléculas como: molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1), molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1), L-selectina, P-selectina y E-selectina han adquirido especial atención como biomarcadores en aHSA (Przybycien-Szymanska y Ashley, 2015. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 24:1453-1464). Estudios en humanos demuestran que los niveles altos de estas moléculas se encuentran en LCR y suero (Hong *et al.*, 2014. *Biomarkers* 19:95-108).

En linfocitos humanos existen pequeñas Rho GTPasas citosólicas (RhoA, Cdc42, Rac1) que regulan muchas funciones celulares como adhesión, dinámica del citoesqueleto, migración y contracción del músculo liso, y que aún no han sido evaluadas en pacientes con aHSA (Loirand *et al.*, 2006. *Circ. Res.* 98:322-334). Dado que RhoA participa en la regulación de la contracción en músculo liso arterial (Somlyo *et al.*, 2003. *Physiol. Rev.* 83:1325-1358) y en procesos inflamatorios, concretamente en la interacción leucocito-endotelio vascular (Honing *et al.*, 2003. *J. Leukoc. Biol.* 75:523-528; Heasman *et al.*, 2010. *J. Cell Biol.* 2010; 190: 553-563), los inventores han estudiado específicamente esta proteína en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con aHSA. Dado que el vasoespasmo se presenta en clínica a partir del día 5, los inventores han evaluado la actividad y cantidad de RhoA en células mononucleares de pacientes entre los días 1 y 4 tras el ingreso. Los resultados que se detallan en esta patente indican que la cantidad y actividad de RhoA están incrementadas en pacientes respecto de individuos sanos. Además estos valores están relacionados con la gravedad del paciente a su ingreso, determinado por el coeficiente de Glasgow ($p=0,003$) y con el desarrollo del vasoespasmo ($p=0,028$).

Los resultados obtenidos se pueden resumir en:

- a) Es la primera vez que se describe el uso como biomarcador de la proteína RhoA en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con aHSA.
- b) La determinación de la actividad y expresión de RhoA en células mononucleares en humanos durante los cuatro primeros días de ingreso del paciente tras la aHSA podría ser un biomarcador de diagnóstico precoz de vasoespasmo que se produce a partir del día 5. Estudiando los mecanismos de adhesión de linfocitos con endotelio se ha descrito que RhoA es requerida para la adhesión mediada por integrinas y la transmigración endotelial, existiendo una correlación entre la migración de linfocitos a través del endotelio y la cantidad de RhoA

(Laudanna *et al.*, 1996. *Science* 271:981-983; Heasman *et al.*, 2010. *J. Cell Biol.* 190:553-563). El hecho de que la expresión de RhoA sea mayor en las células mononucleares (constituídas mayoritariamente por linfocitos) de los pacientes facilitaría su adhesión al endotelio en respuesta a determinados agentes proinflamatorios que están sobreexpresados en suero (Miller *et al.*, 2014. *Biomed Res. Int.* 2014: 384342). La determinación de la cantidad de RhoA en células mononucleares podría ser un biomarcador con alta especificidad que podría mejorar el manejo de los pacientes en el ámbito hospitalario, con la consiguiente optimización de los costes.

c) Los resultados obtenidos por los inventores justifican el uso actual del fasudil, un inhibidor de la ruta RhoA/ROCK, en el tratamiento de pacientes con aHSA, ya que RhoA interviene a nivel de músculo liso, incrementando la contracción y en células mononucleares, facilitando la interacción con el endotelio. El uso de fasudil en pacientes podría inhibir estas dos rutas que participan en el vasoespasmó arterial. Aunque los resultados deberían ser interpretados con cautela, un reciente metaanálisis con 843 pacientes encuentra una reducción significativa en la ocurrencia de vasoespasmó e infarto cerebral así como una mejora de la evolución clínica de pacientes con aHSA tratados con fasudil (Liu *et al.*, 2012. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 68:131-139). Se ha descrito en estos pacientes que fasudil es igualmente seguro y más efectivo que la nimodipina, fármaco antagonista del calcio, habitualmente utilizado en la prevención del vasoespasmó cerebral y posterior daño isquémico (Zhao *et al.*, 2011. *Neurol. Med. Chir.* 51:679-683).

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Comparación de la expresión de RhoA entre controles sanos y pacientes. El valor de la mediana de la cantidad o expresión de RhoA, medida el día 1 en pacientes con aSAH (n=15), se ha mostrado significativamente incrementada ($p=0,014$) respecto de los controles sanos (n=15).

Figura 2. Curva ROC entre individuos sanos (n=15) y enfermos del día 4 (n=14) alcanza un AUC (área bajo la curva)=0,757; I.C=(0,564-0,951), $p=0,018$.

Figura 3. Correlación entre la expresión de RhoA en pacientes con aHSA y la gravedad. La cantidad de RhoA medida desde el día 2 (n=14) y el día 4 (n=14) en pacientes está correlacionada inversamente con el Índice Glasgow de los pacientes al ingreso ($r=-0,632$ y $r=-0,733$, respectivamente).

Figura 4. Correlación entre la actividad de RhoA en pacientes con aHSA y el desarrollo de vasoespasmio. La actividad de RhoA medida el día 4 en 14 pacientes (8 presentaban vasoespasmio y 6 no), está correlacionada con el desarrollo del vasoespasmio ($p=0,028$).

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han encontrado que el producto de expresión del gen *RhoA* puede emplearse como biomarcador en el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de la Hemorragia Subaracnoidea, preferiblemente espontánea y para predecir o pronosticar el vasoespasmio cerebral tras la hemorragia subaracnoidea, preferiblemente espontánea de origen aneurismático (aHSA).

USOS DEL GEN *RhoA*

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso del gen *RhoA* o del producto de expresión de dicho gen, como biomarcador para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de la Hemorragia Subaracnoidea. Preferiblemente hemorragia Subaracnoidea de origen aneurismático.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la Hemorragia Subaracnoidea es espontánea.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere al uso del gen *RhoA* o del producto de expresión de dicho gen, como biomarcador para predecir o pronosticar el vasoespasmio cerebral tras la Hemorragia Subaracnoidea.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la Hemorragia Subaracnoidea es espontánea.

En esta memoria se entiende por “producto de expresión de dicho gen” (*RhoA*) a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 ó SEQ ID NO: 14.

El término “producto de expresión”, también denominado “producto génico” se refiere al material bioquímico, ya sea ARN o proteína, resultando de la expresión de un gen. Algunas veces se usa una medida de la cantidad de producto génico para inferir qué tan activo es un gen.

En esta memoria se entiende por “*RhoA*”, al gen que codifica para un miembro de la familia Rho de pequeñas GTPasas, que funcionan como interruptores moleculares de las cascadas de transducción de señales. Las proteínas Rho promueven la reorganización del citoesqueleto de

actina y regulan la forma de la célula, la adhesión y la motilidad. Más específicamente son proteínas G monoméricas que regulan funciones celulares como la interacción de células mononucleares (mayoritariamente linfocitos) con el endotelio facilitando el proceso inflamatorio. Por otro lado, La sobreexpresión de este gen se asocia con la proliferación de células tumorales y la metástasis. Se han identificado variantes de este gen, así como múltiples variantes de *splicing* alternativo.

En esta memoria se entiende como “Hemorragia Subaranoidea” a la presencia de sangre intracraneal ubicada en el espacio comprendido entre las membranas piamadre y aracnoides. La presencia de sangre en el espacio subaracnoideo puede ser consecuencia de un traumatismo o bien producirse de manera espontánea por la ruptura de alguna arteria cerebral. Concretamente, la presencia de lesiones en los vasos arteriales, conocidos como aneurismas, suelen ser la porción de la arteria que se rompen espontáneamente debido al proceso deformativo de la pared arterial a este nivel. A su vez, el volcado de sangre en el espacio subaracnoideo, ocasiona de manera diferida, fenómenos vasomotores, que pueden potenciar la gravedad del cuadro y generar secuelas o la muerte del paciente incluso días después de haber presentado el sangrado, por lo que se le conoce como deterioro neurológico tardío.

En esta memoria se entiende como “vasoespasmismo” o “vasoespasmismo cerebral tras la hemorragia subaracnoidea” espontánea de origen aneurismático (aHSA)” como la presencia de uno o varios de los siguientes: En primer lugar, la presencia de vasoespasmismo clínico ante el deterioro del nivel de conciencia del paciente (caída del GCS igual o superior a 2 puntos o a la aparición de déficit focal), entre el 4º y el 14º día del sangrado, no atribuibles a resangrado, hematoma, hidrocefalia o alteraciones metabólicas. En segundo lugar, se consideró vasoespasmismo sonográfico ante la presencia en la Arteria Cerebral Media (ACM) a la existencia de una Velocidad media (Vm) a nivel de ACM superior a 120 cm/seg junto con un valor de índice hemisférico igual o superior a 3, a partir del 4º día postsangrado. (Lindergaard y col., 1989. Acta Neurochir (Wien) 1989;100:12–24). Por último, el vasoespasmismo arteriográfico se consideró ante la presencia de una reducción del calibre vascular cerebral en la arteriografía cerebral de circulación anterior y posterior. La presencia de cualquiera de los tres componentes anteriores, de manera aislada o simultánea, se consideró como vasoespasmismo cerebral.

MÉTODOS DE LA INVENCION

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de la Hemorragia Subaracnoidea en un individuo o sujeto, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

a) cuantificar el producto de expresión del gen *RhoA* en una muestra biológica aislada de dicho individuo.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el primer método de la invención además comprende:

- 5 b) comparar las cantidades obtenidas en el paso a) con una cantidad de referencia, donde la cantidad de referencia del producto de expresión del gen *RhoA* es el nivel medio de producto de expresión de dicho gen en individuos sanos.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica aislada del paso a) son células mononucleares de sangre periférica.

- 10 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica aislada del paso a) se selecciona de la lista que consiste en células de músculo liso vascular, líquido cefaloraquídeo (LCR), orina, líquido pleural y líquido peritoneal.

Una “muestra biológica aislada” incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada del paso (a) es sangre periférica, y más preferiblemente las células mononucleares que contiene.

15

La cuantificación del producto de expresión del gen *RhoA* puede realizarse por cualquiera de los métodos conocidos en el estado de la técnica.

- En una realización preferida de este aspecto de la invención, la cuantificación del producto de expresión del gen *RhoA* se realiza utilizando ELISA.
- 20

La “técnica ELISA” consiste básicamente, aunque sin limitarnos, en un sistema de detección y medición de *RhoA* altamente selectivo que hace uso de inmunoglobulinas de alta afinidad para todos los isotipos de *Rho*. Posteriormente y mediante el uso de un anticuerpo complementario monoclonal altamente selectivo de ratón para *RhoA* conjugado a la peroxidasa de rábano que se pone en contacto con su sustrato y se revela por colorimetría.

25

Tabla 1. Secuencias de la invención

Nombre del Gen	Descripción	Gen ID	Secuencias nucleotídicas	Secuencias aminoacídicas
<i>RhoA</i>	Familia de genes homólogos a Ras	387	SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7,	SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8,

			SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14
--	--	--	--	---

En el contexto de la presente invención, el gen *RhoA* se define también por un secuencia de nucleótidos o polinucleótidos, que constituyen la secuencia codificante de las proteínas recogidas respectivamente en la Tabla 1, siendo dichas proteínas el producto de expresión de cada uno de los genotipos identificados en la tabla. Adicionalmente, la presente invención comprende diversas variantes procedentes de cada una de las secuencias identificadas en la Tabla 1:

En este sentido, variantes de las secuencias asociadas al gen *RhoA* comprenden:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 ó SEQ ID NO: 14 recogida en la Tabla 1.
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a)
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14 recogidas en la Tabla 1, respectivamente, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de las proteína RhoA y se seleccione de la lista que consiste en las secuencias:SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13 indicadas en la Tabla 1.

SEQ ID NO: 1

AATAGTGGATGAGCTGTGAGTGCGCGCGCGTGC GCGGGGCCGCGACCTGTGCCGGCTC
GAGCCCGCTGGGCACTCGGAGGCGCGCACGTCGTTCCCCGCCCTCCCGCCGCGCCCG
CCCTCGCTCTCTCGCGCTACCCTCCCGCCGCCCGCGGTCTCCGTGCGTTCTCTCGTTAG
TCCACGGTCTGGTCTTCAGCTACCCGCCTTCGTCTCCGAGTTTGCGACTCGCGGACCGGC
GTCCCCGGCGCGAAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTGTTGAGAACTATGTGGCAGATATCG
AGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAAGATTATG

ATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTTTCCATCGA
CAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAGCATTCTGT
CCCAACGTGCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGATGAGCACACAA
GGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGCAGAGATATG
5 GCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAAGATGGAGTG
AGAGAGGTTTTTGAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGGAAGAAAAAAT
CTGGGTGCCTTGTCTTGTGAAACCTTGCTGCAAGCACAGCCCTTATGCGGTTAATTTTGAA
GTGCTGTTTATTAATCTTAGTGTATGATTACTGGCCTTTTTTCATTTATCTATAATTTACCTAAG
ATTACAAATCAGAAGTCATCTTGCTACCAGTATTTAGAAGCCAACTATGATTATTAACGATGT
10 CCAACCCGTCTGGCCCACCAGGGTCCTTTTGACACTGCTCTAACAGCCCTCCTCTGCACTC
CCACCTGACACACCAGGCGCTAATTCAAGGAATTTCTTAACTTCTTGCTTCTTTCTAGAAAG
AGAAACAGTTGGTAACTTTTGTGAATTAGGCTGTAACACTTTATAACTAACATGTCCTGCC
TATTATCTGTCAGCTGCAAGGTAAGTCTGGTGAGTCACCACTTCAGGGCTTTACTCCGTAAC
AGATTTTGTGGCATAGCTCTGGGGTGGGCAGTTTTTTGAAAATGGGCTCAACCAGAAAAG
15 CCAAGTTCATGCAGCTGTGGCAGAGTTACAGTTCTGTGGTTTTTCATGTTAGTTACCTTATAG
TTACTGTGTAATTAGTGCCACTTAATGTATGTTACCAAAAATAAATATATCTACCCCAGACTA
GATGTAGTATTTTTTGTATAATTGGATTTCTAATACTGTCATCCTCAAAGAAAGTGTATTGG
TTTTTTAAAAAAGAAAGTGTATTTGGAAATAAAGTCAGATGGAAAATTCATTTTTTAAATTCC
CGTTTTGTCACTTTTTCTGATAAAAGATGGCCATATTACCCCTTTTCGGCCCCATGTATCTC
20 AGTACCCCATGGAGCTGGGCTAAGTAAATAGGAATTGGTTTTACGCCTGAGGCAATTAGAC
ACTTTGGAAGATGGCATAACCTGTCTCACCTGGACTTAAGCATCTGGCTCTAATTCACAGT
GCTCTTTTCTCCTCACTGTATCCAGGTTCCCTCCCAGAGGAGCCACCAGTTCTCATGGGTG
GCACTCAGTCTCTCTTCTCTCCAGCTGACTAACTTTTTTTCTGTACCAGTTAATTTTTTCCAA
CTACTAATAGAATAAAGGCAGTTTTCTAACTTCCTGTAAAAA

25 SEQ ID NO: 2

MCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFPCPNVPIILVGNKKDLRNDHTRRELAKMKQEPVKPEEGR
DMANRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSGCLVL

SEQ ID NO: 3

AATAGTGGATGAGCTGTGAGTGCGCGCGCGTGCGCGGGGCCGCGACCTGTGCCGGCTC
30 GAGCCCGCTGGGCACTCGGAGGCGCGCACGTCGTTCCCCGCCCTCCCGCCGCCGCCCG
CCCTCGCTCTCTCGCGCTACCCTCCCGCCGCCCGCGGTCTCCGTGCGTTCTCTCGTTAG
TCCACGGTCTGGTCTTCAGCTACCCGCCTTCGTCTCCGAGTTTGCGACTCGCGGACCGGC
GTCCCCGCGCGAAGAGGCTGGACTCGGATTGTTGCCTGAGCAATGGCTGCCATCCGG
AAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTCTTCA
35 GCAAGGACCAGTTCCCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGAAGATTA
TGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTTTCCATC

GACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCCAGAAGTCAAGCATTCT
GTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGATGAGCACA
CAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGCAGAGAT
ATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAAGATGGA
5 GTGAGAGAGGTTTTTGAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGGAAGAAA
AAATCTGGGTGCCTTGTCTTGAAACCTTGCTGCAAGCACAGCCCTTATGCGGTTAATTTT
GAAGTGCTGTTTATTAATCTTAGTGTATGATTACTGGCCTTTTTTCATTTATCTATAATTTACCT
AAGATTACAAATCAGAAGTCATCTTGCTACCAGTATTTAGAAGCCAACCTATGATTATTAACG
ATGTCCAACCCGTCTGGCCACCAGGGTCCTTTTGACACTGCTCTAACAGCCCTCCTCTGC
10 ACTCCACCTGACACACCAGGCGCTAATTC AAGGAATTTCTTAACTTCTTGCTTCTTTCTAG
AAAGAGAAACAGTTGGTAACTTTTGTGAATTAGGCTGTA ACTACTTTATAACTAACATGTCC
TGCCTATTATCTGTCAGCTGCAAGGTA CTCTGGTGAGTCACCACTTCAGGGCTTTACTCCG
TAACAGATTTTGTGGCATAGCTCTGGGGTGGGCAGTTTTTTGAAAATGGGCTCAACCAGA
AAAGCCCAAGTTCATGCAGCTGTGGCAGAGTTACAGTTCTGTGGTTTCATGTTAGTTACCTT
15 ATAGTTACTGTGTAATTAGTGCCACTTAATGTATGTTACCAAAAATAAATATATCTACCCCAG
ACTAGATGTAGTATTTTTTGTATAATTGGATTTCTAATACTGTCATCCTCAAAGAAAGTGTA
TTGGTTTTTTAAAAAAGAAAGTGATTTTGGAAATAAAGTCAGATGGAAAATTCATTTTTTAAA
TTCCCGTTTTGTCACTTTTTCTGATAAAAGATGGCCATATTACCCCTTTTCGGCCCCATGTA
TCTCAGTACCCCATGGAGCTGGGCTAAGTAAATAGGAATTGGTTTCACGCCTGAGGCAATT
20 AGACACTTTGGAAGATGGCATAACCTGTCTCACCTGGACTTAAGCATCTGGCTCTAATTCA
CAGTGCTCTTTTCTCCTCACTGTATCCAGGTTCCCTCCCAGAGGAGCCACCAGTTCTCATG
GGTGGCACTCAGTCTCTCTCTCCAGCTGACTAACTTTTTTTCTGTACCAGTTAATTTTT
CCA ACTACTAATAGAATAAAGGCAGTTTTTCTAACTTCCTGTAAAAA

SEQ ID NO: 4

25 MAAIRKKLVIVGDGACGKTC LLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYVEDYDRLRPLSYPDTDVILMCFSI
DSPDSLENIPEKWTPEVKHFPCPNVPIILVGNKKDLRNDEHTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMAN
RIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSGCLVL

SEQ ID NO: 5

AATAGTGGATGAGCTGTGAGTGCGCGCGCGTGCGCGGGGCCGCGACCTGTGCCGGCTC
30 GAGCCCGCTGGGCACTCGGAGGCGCGCACGTCGTTCCCCGCCCTCCCGCCGCCGCCCG
CCCTCGCTCTCTCGCGCTACCCTCCCGCCGCCCGCGGTCTCCGTGCGTTCTCTCGTTAG
TCCACGGTCTGGTCTTCAGCTACCCGCCTTCGTCTCCGAGTTTGCGACTCGCGGACCGGC
GTCCCCGCGCGAAGAGGCTGGACTCGGATTGTTGCCTGAGCAATGGCTGCCATCCGG
AAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTCTTCA
35 GCAAGGACCAGTTCCCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCAGATAT
CGAGGTGGATGGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGCAGAGATATGGCAAACA

GGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAAGATGGAGTGAGAGAGG
TTTTTGAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGGAAGAAAAATCTGGGTG
CCTTGTCTTGTGAAACCTTGCTGCAAGCACAGCCCTTATGCGGTTAATTTTGAAGTGCTGTT
TATTAATCTTAGTGTATGATTACTGGCCTTTTTTCATTTATCTATAATTTACCTAAGATTACAAA
5 TCAGAAGTCATCTTGCTACCAAGTATTTAGAAGCCAACTATGATTATTAACGATGTCCAACCC
GTCTGGCCCACCAGGGTCCTTTTGACACTGCTCTAACAGCCCTCCTCTGCACTCCCACCTG
ACACACCAGGCGCTAATTC AAGGAATTTCTTAACCTTCTTGCTTCTTTCTAGAAAGAGAAACA
GTTGGTAACTTTTGTGAATTAGGCTGTAACACTTTATAACTAACATGTCCTGCCTATTATCT
GTCAGCTGCAAGGTACTCTGGTGAGTCACCACTTCAGGGCTTTACTCCGTAACAGATTTTG
10 TTGGCATAGCTCTGGGGTGGGCAGTTTTTTGAAAATGGGCTCAACCAGAAAAGCCCAAGTT
CATGCAGCTGTGGCAGAGTTACAGTTCTGTGGTTTTCATGTTAGTTACCTTATAGTTACTGTG
TAATTAGTGCCACTTAATGTATGTTACCAAAAATAAATATATCTACCCCAGACTAGATGTAGT
ATTTTTTGTATAATTGGATTTCCTAATACTGTATCCTCAAAGAAAGTGTATTGGTTTTTTAAA
AAAGAAAGTGTATTTGGAAATAAAGTCAGATGGAAAATTCATTTTTTAAATTCCCGTTTTGTG
15 ACTTTTTCTGATAAAAGATGGCCATATTACCCCTTTTCGGCCCCATGTATCTCAGTACCCCA
TGGAGCTGGGCTAAGTAAATAGGAATTGGTTTCACGCCTGAGGCAATTAGACACTTTGGAA
GATGGCATAACCTGTCTCACCTGGACTTAAGCATCTGGCTCTAATTCACAGTGCTCTTTTCT
CCTCACTGTATCCAGGTTCCCTCCAGAGGAGCCACCAGTTCTCATGGGTGGCACTCAGT
CTCTCTTCTCTCCAGCTGACTAACTTTTTTTCTGTACCAGTTAATTTTTCCAACACTAATA
20 GAATAAAGGCAGTTTTCTAAACTTCCTGTAAAAA

SEQ ID NO: 6

MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQEPVKPEEGRDMA
NRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSGCLVL

SEQ ID NO: 7

25 AATAGTGGATGAGCTGTGAGTGCGCGCGCGTGCGCGGGGCCGCGACCTGTGCCGGCTC
GAGCCCGCTGGGCACTCGGAGGCGCGCACGTCGTTCCCCGCCCTCCCGCCGCCGCCCG
CCCTCGCTCTCTCGCGCTACCCTCCCGCCGCCCGCGGTCTCCGTGCGTTCTCTCGTTAG
TCCACGGTCTGGTCTTCAGCTACCCGCCTTCGTCTCCGAGTTTGCGACTCGCGGACCGGC
GTCCCCGGCGCGAAGAGGCTGGACTCGGATTCGTTGCCTGAGCAATGGCTGCCATCCGG
30 AAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTCTTCA
GCAAGGACCAGTTCCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTGTTGAGAACTATGTGGCAGATAT
CGAGGTGGATGGAAAGCAGAAAACATCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAGCATTTTC
TGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGATGAGCACA
CAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAACCTGAAGAAGGCAGAGAT
35 ATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAAGATGGA
GTGAGAGAGGTTTTTGAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGGAAGAAA

AAATCTGGGTGCCTTGTCTTGTGAAACCTTGCTGCAAGCACAGCCCTTATGCGGTTAATTTT
GAAGTGCTGTTTATTAATCTTAGTGTATGATTACTGGCCTTTTTTCATTTATCTATAATTTACCT
AAGATTACAAATCAGAAGTCATCTTGCTACCAGTATTTAGAAGCCAACCTATGATTATTAACG
ATGTCCAACCCGTCTGGCCACCAGGGTCCTTTTGACACTGCTCTAACAGCCCTCCTCTGC
5 ACTCCACCTGACACACCAGGCGCTAATTCAAGGAATTTCTTAACTTCTTGCTTCTTTCTAG
AAAGAGAAACAGTTGGTAACTTTTTGTGAATTAGGCTGTAACACTTTTATAACTAACATGTCC
TGCCTATTATCTGTCAGCTGCAAGGTAAGTCTGGTGAGTCACCACTTCAGGGCTTTACTCCG
TAACAGATTTTGTGGCATAGCTCTGGGGTGGGCAGTTTTTTGAAAATGGGCTCAACCAGA
AAAGCCCAAGTTCATGCAGCTGTGGCAGAGTTACAGTTCTGTGGTTTCATGTTAGTTACCTT
10 ATAGTTACTGTGTAATTAGTGCCACTTAATGTATGTTACCAAAAATAAATATATCTACCCCAG
ACTAGATGTAGTATTTTTTGTATAATTGGATTTCCCTAATACTGTCATCCTCAAAGAAAGTGTA
TTGGTTTTTTAAAAAAGAAAGTGATTTGGAAATAAAGTCAGATGGAAAATTCATTTTTTAAA
TTCCCGTTTTTGTCACTTTTTCTGATAAAAGATGGCCATATTACCCCTTTTCGGCCCCATGTA
TCTCAGTACCCCATGGAGCTGGGCTAAGTAAATAGGAATTGGTTTCACGCCTGAGGCAATT
15 AGACACTTTGGAAGATGGCATAACCTGTCTCACCTGGACTTAAGCATCTGGCTCTAATTCA
CAGTGCTCTTTTCTCCTCACTGTATCCAGGTTCCCTCCCAGAGGAGCCACCAGTTCTCATG
GGTGGCACTCAGTCTCTCTCTCCAGCTGACTAACTTTTTTTCTGTACCAGTTAATTTTT
CCAACACTAATAGAATAAAGGCAGTTTTCTAAACTTCCTGTAAAAAAA

SEQ ID NO: 8

20 MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQKTSQKSGPQKSSI
SVPTCPSSWLGIRRIFGMMSTQGGG

SEQ ID NO: 9

AATAGTGGATGAGCTGTGAGTGCGCGCGCGTGCAGGGGCGCGACCTGTGCCGGCTC
GAGCCCGCTGGGCACTCGGAGGCGCGCACGTCGTTCCCCGCCCTCCCGCCGCCGCCG
25 CCCTCGCTCTCTCGCGCTACCCTCCCGCCGCCCGCGGTCTCCGTGCGTTCTCTCGTTAG
TCCACGGTCTGGTCTTCAGCTACCCGCCTTCGTCTCCGAGTTTGCGACTCGCGGACCGGC
GTCCCCGGCGCGAAGAGGCTGGACTCGGATTCGTTGCCTGAGCAATGGCTGCCATCCGG
AAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTCTTCA
GCAAGGACCAGTTCCCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTGAGAACTATGTGGCAGATAT
30 CGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAAGATTA
TGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTTTCCATC
GACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAGCATTCT
GTCCCAACGTGCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGATGAGCACA
CAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAACCTGAAGAAGGCAGAGAT
35 ATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAAGATGGA
GTGAGAGAGGTTTTTGAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGGAAGAAA

AAATCTGGGTGCCTTGTCTTGTGAAACCTTGCTGCAAGCACAGCCCTTATGCGGTTAATTTT
GAAGTGCTGTTTATTAATCTTAGTGTATGATTACTGGCCTTTTTTCATTTATCTATAATTTACCT
AAGATTACAAATCAGAAGTCATCTTGCTACCAGTATTTAGAAGCCAACCTATGATTATTAACG
ATGTCCAACCCGTCTGGCCACCAGGGTCCTTTTGACACTGCTCTAACAGCCCTCCTCTGC
5 ACTCCACCTGACACACCAGGCGCTAATTCAAGGAATTTCTTAACTTCTTGCTTCTTTCTAG
AAAGAGAAACAGTTGGTAACTTTTGTGAATTAGGCTGTAACACTTTTATAACTAACATGTCC
TGCCTATTATCTGTCAGCTGCAAGGTA CTCTGGTGAGTCACCACTTCAGGGCTTTACTCCG
TAACAGATTTTGTGGCATAGCTCTGGGGTGGGCAGTTTTTTGAAAATGGGCTCAACCAGA
AAAGCCCAAGTTCATGCAGCTGTGGCAGAGTTACAGTTCTGTGGTTTCATGTTAGTTACCTT
10 ATAGTTACTGTGTAATTAGTGCCACTTAATGTATGTTACCAAAAATAAATATATCTACCCCAG
ACTAGATGTAGTATTTTTTGTATAATTGGATTTCCCTAATACTGTCATCCTCAAAGAAAGTGTA
TTGGTTTTTTAAAAAAGAAAGTGATTTGGAAATAAAGTCAGATGGAAAATTCATTTTTTAAA
TTCCCGTTTTGTCACTTTTTCTGATAAAAGATGGCCATATTACCCCTTTTCGGCCCCATGTA
TCTCAGTACCCCATGGAGCTGGGCTAAGTAAATAGGAATTGGTTTCACGCCTGAGGCAATT
15 AGACACTTTGGAAGATGGCATAACCTGTCTCACCTGGACTTAAGCATCTGGCTCTAATTCA
CAGTGCTCTTTTCTCCTCACTGTATCCAGGTTCCCTCCCAGAGGAGCCACCAGTTCTCATG
GGTGGCACTCAGTCTCTCTCTCTCCAGCTGACTAACTTTTTTTCTGTACCAGTTAATTTTT
CCAACACTAATAGAATAAAGGCAGTTTTCTAAACTTCCTGTAAAAA

SEQ ID NO: 10

20 MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQE
DYDRLRPLSYPD TDVILMCF SIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFPCNVPIILVGNKKDLRNDEHTRR
ELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSGC
LVL

SEQ ID NO: 11

25 AATAGTGGATGAGCTGTGAGTGCGCGCGCGTGCGCGGGGCCGCGACCTGTGCCGGCTC
GAGCCCGCTGGGCACTCGGAGGCGCGCACGTCGTTCCCCGCCCTCCCGCCGCCGCCG
CCCTCGCTCTCTCGCGCTACCCTCCCGCCGCCCGCGGTCTCCGTCCGTTCTCTCGTTAG
TCCACGGTCTGGTCTTCAGCTACCCGCCTTCGTCTCCGAGTTTGCGACTCGCGGACCGGC
GTCCCCGGCGCGAAGAGGCTGGACTCGGATTCGTTGCCTGAGCAATGGCTGCCATCCGG
30 AAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTCTTCA
GCAAGGACCAGTTCCCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTGTTGAGAACTATGTGGCAGATAT
CGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAAGATTA
TGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTTTCCATC
GACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCCAAGTCAAGCATTCT
35 GTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGATGAGCACA
CAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCTCACTGTGTCGCCAGGCTGGAGTGC

TGTGGCACGATCTTGGCTCAACTGCAACCTCCGCCTCCCAGATTTAAGCGATTCCCCTGCC
TCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGGTTACAGGCGCCACTACCACACCCAGGAGCCGGTGAAA
CCTGAAGAAGGCAGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTCA
GCAAAGACCAAAGATGGAGTGAGAGAGGTTTTTGAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAA
5 GCTAGACGTGGGAAGAAAAAATCTGGGTGCCTTGTCTTGTGAAACCTTGTGCAAGCACA
GCCCTTATGCGGTTAATTTTGAAGTGCTGTTTATTAATCTTAGTGTATGATTACTGGCCTTTT
TCATTTATCTATAATTTACCTAAGATTACAAATCAGAAGTCATCTTGCTACCAGTATTTAGAA
GCCAACTATGATTATTAACGATGTCCAACCCGTCTGGCCCACCAGGGTCCTTTTGACACTG
CTCTAACAGCCCTCCTCTGCACTCCCACCTGACACACCAGGCGCTAATTCAAGGAATTTCT
10 TAACTTCTTGCTTCTTTCTAGAAAGAGAAACAGTTGGTAACTTTTGTGAATTAGGCTGTA
ACTTTATAACTAACATGTCCTGCCTATTATCTGTCAGCTGCAAGGTA
ACTTCTAGGGCTTTACTCCGTAACAGATTTTGTGGCATAGCTCTGGGGTGGGCAGTTTTTT
GAAAATGGGCTCAACCAGAAAAGCCCAAGTTCATGCAGCTGTGGCAGAGTTACAGTTCTGT
GGTTTCATGTTAGTTACCTTATAGTTACTGTGTAATTAGTGCCACTTAATGTATGTTACCAA
15 AATAAATATATCTACCCAGACTAGATGTAGTATTTTTTGTATAATTGGATTTCTAATACTG
TCATCCTCAAAGAAAGTGTATTGGTTTTTAAAAAGAAAGTGTATTTGGAAATAAAGTCAGA
TGAAAATTCATTTTTTAAATTCCCGTTTTTGTCACTTTTTTCTGATAAAAGATGGCCATATTAC
CCCTTTTCGGCCCATGTATCTCAGTACCCCATGGAGCTGGGCTAAGTAAATAGGAATTGG
TTTCACGCCTGAGGCAATTAGACACTTTGGAAGATGGCATAACCTGTCTCACCTGGACTTA
20 AGCATCTGGCTCTAATTCACAGTGCTCTTTTCTCCTCACTGTATCCAGGTTCCCTCCCAGAG
GAGCCACCAGTTCTCATGGGTGGCACTCAGTCTCTCTCTCCAGCTGACTAACTTTTTT
TCTGTACCAGTTAATTTTTCCAACACTAATAAGAAATAAAGGCAGTTTTTCTAACTTCCTGTAA
AAAAAAA

SEQ ID NO: 12

25 MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQE
DYDRLRPLSYPTDVLMLCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFPCPNVPIILVGNKKDLRNDEHTRR
ELAKMKQEPHCVARLECCGTILAQLQPPPPRFKRFPCLSLLSSWGYRRPLPHPGAGET

SEQ ID NO: 13

AATAGTGGATGAGCTGTGAGTGCGCGCGCGTGCGCGGGGCCGCGACCTGTGCCGGCTC
30 GAGCCCGCTGGGCACTCGGAGGCGCGCACGTCGTTCCCCGCCCTCCCGCCGCCGCCCG
CCCTCGCTCTCTCGCGCTACCCTCCCGCCGCCCGCGGTCTCCGTGCGTTCTCTCGTTAG
TCCACGGTCTGGTCTTCAGCTACCCGCCTTCGTCTCCGAGTTTGC GACTCGCGGACCGGC
GTCCCCGCGCGAAGAGGCTGGACTCGGATTGCTTGCCTGAGAGATGGTGTCTTGCTATG
TTGCCCAGACAGATCTTGTACTCCTGGGCTCAAGTTGTCCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAAG
35 TGCTGGGATTAAGATCAATGGCTGCCATCCGGAAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGA
GCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTCTTCAGCAAGGACCAGTTCCAGAGGTGTATG

TGCCACAGTGTGGAGAACTATGTGGCAGATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGT
TGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAAGATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACC
CAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTTCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATC
CCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAGCATTCTGTCCCAACGTGCCATCATCCTGGTTG
5 GGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGATGAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGC
AGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGCAGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGT
ACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAAGATGGAGTGAGAGAGGTTTTTGAATGGCTACGA
GAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGGAAGAAAAAATCTGGGTGCCTTGTCTTGTGAAACCT
TGCTGCAAGCACAGCCCTTATGCGGTTAATTTTGAAGTGCTGTTTATTAATCTTAGTGTATG
10 ATTACTGGCCTTTTTTCATTTATCTATAATTTACCTAAGATTACAAATCAGAAGTCATCTTGCT
ACCAGTATTTAGAAGCCAACCTATGATTATTAACGATGTCCAACCCGTCTGGCCCACCAGGG
TCCTTTTGACACTGCTCTAACAGCCCTCCTCTGCACTCCCACCTGACACACCAGGCGCTAA
TTCAAGGAATTTCTTAACCTTCTTGCTTCTTTCTAGAAAGAGAAACAGTTGGTAACTTTTGTGA
ATTAGGCTGTAACACTTTTATAACTAACATGTCCTGCCTATTATCTGTCAGCTGCAAGGTAC
15 TCTGGTGAGTCACCACTTCAGGGCTTTACTCCGTAACAGATTTTGTGGCATAGCTCTGGG
GTGGGCAGTTTTTTGAAAATGGGCTCAACCAGAAAAGCCCAAGTTCATGCAGCTGTGGCA
GAGTTACAGTTCTGTGGTTTCATGTTAGTTACCTTATAGTTACTGTGTAATTAGTGCCACTTA
ATGTATGTTACCAAAAATAAATATATCTACCCAGACTAGATGTAGTATTTTTTGTATAATTG
GATTTCCCTAATACTGTCATCCTCAAAGAAAGTGTATTGGTTTTTTAAAAAGAAAGTGTATTT
20 GGAAATAAAGTCAGATGGAAAATTCATTTTTTAAATTCCCGTTTTTGTCACTTTTTCTGATAAA
AGATGGCCATATTACCCCTTTTCGGCCCATGTATCTCAGTACCCCATGGAGCTGGGCTAA
GTAAATAGGAATTGGTTTCACGCCTGAGGCAATTAGACACTTTGGAAGATGGCATAACCTG
TCTCACCTGGACTTAAGCATCTGGCTCTAATTCACAGTGCTCTTTTCTCCTCACTGTATCCA
GGTTCCCTCCCAGAGGAGCCACCAGTTCTCATGGGTGGCACTCAGTCTCTCTTCTCTCCA
25 GCTGACTAACTTTTTTTCTGTACCAGTTAATTTTTCCAACCTACTAATAGAATAAAGGCAGTT
TTCTAAACTTCTGTAAAAA

SEQ ID NO: 14

MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQE
DYDRLRPLSYPDTDVILMCFSDSPDSLENIPEKWTPEVKHFPCPNVPIILVGNKKDLRNDHTRR
30 ELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSGC
LVL

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un método para el diagnóstico, clasificación y/o
seguimiento de la Hemorragia Subaracnoidea Espontánea en un individuo o sujeto, de ahora
en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a) y (b) según el
35 primer método de la invención, y además comprende:

c) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo individuos con Hemorragia Subaracnoidea Espontánea, si dicho individuo presenta una cantidad de producto de expresión del gen *RhoA* es de al menos el doble del rango de la población sana $P50_{(\text{sanos})} = 1,30700$; rango intercuartílico ($P25 = 0,76300$ y $P75 = 5,32200$).

- 5 En una realización más preferida, en el 95% de las ocasiones los enfermos se encontraron en los intervalos (4,54601 ng de *RhoA* - 6,28172 ng de *RhoA*).

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la Hemorragia Subaracnoidea es espontánea.

- 10 Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar el vasoespasmo cerebral tras la Hemorragia Subaracnoidea en un individuo o sujeto, de ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende:

a) cuantificar la actividad del producto de expresión del gen *RhoA* en una muestra biológica aislada de dicho individuo,

- 15 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el tercer método de la invención además comprende:

b) comparar las cantidades obtenidas en el paso a) con una cantidad de referencia para la actividad del producto de expresión del gen *RhoA*, donde la cantidad de referencia es el nivel medio de actividad del producto de expresión de dicho gen en individuos sanos.

- 20 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica aislada del paso a) son células mononucleares de sangre periférica.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica aislada del paso a) se selecciona de la lista que consiste en células de músculo liso vascular, líquido cefaloraquídeo (LCR), orina, líquido pleural y líquido peritoneal. La cuantificación de la actividad del gen *RhoA* puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica.

- 25 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la cuantificación de la actividad del producto de expresión del gen *RhoA* se realiza utilizando G-LISA.

- 30 La "técnica G-LISA" consiste, aunque sin limitarnos, en medir la Rho activada (Rho-GTP) a partir de muestras linfocitarias lisadas que se detectan posteriormente con un anticuerpo específico para *RhoA*, detectado con un anticuerpo secundario contra ratón conjugado con peroxidasa de rábano que al entrar en contacto con su sustrato se detecta por colorimetría. Los protocolos son conocidos por el experto en la materia, y se describen en el estado del arte, por ejemplo, pero sin limitarnos, en <http://www.cytoskeleton.com/pdf-storage/datasheets/bk124.pdf>.

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere a un método para predecir o pronosticar el vasoespasma cerebral tras la Hemorragia Subaracnoidea en un individuo, de ahora en adelante cuarto método de la invención, que comprende los pasos (a) y (b) según el tercer método de la invención, y además comprende:

- 5 c) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con un alto riesgo de desarrollar vasoespasma cerebral tras hemorragia subaracnoidea, si dicho individuo presenta actividad del producto de expresión del gen *RhoA* es al menos el doble del rango de la población que no sufre vasoespasma $P50_{(\text{Vasoespasma NO})} = 0,19000$; rango intercuartílico ($P25 = 0,06300$ y $P75 = 0,40050$).
- 10 En una realización más preferida, en el 95% de las ocasiones los enfermos se encontraron en los intervalos (0,27393 ng de RhoA – 0,88407 ng de RhoA).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la Hemorragia Subaracnoidea es espontánea.

- 15 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la cuantificación de la actividad del producto de expresión del gen *RhoA* del paso a) se realiza el primer día, preferiblemente el segundo día, más preferiblemente el tercer día, aún más preferiblemente el cuarto día desde la hemorragia subaranoidea.

Los métodos de la invención pueden desarrollarse independientemente o conjuntamente, en cualquier combinación de los mismos.

- 20 Los pasos (a), (b)y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la cuantificación del paso (a) o la comparación del paso (b) o la clasificación computarizada en el paso (c).

25 *KIT O DISPOSITIVO DE LA INVENCION, MICROARRAY DE LA INVENCION Y USOS*

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para detectar los productos de expresión del gen *RhoA* y/o su actividad, tal y como se han definido estos en el primer o segundo aspecto de la invención.

- 30 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención comprende sondas y/o cebadores diseñados a partir de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 y/o SEQ ID NO: 13 así

como opcionalmente todos aquellos elementos necesarios para llevar a cabo un procedimiento PCR.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión del gen *RhoA*:

5 - los cebadores o *primers* son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan un fragmento de su secuencia complementaria a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 y/o SEQ ID NO: 13.

10 - las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 80 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 200 y 500 pares de bases, que presentan un fragmento de su secuencia complementaria a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 y/o SEQ ID NO: 13.

15 - los anticuerpos son capaces de unirse a una región formada por cualquiera de las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 y/o SEQ ID NO: 14.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit puede contener oligonucleótidos diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm del gen, y/o capaces de hibridar con la secuencia del gen *RhoA*, para posterior amplificación por PCR. Más preferiblemente las secuencias de los gen *RhoA* son las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 y/o SEQ ID NO: 13, respectivamente. Preferiblemente, los oligonucleótidos presentan modificaciones en alguno de sus nucleótidos, como por ejemplo, pero sin limitarnos a, nucleótidos que tengan alguno de sus átomos con un isótopo radiactivo, normalmente ^{32}P o ^3H , nucleótidos marcados inmunológicamente, como por ejemplo con una molécula de digoxigenina, y/o inmovilizadas en una membrana. Varias posibilidades son conocidas en el estado de la técnica.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención comprende elementos que actúan como sustrato del producto de expresión del gen *RhoA*. Preferiblemente estos sustratos que actúan como producto de expresión del gen *RhoA* se seleccionan de la lista que consiste en GTP, GDP, o todos sus derivados naturales como ATP, CTP, TTP y UTP o todos sus derivados sintéticos.

El kit de la invención puede incluir controles positivos y/o negativos. El kit además puede

contener, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.

Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

Es también posible que el(los) oligonucleótido(s) estén inmovilizados en manchas sobre una superficie (preferiblemente sólida). En una de sus realizaciones, el kit comprende una micromatriz, o micromatriz de la invención. Una micromatriz de ARN es una matriz sobre un sustrato sólido (normalmente un porta de vidrio o una celda de una película fina de silicio) que evalúa grandes cantidades de diferentes ARN que son detectables mediante sondas específicas inmovilizadas sobre manchas sobre un sustrato sólido. Cada mancha contiene una secuencia específica de ácido nucleico, normalmente una secuencia de ADN, como sondas (o indicadores). Aunque el número de manchas no está limitado de manera alguna, existe una realización preferida en la que la micromatriz se personaliza para los procedimientos de la invención. En una realización, dicha matriz personalizada comprende cincuenta manchas o menos, tal como treinta manchas o menos, incluyendo veinte manchas o menos. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una micromatriz que comprende oligonucleótidos diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm del gen *RhoA*, y/o capaces de hibridar con la secuencias del gen *RhoA*. Más preferiblemente las secuencia del gen *RhoA* son las secuencias nucleotídicas S SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 y/o SEQ ID NO: 13., respectivamente.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos frente a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 y/o SEQ ID NO: 14 o frente a secuencias aminoacídicas que presenten un grado de identidad con dichas secuencias aminoacídicas de al menos del 85%.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los anticuerpos están modificados. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el anticuerpo es humano, humanizado o sintético. En otra realización preferida, el anticuerpo es monoclonal y/o se encuentra marcado con un fluorocromo. Preferiblemente, el fluorocromo se selecciona de la lista que comprende Fluoresceína (FITC), Tetrametilrodamina y derivados, Ficoeritrina (PE), PerCP, Cy5, Texas, alofococianina, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo comprende los elementos necesarios para llevar a cabo ensayos espectrofotométricos entre ellos el colorimétrico como el más importante (acción de la peroxidas de rábano), ensayos

fluorimétricos, ensayos calorimétricos, por quimioluminiscencia, ensayos radiométricos o cromatográficos para la realización de un ensayo enzimático.

Un **octavo aspecto** de la invención se refiere a un microarray, de ahora en adelante microarray de la invención, que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 y/o SEQ ID NO: 13.

Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos pueden ser construidas en la superficie de un chip mediante la elongación secuencial de una cadena en crecimiento con un sólo nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3' mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o virtual.

Así, las sondas de oligonucleótidos pueden ser de entre 10 y 100 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 20 y 70 nucleótidos, y aún más preferiblemente, de entre 24 y 30 nucleótidos.

La síntesis *in situ* sobre un soporte sólido (por ejemplo, vidrio), podría hacerse mediante tecnología chorro de tinta (ink-jet), lo que requiere sondas más largas. Los soportes podrían ser, pero sin limitarse a, filtros o membranas de NC o nylon (cargadas), silicio, o Portas de vidrio para microscopios cubiertos con aminosilanos, polilisina, aldehídos o epoxy. La sonda es cada una de las muestras del chip. El target es la muestra a analizar: miARN, ARN mensajero, ARN total, un fragmento de PCR, etc.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el microarray de la invención presenta oligonucleótidos modificados, como se han descrito en el anterior aspecto de la invención.

Un **noveno aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención o del microarray de la invención, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de la Hemorragia Subaracnoidea.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la Hemorragia Subaracnoidea es espontánea.

Un **décimo aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención o del microarray de la invención, para la obtención de datos útiles para predecir o pronosticar el vasoespasma cerebral tras la hemorragia subaracnoidea.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la Hemorragia Subaracnoidea es espontánea.

Un **décimo primer aspecto** de la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende un principio activo que se selecciona entre inhibidores de los canales de calcio (como el nimodipino), inhibidores de la farnesilación y prenilación de la proteína RhoA en la membrana plasmática (como las estatinas) e inhibidores de la ROCK (como el fasudil) en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento del vasoespasma cerebral tras la hemorragia subaracnoidea de un individuo identificable por el tercer o el cuarto método de la invención o por el kit o dispositivo de la invención.

10 Entre los bloqueantes de los canales del calcio se encuentran, pero sin limitarnos, las dihidropiridinas (como el amlodipino, barnidipino, felodipino, lacidipino, lercanidipino, nifedipino, nicardipino, nimodipino, nisoldipino, nitrendipino) y las fenilalquilaminas, como el verapamilo.

Entre las Estatinas se encuentran, pero sin limitarnos, la Atorvastatina, Cerivastatina, Fluvastatina, Lovastatina, Pitavastatina, Pravastatina, Simvastatina, y la Rosuvastatina.

15 Entre los inhibidores de la ROCK se encuentran, pero sin limitarse, el Fasudil.

La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención. Tales programas pueden tener la forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente compilada, o en cualquier otra forma adecuada para uso en la puesta en práctica de los procesos según la invención. Los programas de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dichos procedimientos.

Un **décimo segundo aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador que comprende instrucciones de programa para hacer que un ordenador lleve a la práctica el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención.

En particular, la invención abarca programas de ordenador dispuestos sobre o dentro de una portadora. La portadora puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el programa. Cuando el programa va incorporado en una señal que puede ser transportada directamente por un cable u otro dispositivo o medio, la portadora puede estar constituida por dicho cable u otro dispositivo o medio. Como variante, la portadora podría ser un circuito integrado en el que va incluido el programa, estando el circuito integrado adaptado para ejecutar, o para ser utilizado en la ejecución de, los procesos correspondientes.

Por ejemplo, los programas podrían estar incorporados en un medio de almacenamiento, como una memoria ROM, una memoria CD ROM o una memoria ROM de semiconductor, una

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

- 5 Un **décimo segundo aspecto** de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Un **décimo tercer aspecto** de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de
10 cualquiera de los métodos de la invención.

Otras definiciones:

Una "secuencia de ácido nucleico o polinucleótido" puede comprender las cinco bases que aparecen biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de las cinco que aparecen biológicamente. Estas bases pueden servir para distintos propósitos, por
15 ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para estimular o inhibir la degradación de la sonda; o como puntos de unión para restos detectables o restos de apantallamiento. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener uno o más restos de base modificados, no estándar, derivatizados, incluyendo, pero sin limitarse a, N⁶-metil-adenina, N⁶-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-
20 clouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1- metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁶-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-
25 manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo (es decir, timina), éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)_w, 2,6-diaminopurina, y 5-propinil pirimidina. Otros ejemplos de restos de bases
30 modificados, no estándar, o derivatizados pueden encontrarse en las Patentes de EEUU Nos. 6.001.611; 5.955.589; 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525; y 5.679.785. Además, una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender uno o más restos de azúcares modificados incluyendo, pero sin limitarse a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN o RNA) como desoxirribonucleótidos (ADN o DNA).

5 Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

10 En la presente invención se entiende por variante o fragmento biológicamente activo, aquellas variantes o fragmentos de los péptidos indicados que tienen un efecto fisiológico, metabólico o inmunológico igual, o presentan la misma utilidad que los descritos. Esto es, son funcionalmente equivalentes. Dichos efectos se pueden determinar mediante métodos convencionales.

15 El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12: 287 (1984) *Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI)*; BLAST, BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, 1999. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410).

20 El término "individuo" o "sujeto", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a un animal, preferiblemente a un mamífero, y más preferiblemente a un ser humano. El término "individuo" en esta memoria, es sinónimo de "paciente", y no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física. El individuo puede ser cualquiera, un individuo predispuesto a una enfermedad (por ejemplo, hemorragia subaracnoidea o vasoespasmos en pacientes que han sufrido una hemorragia subaracnoidea) o un individuo que
25 padece dicha enfermedad.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se
30 desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLO DE LA INVENCIÓN

Población del estudio

Se estudiaron un total de 39 individuos, de los cuales 24 fueron pacientes que habían sufrido una aHSA grave (Fisher 3 y Fisher 4). Véase tabla 1. También se evaluaron un grupo de 5 controles sanos (n=15) para estudiar los valores normales de la actividad, expresión de RhoA entre la población.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Virgen del Rocío y todos los familiares y representantes legales dieron su consentimiento informado por escrito.

10 **Tabla 2. Variables clínicas de la población objeto de estudio (GCS, Glasgow Coma Scale; APACHE, escala edad + escala fisiológica + enfermedad crónica; WFNS, World Federation of Neurological Surgeons, Fisher Mod, Fisher Modificado)**

Variable	n=24
Edad, Media (SD)	54 (12,88)
Mujer, n (%)	19 (79,2)
Hipertensión, n (%)	11 (45,8)
Diabetes mellitus, n (%)	1 (4,2)
Fumador, n (%)	10 (41,7)
Alcohol, n (%)	2 (8,3)
GCS, Media (SD)	10,08 (4,16)
APACHE II, Media (SD)	10,71 (5,28)
Hunt y Hess, Media (SD)	3,33 (1,05)
WFNS, Media (SD)	3,29 (1,27)
Fisher Mod, Media (SD)	16 (66,7)
Arteriografía cerebral, n (%)	24 (100)
Terapia endovascular, n (%)	22 (91,7)
Hidrocefalia, n (%)	15 (62,5)
Nimodipina, n (%)	23 (95,8)
Vasoespasma, n (%)	13 (54,2)
Resangrado, n (%)	3 (12,5)
Supervivencia-6 m, n (%)	20 (83,3)

Determinación del vasoespasma

15 Se consideró la presencia de vasoespasma ante la presencia de vasoespasma bajo criterios clínicos, sonográficos o arteriográficos. Concretamente, se consideró la existencia de

vasoespasmos clínicos ante la presencia de deterioro del nivel de conciencia igual o superior a 2 puntos de la GCS o a la aparición de déficit focal, no atribuibles a resangrado, hematoma, hidrocefalia o alteraciones metabólicas. El vasoespasmos sonográfico de Arteria Cerebral Media (ACM) a la existencia de una Velocidad media (Vm) a nivel de ACM superior a 120 cm/seg junto con un valor en el Índice de Lindergaard igual o superior a 3) (Lindergaard y col., 1989). Finalmente, se catalogó como vasoespasmos arteriográficos aquel confirmado mediante la realización de una arteriografía cerebral de circulación anterior y posterior en el que se objetiva la disminución de calibre de las arterias del Polígono de Willis o sus ramas.

Determinación de la gravedad clínica

Al ingreso de los pacientes se estableció el nivel de gravedad clínica, mediante el uso de la GCS. Esta escala lleva a cabo una valoración del nivel de conciencia, que permite a través de los cambios en su puntuación reflejar el estado evolutivo del paciente. La medida se lleva a cabo mediante la suma de tres respuestas independientes: apertura ocular, respuesta verbal y motora. La escala representa la suma del valor numérico de cada una de las categorías. El valor máximo corresponde a 15 puntos, que implica un nivel de conciencia normal. Siendo el valor mínimo de 3 puntos, el cual se alcanza ante una respuesta de coma arreactivo.

Medida de la actividad y expresión de RhoA.

Se extrajeron muestras seriadas de sangre periférica de pacientes los días 1 hasta el 13 tras el ingreso en el hospital. El protocolo para el aislamiento de células mononucleares a partir de la muestra de sangre se lleva a cabo con 8 ml de sangre siguiendo el siguiente proceso. Las muestras de sangre completa humana se recogen en tubos BD Vacutainer® CPT™ con heparina sódica. Estos tubos están especialmente diseñados para la preparación y separación de linfocitos a partir de sangre completa. Las muestras de sangre han sido extraídas de pacientes ubicados en UCI o en urgencias del Hospital Virgen del Rocío bajo condiciones asépticas y por personal altamente cualificado. El medio que usamos para la separación celular está compuesto de un gel de poliéster y de un gradiente de densidad líquido. Esta configuración permite la separación de células en una única etapa de centrifugación. El resultado es un cómodo sistema, donde en un solo tubo, se realiza la recogida de sangre total y la separación de linfocitos. El tubo de preparación celular BD Vacutainer® CPT™ con heparina sódica reduce el riesgo de contaminación de la muestra y elimina la necesidad de usar tubos, pipetas, y reactivos adicionales. Los tubos CPT fueron almacenados a temperatura ambiente (18-25°C). En el momento de la extracción los tubos fueron perfectamente identificados con los datos del paciente. Después de la recogida de la muestra, el tubo fue almacenado en posición vertical a temperatura ambiente y en oscuridad hasta la centrifugación. Las muestras fueron centrifugadas antes de las 2 horas para una mejor obtención de resultados. Se centrifugó la muestra a temperatura ambiente (18-25°C) en un rotor horizontal

(cabezal basculante) durante 20 min a 1800 Xg. Mezclamos suavemente la muestra de sangre inmediatamente antes de la centrifugación invirtiendo el tubo 8-10 veces. Después de la centrifugación, las células mononucleares estarán en una capa blanquecina justo debajo de la columna de plasma. Se puede aspirar el plasma sin perturbar la capa de células. Las células se recogen inmediatamente después de la centrifugación para una mejor obtención de los resultados y se lavan en 2 ml de PBS a 4°C y se centrifugarán nuevamente a 300 Xg durante 10 min. Se retira todo el sobrenadante dejando bien seco el pellet y se congelan las células a -80°C hasta el momento de su análisis.

La actividad y expresión de RhoA se determinó siguiendo los pasos indicados por del fabricante.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis estadísticos descriptivos y de frecuencia. Las variables cuantitativas se expresaron con medias y desviaciones típicas o, si las distribuciones eran asimétricas, mediante medianas y percentiles (P25 y P75), mientras que las variables cualitativas se resumieron con tablas de frecuencias y porcentajes. Para comparar la información de tipo cuantitativo en dos subgrupos de estudio se utilizó el test de comparación de medias t-Student o, en caso de que no cumplieran los requisitos de aplicación de ésta, la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Para analizar la relación entre variables de tipo cualitativo, se elaboraron tablas de contingencia y se aplicó el test Chi-cuadrado. Se realizó análisis mediante curva ROC. Este procedimiento permitió la clasificación de un individuo en uno de dos grupos, en base al valor de RhoA. A su vez, proporcionó como estadístico el área situada bajo la curva ROC (AUC). El análisis de correlación se llevó a cabo mediante el Test de Spearman. Este coeficiente es una medida de asociación lineal que utiliza y compara los rangos de diferentes variables cuantitativas. La interpretación del coeficiente de Spearman concuerda en valores próximos a 1; indican una correlación fuerte y positiva. Valores próximos a -1 indican una correlación fuerte y negativa. Valores próximos a cero indican que no hay correlación lineal. En todos los contrastes de hipótesis se ha considerado un nivel de significación de 0,05. El análisis de los datos se realizó mediante el software estadístico: *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (versión 20,0, Chicago, IL, USA).

Tabla 3. Resultados de Curva ROC de los valores de la expresión de RhoA entre individuos sanos y enfermos, a lo largo de 13 días de seguimiento. AUC=Área Bajo la Curva. Tabla representativa de las curvas ROC entre sanos y enfermos para el curso temporal estudiado (desde día 1 hasta día 13).

Día	AUC (Área bajo la curva)	I.C.	P-valor
0	0,800	(0,609-0,991)	0,036*
1	0,764	(0,558-0,970)	0,014*

2	0,781	(0,585-0,977)	0,010*
3	0,765	(0,563-0,967)	0,011*
4	0,757	(0,564-0,951)	0,018*
5	0,739	(0,536-0,942)	0,036*
6	0,771	(0,59-0,953)	0,013*
7	0,761	(0,567-0,955)	0,022*
8	0,770	(0,571-0,970)	0,030
9	0,667	(0,396-0,937)	0,317
10	0,790	(0,609-0,971)	0,009**
11	0,824	(0,651-0,998)	0,005**
12	0,811	(0,626-0,996)	0,029*
13	0,800	(0,610-0,990)	0,026*

REIVINDICACIONES

1.- Un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de la Hemorragia Subaracnoidea en un individuo, o para predecir o pronosticar el vasoespasmo cerebral tras la Hemorragia Subaracnoidea en un individuo, que comprende:

5 a) cuantificar el producto de expresión del gen *RhoA* en una muestra biológica aislada de dicho individuo;

b) comparar las cantidades obtenidas en el paso a) con una cantidad de referencia, donde la cantidad de referencia del producto de expresión del gen *RhoA* es el nivel medio de producto de expresión de dicho gen en individuos sanos;y

10 c) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo individuos con Hemorragia Subaracnoidea, si dicho individuo presenta una **cantidad** de producto de expresión del gen *RhoA* de al menos el doble del rango de la población sana ($P50_{(\text{sanos})} = 1,30700$ ng de *RhoA*); o

15 c) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con un alto riesgo de desarrollar vasoespasmo cerebral, si dicho individuo presenta actividad del producto de expresión del gen *RhoA* es al menos el doble del rango de la población que no sufre vasoespasmo ($P50_{(\text{Vasoespasmo NO})} = 0,19000$ ng de *RhoA*).

2.- El método según la reivindicación 1, donde la Hemorragia Subaracnoidea es espontánea.

3.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde la muestra biológica aislada del paso a) son células mononucleares de sangre periférica.

20 4.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la cuantificación de la actividad del producto de expresión del gen *RhoA* del paso a) se realiza utilizando técnicas inmunológicas.

25 5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la cuantificación de la actividad del producto de expresión del gen *RhoA* del paso a) se realiza utilizando la técnica ELISA o la técnica G-LISA.

6.- Un kit que comprende sondas y/o cebadores diseñados a partir de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 y/o SEQ ID NO: 13, adecuadas para cuantificar el producto de expresión del gen *RhoA* en una muestra biológica aislada de un individuo.

30 7.- Un kit que comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos frente a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8,

SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 y/o SEQ ID NO: 14, adecuados para cuantificar el producto de expresión del gen RhoA en una muestra biológica aislada de un individuo..

8.- Uso del kit tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de la Hemorragia Subaracnoidea.

9.- Uso del kit tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, para la obtención de datos útiles para predecir o pronosticar el vasoespasmo cerebral tras la hemorragia subaracnoidea.

10.- El uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, donde la Hemorragia Subaracnoidea es espontánea.

FIGURAS

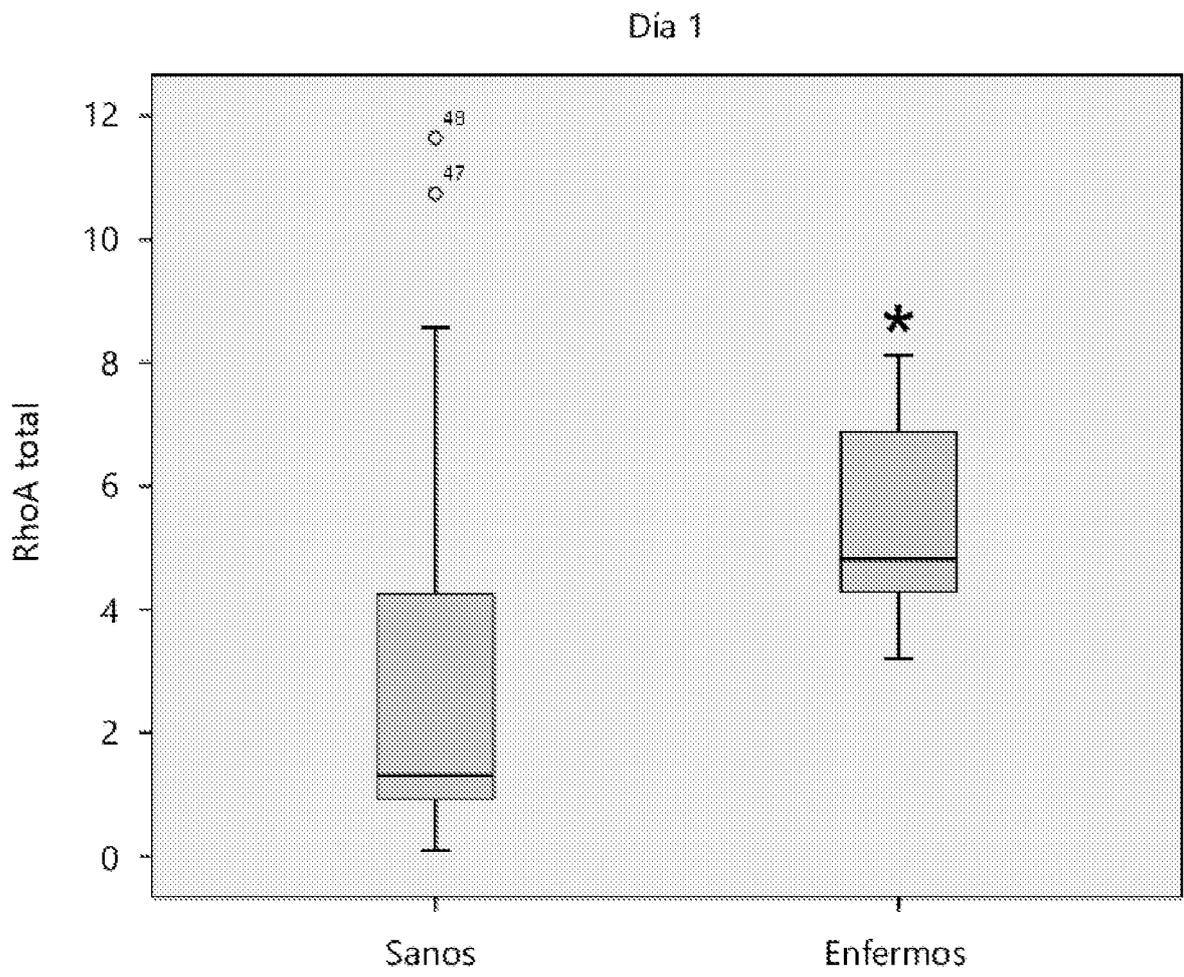


Fig.1

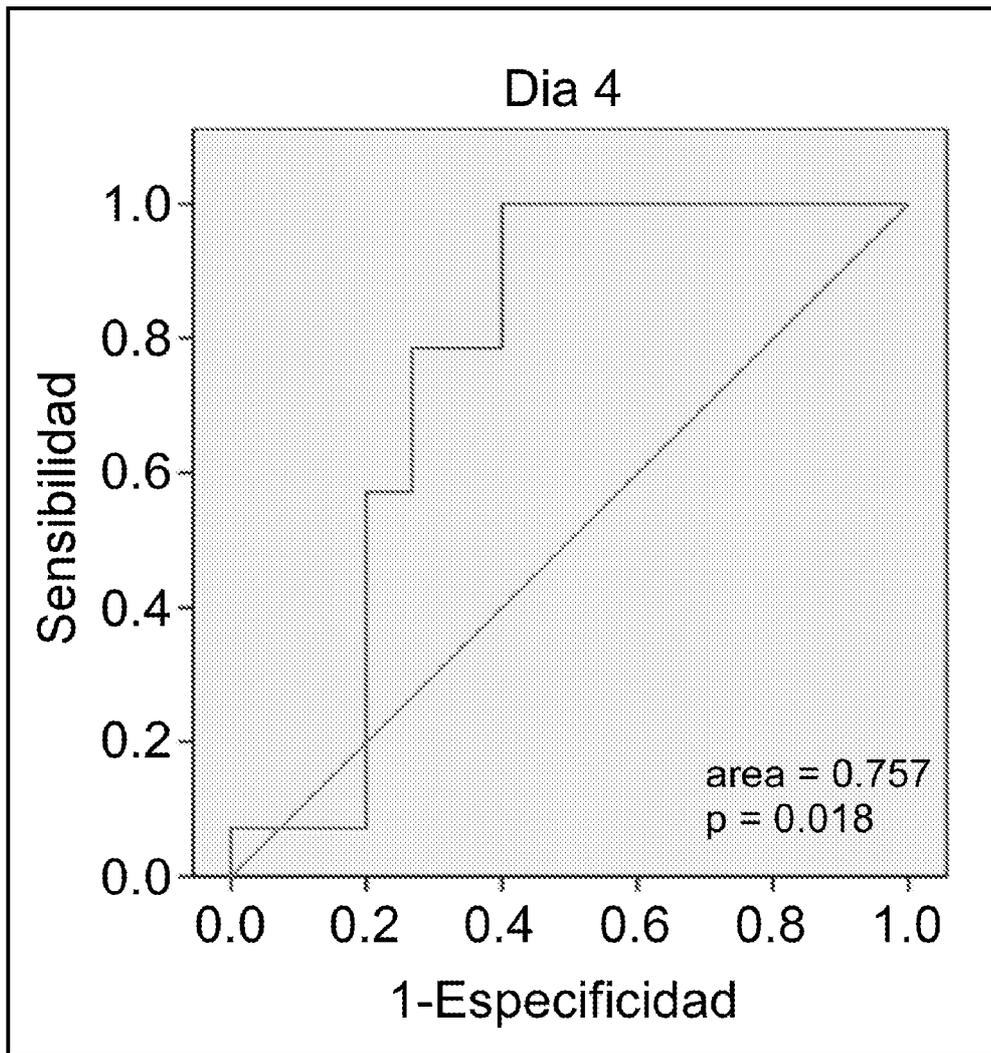


Fig.2

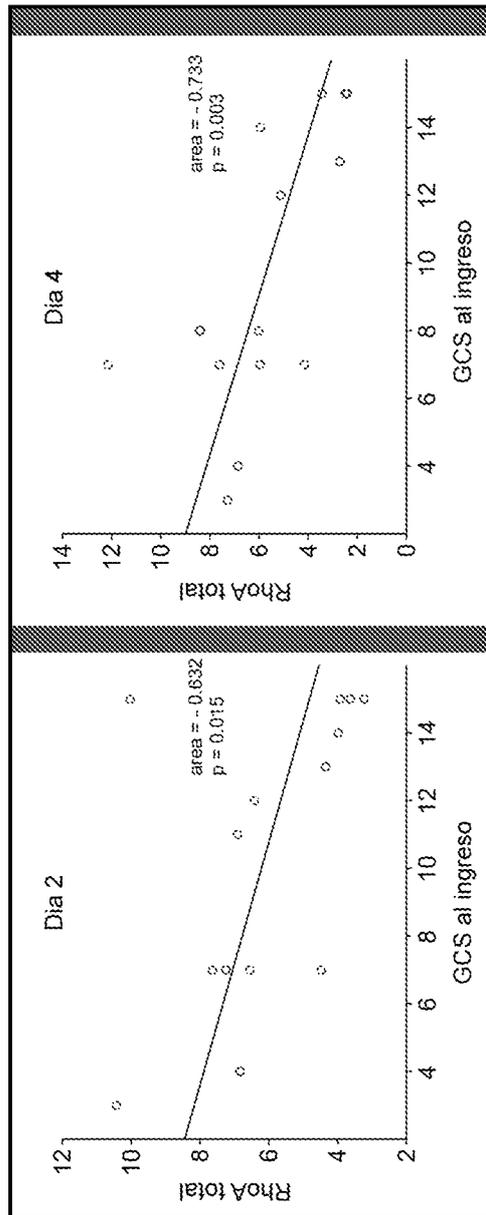


Fig.3

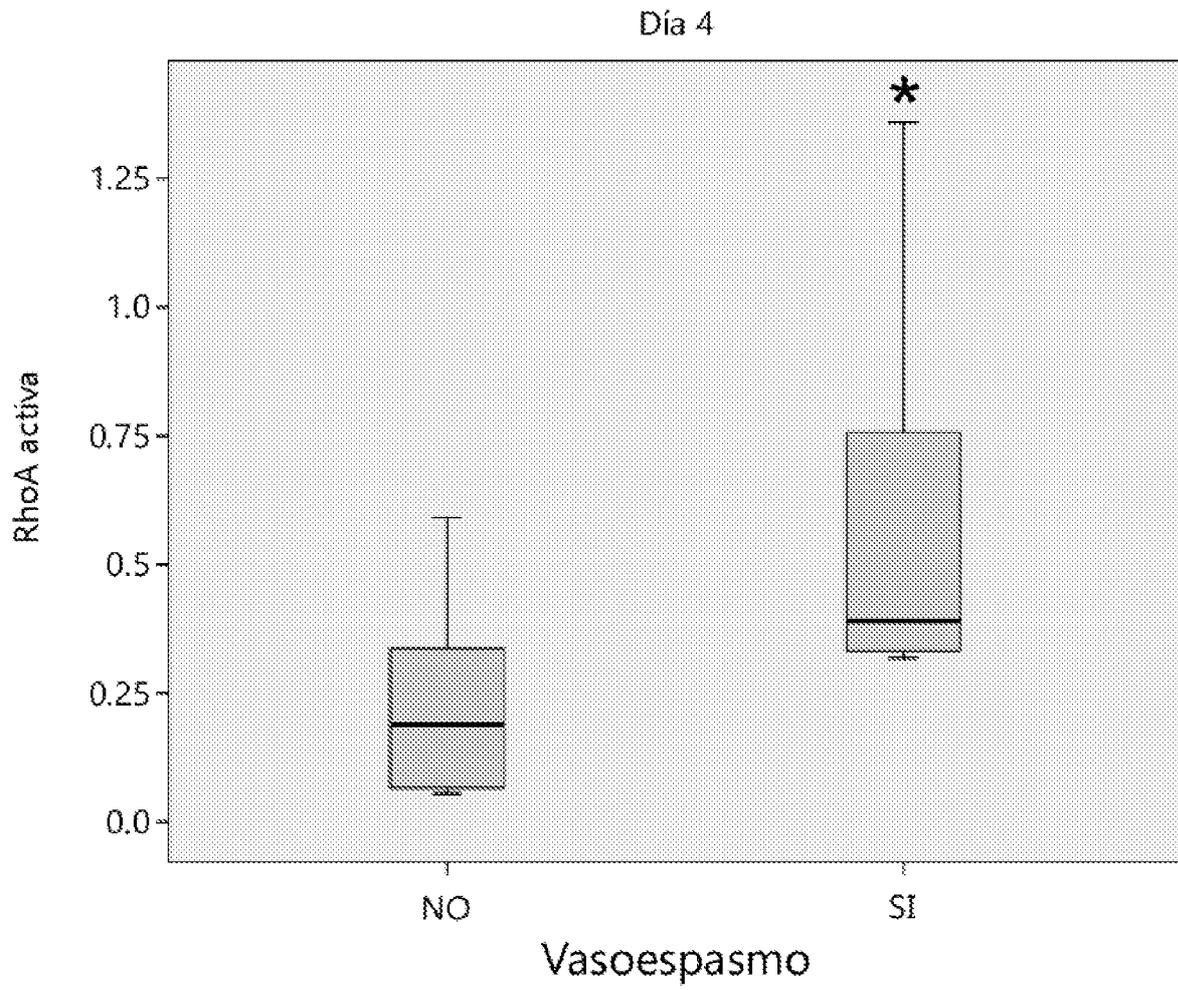


Fig.4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2017/070862

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/541 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, PATENW, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MIYAGI Y. et al. Upregulation of rho A and rho kinase messenger RNAs in the basilar artery of a rat model of subarachnoid hemorrhage. <i>J. Neurosurg</i> , 09/2000, Vol. 93, Pages 471-476 (the whole document)	1-5
X	EGEA-GUERRERO J. J. et al. Role of L-type Ca ²⁺ channels, sarcoplasmic reticulum and Rho kinase in rat basilar artery contractile properties in a new model of subarachnoid hemorrhage. <i>Vascular Pharmacology</i> , 29/04/2015, Vol. 72, Pages 64-72 (the whole document)	1-5

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
26/04/2018

Date of mailing of the international search report
(03/05/2018)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
M. Cumbreño Galindo

Telephone No. 91 3496880

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2017/070862

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MA S. et al. Development of Second-Generation Small-Molecule RhoA Inhibitors with Enhanced Water Solubility, Tissue Potency, and Significant in vivo Efficacy. ChemMedChem, 5/11/2014, Vol. 10, Pages 193-206 (the whole document)	1-5
X	WINARDI W. et al. Attenuation of Cerebral Vasospasm Following Experimental Subarachnoid Hemorrhage by the Bronchodilator KMUP-3. Acta Neurochir Suppl, 2013, Vol. 115, Pages 239-246 (the whole document)	1-5
X	WANG C. et al. Alteration of Basilar Artery Rho-Kinase and Soluble Guanylyl Cyclase Protein Expression in a Rat Model of Cerebral Vasospasm following Subarachnoid Hemorrhage, Article ID 531508. BioMed Research International, 01/06/2014, Vol. 2014, Pages 1-8 (the whole document)	1-5
A	G-LISA® RhoA Activation Assay . 09/09/2016 [on line][retrieved on 25/04/2018]. Retrieved of Internet <URL: https://web.archive.org/web/20160515000000/http://www.cytoskeleton.com/pdf-storage/datasheets/bk124.pdf > (the whole document)	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2017/070862

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.: **6-10**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2017/070862

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
G01N33/541 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, PATENW, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	MIYAGI Y. et al. Upregulation of rho A and rho kinase messenger RNAs in the basilar artery of a rat model of subarachnoid hemorrhage. J. Neurosurg, 09/2000, Vol. 93, Páginas 471-476 (todo el documento)	1-5
X	EGEA-GUERRERO J. J. et al. Role of L-type Ca ²⁺ channels, sarcoplasmic reticulum and Rho kinase in rat basilar artery contractile properties in a new model of subarachnoid hemorrhage. Vascular Pharmacology, 29/04/2015, Vol. 72, Páginas 64-72 (todo el documento)	1-5

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
26/04/2018

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
03 de mayo de 2018 (03/05/2018)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Cumbreño Galindo
Nº de teléfono 91 3496880

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2017/070862

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	MA S. et al. Development of Second-Generation Small-Molecule RhoA Inhibitors with Enhanced Water Solubility, Tissue Potency, and Significant in vivo Efficacy. ChemMedChem, 5/11/2014, Vol. 10, Páginas 193-206 (todo el documento)	1-5
X	WINARDI W. et al. Attenuation of Cerebral Vasospasm Following Experimental Subarachnoid Hemorrhage by the Bronchodilator KMUP-3. Acta Neurochir Suppl, 2013, Vol. 115, Páginas 239-246 (todo el documento)	1-5
X	WANG C. et al. Alteration of Basilar Artery Rho-Kinase and Soluble Guanylyl Cyclase Protein Expression in a Rat Model of Cerebral Vasospasm following Subarachnoid Hemorrhage, Article ID 531508. BioMed Research International, 01/06/2014, Vol. 2014, Páginas 1-8 (todo el documento)	1-5
A	G-LISA® RhoA Activation Assay . 09/09/2016 [en línea][recuperado el 25/04/2018]. Recuperado de Internet <URL: https://web.archive.org/web/20160515000000/http://www.cytoskeleton.com/pdf-storage/datasheets/bk124.pdf > (todo el documento)	1-5

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones n^{os}:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones n^{os}: **6-10**
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

El objeto de las reivindicaciones 6-10 no alcanza a cumplir los requisitos de claridad y concisión, ni están fundadas en la descripción (Artículo 6 del PCT).

3. Las reivindicaciones n^{os}:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n^{os}:
4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n^{os}:

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.