



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 108**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03752920 .3**

96 Fecha de presentación : **20.05.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1510587**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.03.2005**

54 Título: **Cebadores de amplificación de ácidos nucleicos para detectar citoqueratinas y método de examen con uso de los cebadores.**

30 Prioridad: **21.05.2002 JP 2002-145689**
17.06.2002 JP 2002-175271
09.07.2002 JP 2002-199759

73 Titular/es: **SYSMEX CORPORATION**
1-5-1, Wakinohama-Kaigandori, Chuo-ku
Kobe-shi, Hyogo 651-0073, JP

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.10.2011

72 Inventor/es: **Tada, Sachiyo;**
Akai, Yasumasa;
Imura, Yasuyuki;
Abe, Shigeki y
Minekawa, Harumi

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.10.2011

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 367 108 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cebadores de amplificación de ácidos nucleicos para detectar citoqueratinas y método de examen con el uso de los cebadores

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un conjunto de cebadores de amplificación de ácidos nucleicos para la detección de la citoqueratina 19 humana por el método LAMP.

10

Técnica antecedente

Las citoqueratinas (denominadas en lo sucesivo "CK") son proteínas que forman el esqueleto fibroso de una célula y forman una familia de al menos 20 genes. Como dichas citoqueratinas se conocen la CK18 humana, CK19 humana, CK20 humana y similares. Las CK se expresan en células epiteliales.

15

Por ejemplo, ciertos informes previos describieron que la CK18 humana se expresa no solo en tejidos normales tales como glándula mamaria, pulmón, intestino delgado y estómago, sino también en tejidos cancerosos, mientras que la CK18 humana no se expresa en ganglios linfáticos que no son tejidos epiteliales. En cuanto a la CK19 humana, ciertos informes previos describieron que se expresa en cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de próstata y similares, y se observó una diferencia en el nivel de expresión de la CK19 humana entre tejidos normales y tejidos cancerosos. En cuanto a la CK20 humana, diversos informes describieron que se expresa en cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de células Merkel, cáncer mucoso ginecológico, cáncer de células de transición, cáncer pancreático y cáncer de conductos biliares, y también en este caso se observa una diferencia en el nivel de expresión de CK20 humana entre tejidos normales y tejidos cancerosos.

20

25

En relación con los hechos anteriores, es posible conocer la presencia/ausencia de metástasis de cáncer mediante el examen de la presencia/ausencia de expresión de CK18 humana, CK19 humana y/o CK20 humana en tejidos tales como ganglios linfáticos. También es posible conocer la presencia/ausencia de metástasis de cáncer buscando los que presentan diferencias en el nivel de expresión entre tejidos normales y tejidos cancerosos.

30

Una célula cancerosa que deja el sitio primario de la lesión metastatizará en el cuerpo a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático. En una operación quirúrgica de cáncer, se necesita una detección precisa de la metástasis y un tratamiento apropiado basado en el grado de metástasis para eliminar las lesiones de una forma tan fiable como sea posible. Por esta razón, tiene una gran importancia el diagnóstico intraoperatorio de metástasis de cáncer en ganglios linfáticos. Por ejemplo, en el caso del cáncer de mama, la zona a eliminar se está volviendo más pequeña para mejorar la CDV, y el diagnóstico de metástasis en ganglios linfáticos durante la cirugía puede ser una pauta importante para determinar el mínimo de disección de ganglios linfáticos. En caso de cáncer esofágico, la detección de un sitio en el que se produce metástasis de ganglios linfáticos puede proporcionar directrices para la selección y determinación de procedimientos operatorios incluyendo ventrotomía, toracotomía e incisión en collar. En caso de cáncer de próstata, la presencia de metástasis en ganglios linfáticos proporcionará directrices para decidir aplicar una terapia hormonal mientras se detiene la prostatectomía. También en caso de cáncer de estómago, dará directrices para seleccionar un procedimiento operatorio y una estrategia terapéutica después de la cirugía. Teniendo en cuenta la carga sobre el paciente, debe realizarse rápidamente el diagnóstico intraoperatorio de metástasis de cáncer.

35

40

45

Un procedimiento para diagnosticar metástasis de cáncer en ganglios linfáticos es detectar proteínas CK que son marcadores tumorales. Por ejemplo, esto se consigue congelando un ganglio linfático reseccionado y tiñendo una sección del tejido congelado. Sin embargo, este procedimiento va acompañado del riesgo de que se pasen por alto micrometástasis porque solo se basa en la información sobre la sección.

50

Un desarrollo reciente en técnicas de análisis de genes ha permitido diagnósticos eficaces de cáncer mediante la detección de la expresión de genes de marcadores tumorales. Por ejemplo, la técnica PCR permite amplificar un fragmento de ADN diana varios cientos de veces por repetición de la disociación de cadenas de ADN en un ADN monocatenario, unión de cebadores que intercalan una región específica en la cadena de ADN y síntesis de ADN por la ADN polimerasa (véase el documento JP-A 61-274697), y puede usarse como técnica de análisis muy sensible para ácidos nucleicos en diversos tipos de muestras. Por ejemplo, como la técnica PCR puede analizar ácidos nucleicos en muestras obtenidas a partir de fluidos o tejidos del cuerpo de un animal, es útil para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas, cánceres y similares.

55

60

Para la detección del ARN, puede usarse la técnica RT-PCR. La técnica RT-PCR implica extraer ARN, por ejemplo, a partir de tejidos tumorales; sintetizar ADNc con la ayuda de la transcriptasa inversa (RT) usando oligo (dT) o un hexámero aleatorio como cebador; y amplificar el ADNc usando la técnica PCR para la detección. Se ha notificado el caso ejemplar del diagnóstico de tumor de fibroblastos usando la técnica RT-PCR (Hokkaido Igaku Zasshi p.135-141, Vol.66 (2), (1991)). La RT-PCR hace posible detectar la expresión de ARNm de CK a partir de tejidos extirpados, de forma que puede evitarse el problema, en alguna medida, de que se pasen por alto metástasis de

65

cáncer. En el campo de diagnóstico de tumores o cánceres, se han puesto en uso práctico dichos métodos de amplificación de ácidos nucleicos ("Kanai's manual of clinical laboratory medicine", 31ª ed., págs. 1314, KANEHARA&Co., LTD., publicado el 20 de septiembre de 1998).

5 Sin embargo, la técnica PCR necesita una operación para desnaturalizar un ADN molde a partir de un ADN bicatenario en una sola cadena, y además requiere reacciones de amplificación repetitivas en varias condiciones de temperatura. Además, en general, se tardan aproximadamente dos horas en obtener un producto amplificado detectable, de forma que no era deseable como ensayo intraoperatorio que requiere rapidez.

10 Como método de amplificación de ADN distinto de la técnica PCR, se ha presentado el método LAMP (véase la Publicación Internacional WO 00/28082). El método LAMP es un método de amplificación génica que usa una pluralidad de cebadores incluyendo un cebador que forma una estructura de horquilla en un extremo del producto amplificado según avanza la reacción de desplazamiento de cadena. En una reacción inicial, usando dos tipos de
15 cebadores internos (FIP, RIP) y dos tipos de cebadores externos (cebador F3, cebador R3) y una ADN polimerasa de desplazamiento de cadena, se sintetiza una estructura de tipo pesa que tiene un bucle monocatenario en cada extremo a partir de un ADN molde. Partiendo de esta estructura, se realiza el ciclo de amplificación de forma que la extensión y síntesis del ADN continúan en el propio ADN como molde, desde el extremo 3' de esta estructura. El producto amplificado comprende una estructura repetida de múltiples unidades, y cada unidad comprende un conjunto de regiones complementarias en la misma cadena que forman una región a amplificar intercalada entre los
20 cebadores donde dos ácidos nucleicos tienen secuencias de bases invertidas. El método LAMP no requiere la operación de desnaturalización de un ADN molde desde una doble cadena a una sola cadena por calentamiento, y se caracteriza por un proceso de amplificación continuo a una temperatura constante (véase Bio Venture, Vol. 1, p. 109-115 (2001) y BIO INDUSTRY, Vol.18, No.2, p.15-29 (2001)). Cuando el molde es ARN, es posible sintetizar la estructura de partida de una manera similar añadiendo una transcriptasa inversa a la composición de la mezcla de
25 reacción, con lo que puede realizarse la amplificación (método RT-LAMP). De acuerdo con el método LAMP, puede obtenerse una cantidad suficiente de producto amplificado para la detección en aproximadamente 30 minutos. Por lo tanto, el tiempo necesario para la detección se reduce, de manera que puede aplicarse para el diagnóstico de metástasis de cáncer en ganglios linfáticos con el objetivo, por ejemplo, de una determinación rápida de la estrategia terapéutica. Además, como puede conseguirse un resultado rápidamente, también es de esperar la aplicación al
30 diagnóstico intraoperatorio.

El concepto básico de cebadores aplicados al método LAMP puede encontrarse en la Publicación Internacional nº WO 00/28082 y en la Publicación Internacional nº WO 02/24902.

35 Ya se han presentado cebadores y sondas a usar en PCR para la detección de CK18 humana (véase Gene, 159(1), p. 43-47 (1995)). De forma similar, también se han presentado cebadores o sondas a usar en PCR para la detección de CK19 humana (véase el documento USP Nº 6.203.992 y Breast Cancer Research and Treatment 60, p. 143-151 (2000)). También se han presentado cebadores o sondas a usar en PCR para la detección de CK20 humana (véase British J. of Cancer, 77(8), p. 1327-1332(1998) y British J. of Cancer, 82(1), p157-160 (2000)).

40 El documento WO 96/17080 describe un método para determinar si un paciente humano tiene un tumor o si el tumor ha metastatizado, que comprende determinar si está presente un producto génico de citoqueratina 20 en una muestra de tejido. El documento también analiza la posibilidad de determinar el ARNm de citoqueratina 20 por RT-PCR.

45 El documento US 6.057.105 describe métodos para detectar metástasis de melanoma y células de cáncer de mama mediante la detección de ácidos nucleicos de genes marcadores. Se menciona CK20 en el contexto de un método para detectar células de cáncer de mama metastático en un paciente. El documento presenta datos sobre RT-PCR de genes específicos tales como Mart1, Mage3 y tirosinasa en muestras de pacientes.

50 El documento WO 01/39784 describe cebadores de RT-PCR para la queratina 19 de rata.

El campo técnico de ese documento está relacionado con células madre pancreáticas y su uso en transplantes.

55 El documento WO 01/98539 presenta métodos para el diagnóstico e identificación de cáncer de pulmón que pueden incluir la identificación de la citoqueratina 19. El documento también hace referencia a la detección por RT-PCR de CK19.

60 El documento WO 01/29264 presenta un método de amplificación de una secuencia diana de CK19 por PCR. Los documentos notifican que pueden emplearse cebadores y sondas en métodos basados en la amplificación para detectar la presencia de secuencias de CK19 en una muestra de ensayo.

65 Sin embargo, nadie ha presentado cebadores para aplicar al método LAMP destinado a la detección de CK humanas, y existe la necesidad de desarrollar dichos cebadores. Además, en cuanto a la aplicación de los cebadores a otros medios de amplificación de ácidos nucleicos, existe la necesidad de construir un nuevo cebador o un conjunto de cebadores que sea útil para la detección además de los cebadores conocidos.

(Documento de la técnica convencional)

Documento de Patente 1: Publicación Internacional N° W0 00/28082

Documento de Patente 2: Publicación Internacional N° W0 02/2490

5 Documento de Patente 3: USP N° 6.203.992

Documento no relacionado con patente 1: Bio Venture, Vol. 1, p. 109-115 (2001)

Documento no relacionado con patente 2: BIO INDUSTRY, Vol.18, No. 2, p.15-29 (2001)

Documento no relacionado con patente 3: Gene, 159(1), p.43-47(1995)

Documento no relacionado con patente 4: Breast Cancer Research and Treatment 60, p.143-151 (2000)

10 Documento no relacionado con patente 5: British J. of Cancer, 77(8), p.1327-1332(1998)

Documento no relacionado con patente 6: British J. of Cancer, 82(1), p157-160 (2000)

Descripción de la invención

15 (Problemas a solucionar por la invención)

Es un objeto de la presente invención proporcionar nuevos cebadores para uso en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos para detectar CK humanas. Más específicamente, la presente invención se refiere a la disposición de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos de acuerdo con el método LAMP.

20 (Medios para solucionar los problemas)

Los inventores han investigado diligentemente para solucionar los problemas anteriores, y finalmente construyeron cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos que pueden aplicarse eficazmente al método LAMP y usarse para detectar CK19 humana.

25 Es decir, la presente invención incluye:

30 1. Un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos para detectar citoqueratina 19 humana por el método LAMP, que comprende al menos cuatro tipos de cebadores, donde dicho primer conjunto comprende un oligonucleótido de acuerdo con la SEC ID N°: 419 o una cadena complementaria de la SEC ID N°: 419; o un cebador capaz de hibridar con el cebador de acuerdo con la SEC ID N°: 419 o el complemento del mismo en condiciones rigurosas.

35 2. Un método para detectar citoqueratina 19 humana por el método LAMP usando el conjunto de cebadores de acuerdo con el punto 1.

40 3. Uso del conjunto de cebadores de acuerdo con el punto 1 para la detección de un ácido nucleico de citoqueratina 19 en una muestra usando el método LAMP

Breve descripción de los dibujos

45 La FIG. 1 es una vista que muestra los resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores I de CK18 humana (Ejemplo de ensayo 1-1);

La FIG. 2 es una vista que muestra los resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores II de CK18 humana (Ejemplo de ensayo 1-1);

La FIG. 3 es una vista que muestra los resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores III de CK18 humana (Ejemplo de ensayo 1-1);

50 La FIG. 4 es una vista que muestra los resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores IV de CK18 humana (Ejemplo de ensayo 1-1);

La FIG. 5 es una vista que muestra los resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores I (con cebadores de bucle) de CK18 humana (Ejemplo de ensayo 1-2);

La FIG. 6 es una vista que muestra los resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores I (sin cebadores de bucle) de CK18 humana (Ejemplo de ensayo 1-2);

55 La FIG. 7 muestra la especificidad de amplificación cuando el LAMP se realiza usando el conjunto de cebadores I de CK18 humana (Ejemplo de ensayo 1-3);

La FIG. 8 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores A (sin cebadores de bucle) de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-1);

La FIG. 9 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores A (sin cebadores de bucle) de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-1);

60 La FIG. 10 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores A (con cebadores de bucle) de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-1);

La FIG. 11 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores A (con cebadores de bucle) de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-1);

65 La FIG. 12 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores A (con cebadores de bucle) de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-1);

La FIG. 13 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores C (sin cebadores de bucle) de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-2);
 La FIG. 14 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores C (con cebadores de bucle) de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-2);
 5 La FIG. 15 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores C (con cebadores de bucle) de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-2);
 La FIG. 16 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores C (con cebadores de bucle) de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-2);
 La FIG. 17 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores C (con
 10 cebadores de bucle) de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-2);
 La FIG. 18 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores C (con cebadores de bucle) de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-2);
 La FIG. 19 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores C (con
 15 cebadores de bucle) de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-2);
 La FIG. 20 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores D (sin cebadores de bucle) de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-3);
 La FIG. 21 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores D (con
 20 cebadores de bucle) de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-3);
 La FIG. 22 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores A de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-4);
 La FIG. 23 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores B de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-4);
 La FIG. 24 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores C de
 25 CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-4);
 La FIG. 25 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores D de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-4);
 La FIG. 26 muestra la especificidad de amplificación cuando el LAMP se realiza usando el conjunto de cebadores A de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-5);
 La FIG. 27 muestra la especificidad de amplificación cuando el LAMP se realiza usando el conjunto de
 30 cebadores B de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-5);
 La FIG. 28 muestra la especificidad de amplificación cuando el LAMP se realiza usando el conjunto de cebadores C de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-5);
 La FIG. 29 muestra la especificidad de amplificación cuando el LAMP se realiza usando el conjunto de
 35 cebadores D de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-5);
 La FIG. 30 es una vista que muestra los resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores C de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-6);
 La FIG. 31 es una vista que muestra los resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores C de CK19 humana (Ejemplo de ensayo 2-7);
 La FIG. 32 es una vista que muestra los resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores 1 de
 40 CK20 humana (Ejemplo de ensayo 3-2);
 La FIG. 33 muestra la especificidad de amplificación cuando el LAMP se realiza usando el conjunto de cebadores 1 de CK20 humana (Ejemplo de ensayo 3-3);
 La FIG. 34 es una vista que muestra resultados de LAMP realizado usando el conjunto de cebadores 3 de CK20 humana (Ejemplo de ensayo 3-4);
 45 La FIG. 35 muestra la especificidad de amplificación cuando el LAMP se realiza usando el conjunto de cebadores 3 de CK20 humana (Ejemplo de ensayo 3-5);

Mejor Modo para Realizar la Invención

50 (Diseño del cebador)

La presente invención proporciona un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos aplicable al método LAMP para amplificar ácidos nucleicos de CK humanas. Por ejemplo, el cebador puede diseñarse
 55 seleccionando un oligonucleótido apropiado que comprenda al menos 5 o más bases sucesivas en secuencias de bases de CK conocidas representadas, por ejemplo, por las SEC ID N°: 1, 342, 435 y/o secuencias complementarias de las mismas.

El concepto básico de los cebadores usados en el método LAMP es como se describe en el documento de Patente 1. Concretamente, se definen tres regiones F3c, F2c, F1c en este orden desde el extremo 3' y tres regiones R3, R2,
 60 R1 en este orden desde el extremo 5' de un ADN diana a amplificar, y se diseñan al menos cuatro cebadores seleccionado cadenas oligonucleotídicas que comprenden secuencias de bases que son sustancialmente idénticas y/o sustancialmente complementarias a las de al menos las seis regiones anteriores.

La expresión "secuencias de bases sustancialmente idénticas" se define como se indica a continuación. Cuando una
 65 cadena complementaria que se ha sintetizado a partir de un molde que tiene una cierta secuencia de bases híbrida con una secuencia de bases diana y proporciona un punto de partida de síntesis de una cadena complementaria, se

dice que la secuencia de bases es sustancialmente idéntica a la secuencia de bases diana. Por ejemplo, la expresión “secuencia de bases sustancialmente idéntica a F2” incluye no sólo la secuencia de bases que es perfectamente idéntica a F2, sino también las secuencias de bases que sirven como moldes que hibridan con F2 y proporcionan una secuencia de bases que sirve como punto de partida para la síntesis de una cadena complementaria.

Los términos “idéntico” y “complementario” usados en el presente documento para caracterizar una secuencia de bases que constituye un oligonucleótido de acuerdo con la presente invención, no significa necesariamente “perfectamente idéntico” o “perfectamente complementario”. En otras palabras, cuando se hace referencia a “idéntico a una cierta secuencia”, también se incluyen secuencias que son complementarias a las que son capaces de hibridar con la mencionada secuencia. Por otra parte, el término “complementario” significa una secuencia que es capaz de hibridar en condiciones rigurosas y que proporciona un extremo 3' que sirve como punto de partida para la síntesis de una cadena complementaria.

Los cebadores de la presente invención tienen una longitud de cadena tal que permite la unión mediante la formación de pares de bases con una cadena complementaria mientras que se mantiene la especificidad necesaria en un entorno dado en una diversidad de reacciones de síntesis de ácidos nucleicos como se describirá más adelante. Concretamente, tienen una longitud de 5 a 200 bases, más preferiblemente de 10 a 50 bases. Como la longitud de la cadena de un cebador que puede reconocerse por una reacción de síntesis de ácidos nucleicos dependiente de secuencia con catálisis por polimerasa conocida es de al menos aproximadamente 5 bases, la longitud de la parte de hibridación debe ser mayor que ésta. Además, desde el punto de vista de mantener la especificidad de una secuencia de bases particular, la secuencia de bases preferiblemente tiene una longitud no menor de 10 bases. Las secuencias de bases demasiado largas son difíciles de preparar por síntesis química, de forma que las longitudes de cadena mencionadas anteriormente se ejemplifican como un intervalo preferido.

El término “molde” usado en el presente documento significa un ácido nucleico que sirve como molde para la síntesis de una cadena complementaria. Una cadena complementaria cuya secuencia de bases es complementaria a un molde también se interpreta como una cadena capaz de hibridar con un molde, sin embargo, la relación entre molde y cadena complementaria es relativa. En otras palabras, una cadena complementaria puede convertirse en un molde.

En la presente invención, los cebadores seleccionados a partir de una secuencia de bases de un ADN diana constituyen, cada uno, el cebador FIP (cebador interno directo), el cebador F3 (cebador externo directo), el cebador RIP (cebador interno inverso) y el cebador R3 (cebador externo inverso).

FIP se diseña para tener una secuencia de bases de la región F2 que es sustancialmente complementaria a la región F2c de un ADN diana en su extremo 3', y una secuencia de bases que es sustancialmente idéntica a la región F1c del ADN diana en su extremo 5'. En este caso, una secuencia que no depende del ADN diana puede existir entre las secuencias de F2 y F1c. La secuencia que no depende del ADN diana puede tener una longitud de 0 a 50 bases, preferiblemente de 0 a 40 bases.

El cebador F3 está diseñado para tener una secuencia de bases sustancialmente idéntica a la región F3 que es sustancialmente complementaria a la región de F3c de un ADN diana.

RIP está diseñado para tener una secuencia de bases de la región de R2 que es sustancialmente complementaria a la región R2c de un ADN diana en su extremo 3', y una secuencia de bases que es sustancialmente idéntica a la región R1c del ADN diana en su extremo 5'. De forma similar, puede estar presente FIP, una secuencia que no depende del ADN diana, entre las secuencias de R2 y R1c en RIP.

El cebador R3 está diseñado para tener una secuencia de bases sustancialmente idéntica a la región R3 que es sustancialmente complementaria a la región R3c de un ADN diana.

En el método LAMP, además usando al menos un tipo de cebador de bucle, es posible reducir el tiempo para la amplificación (véase la Publicación Internacional N° WO 02/24902). La expresión “cebador de bucle” se refiere a un cebador que tiene una secuencia complementaria en una parte monocatenaria del bucle de extremo 5' de la estructura de pesa, más concretamente, entre la región R1 y la región R2 o entre la región F1 y la región F2, por ejemplo. El uso de un cebador de bucle hace que sea posible aumentar los puntos de partida de la síntesis de ADN. Este cebador de bucle está diseñado para permitir la hibridación en una región de bucle en la que FIP o RIP que se generan en el transcurso de la síntesis de ADN no hibridarán.

(Diseño de cebador para detectar CK19 humana)

Prestando atención a la composición de bases, el contenido de GC, la estructura secundaria, el valor de Tm y similares, se selecciona la región de un cebador para detectar CK19 humana de forma que la secuencia de bases que reconozca una región de ADN tenga una longitud de al menos 5 bases, preferiblemente de 10 a 30 bases, y más preferiblemente de 17 a 25 bases. El valor de Tm puede determinarse generalmente por el método del vecino

más próximo. La región de ADN puede seleccionarse de manera que el valor de Tm sea de 55 a 65°C, preferiblemente de 58 a 64°C, y el contenido de GC sea del 40 al 70%, preferiblemente del 50 al 65%.

5 Los oligonucleótidos pueden producirse por un método bien conocido, por ejemplo por síntesis química. Como alternativa, el ácido nucleico natural puede digerirse con una enzima de restricción o similar, seguido de modificación o acoplamiento, formando de esta manera la secuencia de bases descrita anteriormente. Concretamente, pueden sintetizarse usando un sintetizador de oligonucleótidos (sintetizador de ADN Expedite modelo 8909, fabricado por Applied Biosystems) o similar. También pueden sintetizarse oligonucleótidos en los que una o varias bases se han reemplazado, insertado, añadido o mutado de otra manera por un proceso bien conocido. Por ejemplo, la síntesis de dicho oligonucleótido puede conseguirse usando mutagénesis dirigida, recombinación homóloga de genes, extensión de cebadores o técnicas de PCR de forma individual o en combinaciones apropiadas, de acuerdo con el método descrito, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, 1989) editado por Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY; *Labomaterial Genetic Engineering* editado por Masaki Muramatsu, Maruzen, 1988; y tecnología de PCR - Principal and application of DNA amplification editado por EhrlichmHE., Stockton Press, 1989, o métodos modificados de los anteriores usando, por ejemplo, la técnica de Ulmer (*Science* (1983) 219:666).

20 Como condiciones de hibridación rigurosas pueden seleccionarse condiciones conocidas generalmente. Una condición ejemplar incluye: hibridación durante una noche a 42°C en una solución que contiene formamida al 50%, SSC 5X (NaCl 150 mM, citrato trisódico 150 mM), fosfato sódico 50 mM, pH 7,6, solución de Denhart 5x, sulfato de dextrano al 10% y 20 µg/ml de ADN; lavado primario en SSC 2X-SDS al 0,1% a temperatura ambiente; y lavado secundario en SSC 0,1X-SDS al 0,1% a 65°C.

25 En este caso, como el molde de ácido nucleico a amplificar es ARNm de CK19 humana, los cebadores a usar deben diseñarse de tal forma que no amplifiquen el ADN genómico contenido en la muestra de ensayo. Concretamente, al menos uno de los cebadores incluidos en un conjunto de cebadores de la presente invención preferiblemente incluye una región que abarca una pluralidad de exones del gen de CK19 humana. Dicha medida hace que sea posible amplificar selectivamente secuencias a partir de ARNm de CK19 humana mientras que se excluye la amplificación de secuencias de ADN genómico.

30 Un conjunto para detectar CK19 humana se diseña seleccionando un oligonucleótido apropiado que comprende al menos 5 o más bases sucesivas de una secuencia de bases conocida de 1360 bases representada por la SEC ID N°: 342 y/o una secuencia complementaria de la misma. La secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 342 está basada en el número de acceso del Genbank 4504916.

35 Además, también se diseña un cebador para detectar CK19 humana por la selección de una región de acuerdo con el principio del cebador mencionado anteriormente.

40 La región del cebador para detectar CK19 humana se incluye en una región de posiciones de bases 270-930 de la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 342 y/o una región de cadena complementaria de la misma, y preferiblemente en una región de posiciones de bases 270-560, 370-585, 625-854 o 655-930 y/o una región de una cadena complementaria de la misma.

45 Un cebador para detectar CK19 humana se diseña por selección entre los siguientes grupos 1) a 5); 1) un oligonucleótido incluido en una región de posiciones de bases 270-930 en una secuencia de bases de la SEC ID N°: 342 y una región de cadena complementaria de la misma, preferiblemente incluido en una región de posiciones de bases 270-560, 370-585, 625-854 o 655-930 y/o una región de cadena complementaria de la misma, que contiene al menos 5 bases; 2) un oligonucleótido que tiene una secuencia de bases representada por una cualquiera de las SEC ID N°: 343 a 382; 3) una cadena complementaria del oligonucleótido de acuerdo con los puntos 1) o 2) anteriores; 4) un oligonucleótido capaz de hibridar con el oligonucleótido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1) a 3) anteriores en condiciones rigurosas, y 5) un oligonucleótido que comprende una secuencia de bases que puede obtenerse a partir de los oligonucleótidos de acuerdo con los puntos 1) a 4) en el que se han reemplazado, insertado, añadido o mutado de otra manera de una a varias bases.

55 (Conjunto de cebadores)

60 Para realizar la amplificación de un ácido nucleico usando un cebador de la presente invención, como conjunto de cebadores se usa una combinación de dos o más tipos de cebadores. En el método LAMP, se usa una combinación de al menos cuatro tipos de cebadores (FIP, cebador F3, RIP, cebador R3) como conjunto de cebadores. Además, en el conjunto de cebadores pueden combinarse uno o más tipos de cebadores de bucle.

(Método RT-LAMP)

65 El método RT-LAMP es un tipo de método LAMP que usa ARN como molde. El concepto básico del método LAMP es como se describe en la Publicación Internacional N° WO 00/28082. En el método RT-LAMP, se sintetiza una estructura de punto de partida del método LAMP mientras se sintetiza ADNc a partir de un ARNm molde en la misma

solución. Más específicamente, después de la siguiente etapa 1), se repiten las etapas 2) a 5) para la extensión del ADN, con lo que se consigue la amplificación del ADN diana.

5 1) FIP se une a una cadena de ARN molde, y se extiende una cadena de ADN complementaria a la cadena de ARN molde. Para esta reacción, se usa una transcriptasa inversa tal como la transcriptasa inversa de AMV.

2) Se extiende un ADN complementario a la cadena de ARN molde mientras que la cadena de ADN de FIP sintetizada en la etapa 1) se desprende del ADN molde por el cebador F3. La extensión de la cadena de ADN después de este momento continúa gracias a la ADN polimerasa.

3) RIP se une a la cadena de ADN desprendida en la etapa 2) y se extiende una cadena de ADN.

10 4) Se extiende una cadena de ADN complementaria al ADN de FIP, mientras que el cebador R3 desprende la cadena de ADN de RIP extendido en la etapa 3), con lo que se sintetiza una estructura de punto de partida del método LAMP.

15 5) Como los dos extremos de la cadena de ADN desprendida en la etapa 4) tienen secuencias que son complementarias entre sí en la misma cadena de ADN, estas secuencias hibridan entre sí proporcionando estructuras de bucle en los dos extremos.

También se conocen enzimas que tienen tanto actividad transcriptasa inversa como actividad ADN polimerasa, tales como la Bca ADN polimerasa. Usando dicha enzima, la reacción anterior puede realizarse con una enzima.

20 (Método de detección)

Una cadena de ADN sintetizada en el método LAMP tiene una secuencia que es complementaria a la secuencia propia, de forma que la mayor parte de la cadena de ADN forma uniones por pares de bases. Usando esta característica, es posible detectar un producto amplificado. Al realizar la amplificación de ácidos nucleicos usando cebadores de la presente invención en presencia de fluorocromos tales como bromuro de etidio, SYBER GREEN I y Pico Green, que son intercalantes de doble cadena, se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia según aumenta el producto. Supervisando esto, es posible rastrear simultáneamente la amplificación del ADN y el aumento de fluorescencia en un sistema cerrado (véase Kanai's manual of clinical laboratory medicine", 31ª ed., pág. 1318; documento JP-A 2001-242169, al que se hace referencia simplemente en lo sucesivo como "método de tiempo real").

Además, en el método LAMP, se genera pirofosfato de magnesio insoluble como subproducto durante la reacción de amplificación, dando como resultado una turbidez blanca. Por lo tanto, al detectar la turbidez comprobando la turbidez de la solución reacción a simple vista o midiendo la absorbancia o la intensidad de luz dispersada de la solución de reacción, o examinando el residuo en un filtro de color después de la filtración de la solución de reacción a través del filtro, es posible determinar la presencia/ausencia del producto amplificado (véase la Publicación Internacional WO 01/83817).

40 (Reactivos, kit de reactivos, etc.)

Una diversidad de reactivos necesarios para detectar ácidos nucleicos usando cebadores de la presente invención pueden envasarse en un formato de kit con antelación. Concretamente, se proporcionan en forma de un kit una diversidad de oligonucleótidos necesarios como cebadores para la síntesis de cadenas complementarias o cebadores para el reemplazo de la presente invención; una enzima que tiene actividad transcriptasa inversa; dNTP que sirven como sustratos para la síntesis de cadenas complementarias; una ADN polimerasa para realizar la síntesis de desplazamiento de cadena de una cadena complementaria; un tampón para proporcionar condiciones deseadas para la reacción enzimática; agentes para retirar sustancias que inhiben la reacción de amplificación tales como inhibidor de RNasa cuando sea necesario; y reactivos adicionales necesarios para detectar el producto de reacción cuando sea necesario.

La presente invención describe un cebador y un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos; un método de detección de ácidos nucleicos usando estos cebadores; un reactivo de detección usado en el método de detección de ácidos nucleicos; un kit de detección de ácidos nucleicos; y un sistema de detección de ácidos nucleicos completo.

EJEMPLOS

A continuación la presente invención se describirá con más detalle por medio de ejemplos, sin embargo debe tenerse en cuenta que la presente invención no se limita a estos ejemplos.

60 (Ejemplo 1-1) (Referencia) Selección de región de secuencia de bases de CK18 humana

Se investigó la secuencia de bases de la CK18 humana representada por la SEC ID N°: 1 con respecto a las posiciones de regiones apropiadas para el método LAMP usando un software de diseño de sondas. Como resultado de la selección de regiones de acuerdo con los criterios de Tm 58,5-63,5°C para F1c y R1c, Tm 61,5-62,5°C para F2 y R2, y Tm 58,5-62,5°C para F3 y R3, se seleccionan las regiones indicadas a continuación. Las regiones

ES 2 367 108 T3

seleccionadas se incluyen en una región de posiciones de bases 340-1050 se la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 1 y una región de cadena complementaria de la misma.

F1c: Región de cadena complementaria para posiciones de bases en la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 1

| | | |
|-----------|-------------------------|-----------------|
| 442-420 | tgaagtaatggctccagtctctg | (SEC ID N°: 2) |
| 439-418 | agtaatggctccagtctctgac | (SEC ID N°: 3) |
| 443-421 | ttgaagtaatggctccagtctct | (SEC ID N°: 4) |
| 419-403 | acctggggtcccttctt | (SEC ID N°: 5) |
| 414-396 | gggtcccttcttctccaag | (SEC ID N°: 6) |
| 413-394 | ggtcccttcttctccaagtg | (SEC ID N°: 7) |
| 412-393 | gtcccttcttctccaagtgc | (SEC ID N°: 8) |
| 411-392 | tcccttcttctccaagtgt | (SEC ID N°: 9) |
| 410-392 | cccttcttctccaagtgtc | (SEC ID N°:10) |
| 409-390 | ccttcttctccaagtgtcc | (SEC ID N°:11) |
| 584-568 | acagactggcgcatggc | (SEC ID N°:12) |
| 620-602 | tcaatgacctgcgagacc | (SEC ID N°:13) |
| 621-602 | atcaatgacctgcgagacc | (SEC ID N°:14) |
| 622-603 | catcaatgacctgcgagac | (SEC ID N°:15) |
| 623-603 | tcatcaatgacctgcgagac | (SEC ID N°:16) |
| 666-648 | agcctcgatctgtctctc | (SEC ID N°:17) |
| 743-726 | gagctggcaatctgggct | (SEC ID N°:18) |
| 742-725 | agctggcaatctgggctt | (SEC ID N°:19) |
| 741-724 | gctggcaatctgggcttg | (SEC ID N°: 20) |
| 740-720 | ctggcaatctgggctttagg | (SEC ID N°: 21) |
| 739-720 | tggcaatctgggctttagg | (SEC ID N°: 22) |
| 738-719 | ggcaatctgggctttaggc | (SEC ID N°: 23) |
| 756-740 | cacggtcaaccagagc | (SEC ID N°: 24) |
| 795-777 | gatctggcgaggtcctga | (SEC ID N°: 25) |
| 809-789 | cggatgtctgccatgatctg | (SEC ID N°: 26) |
| 829-810 | ccagctcgtcatattggcc | (SEC ID N°: 27) |
| 913-894 | cagcagactgtgtggtgacc | (SEC ID N°: 28) |
| 941-924 | gtgagcgtcgtctcagca | (SEC ID N°: 29) |
| 1008-987 | gctggcctcagatttctcatg | (SEC ID N°: 30) |
| 355-335 | ccaggctcctcactctgtcca | (SEC ID N°: 31) |
| 930-410 | tccagtctctgacctggggtc | (SEC ID N°: 32) |
| 588-569 | ctccacagactggcgcatgg | (SEC ID N°: 33) |
| 769-748 | gggcatctacctccacggtcaa | (SEC ID N°: 34) |
| 897-877 | gaccactgtggtgctctcctc | (SEC ID N°: 35) |
| 925-904 | cagctccaacctcagcagactg | (SEC ID N°: 36) |
| 1263-1242 | ggtttgatggagtgtgctgtg | (SEC ID N°: 37) |

5

F2: Región de posición de bases en la secuencia de bases representada por la SEC ID N° 1

| | | |
|---------|-------------------------|-----------------|
| 376-392 | gagagcaaaatccggga | (SEC ID N°: 38) |
| 377-393 | agagcaaaatccgggag | (SEC ID N°: 39) |
| 378-394 | gagcaaaatccgggagc | (SEC ID N°: 40) |
| 384-400 | aatccgggagcacttg | (SEC ID N°: 41) |
| 369-385 | gaggctggagagcaaaa | (SEC ID N°: 42) |
| 523-540 | cgtctgtctgctgatgac | (SEC ID N°: 43) |
| 524-542 | gtctgtctgctgatgactt | (SEC ID N°: 44) |
| 543-565 | tagagtcaagtatgagacagagc | (SEC ID N°: 45) |
| 544-565 | agagtcaagtatgagacagagc | (SEC ID N°: 46) |
| 546-566 | agtcaagtatgagacagagct | (SEC ID N°: 47) |
| 588-604 | gaacgacatccatgggc | (SEC ID N°: 48) |
| 660-676 | cgaggctctcaaggagg | (SEC ID N°: 49) |
| 661-677 | gaggctctcaaggagga | (SEC ID N°: 50) |
| 662-678 | aggctctcaaggaggag | (SEC ID N°: 51) |
| 687-706 | catgaagaagaaccgaag | (SEC ID N°: 52) |
| 719-736 | gcctacaagcccagattg | (SEC ID N°: 53) |
| 747-763 | gftgacctggaggtag | (SEC ID N°: 54) |
| 768-784 | ccccaaatctcaggacc | (SEC ID N°: 55) |

ES 2 367 108 T3

| | | |
|-----------|------------------------|-----------------|
| 839-855 | accgagaggagctagac | (SEC ID N°: 56) |
| 878-894 | aggagagcaccacagtg | (SEC ID N°: 57) |
| 943-960 | gagctgagacgtacagtc | (SEC ID N°: 58) |
| 295-314 | gagacatgcaaagcctgaa | (SEC ID N°: 59) |
| 369-388 | gaggctggagagcaaatcc | (SEC ID N°: 60) |
| 523-542 | cgtctgtgctgatgactt | (SEC ID N°: 61) |
| 708-729 | ggaagtaaaaggcctacaagcc | (SEC ID N°: 62) |
| 837-857 | gaaccgagaggagctagacaa | (SEC ID N°: 63) |
| 864-884 | gtctcagcagattgaggagag | (SEC ID N°: 64) |
| 1202-1221 | tggaagatggcgaggacttt | (SEC ID N°: 65) |

F3: Región de posición de bases en la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 1

| | | |
|-----------|------------------------|-----------------|
| 322-338 | ctggcctttacctgga | (SEC ID N°: 66) |
| 293-309 | aggagacatgcaaagc | (SEC ID N°: 67) |
| 470-489 | tcttcgcaaatactgtggac | (SEC ID N°: 68) |
| 466-486 | cagatcttcgcaaatactgtg | (SEC ID N°: 69) |
| 473-491 | tcgcaaatactgtggacaa | (SEC ID N°: 70) |
| 476-495 | caaatactgtggacaatgcc | (SEC ID N°: 71) |
| 523-540 | cgtctgtgctgatgac | (SEC ID N°: 72) |
| 546-566 | agtcaagtat.gagacagagct | (SEC ID N°: 73) |
| 624-643 | caccaatatcacacgactgc | (SEC ID N°: 74) |
| 687-706 | catgaagaagaaccacgaag | (SEC ID N°: 75) |
| 695-712 | agaaccacgaagaggaag | (SEC ID N°: 76) |
| 747-763 | gttgaccgtggaggtag | (SEC ID N°: 77) |
| 812-829 | cccaatatgacgagctgg | (SEC ID N°: 78) |
| 845-864 | aggagctagacaagtactgg | (SEC ID N°: 79) |
| 855-873 | caagtactggtctcagcag | (SEC ID N°: 80) |
| 907-923 | tctgctgaggttgagc | (SEC ID N°: 81) |
| 275-294 | gaggcatccagaacgagaag | (SEC ID N°: 82) |
| 349-366 | agcctggagaccgagaac | (SEC ID N°: 83) |
| 490-507 | aatgcccgcacgttctg | (SEC ID N°: 84) |
| 672-690 | ggaggagctgcttcatg | (SEC ID N°: 85) |
| 807-824 | ccgggcccaatatgacga | (SEC ID N°: 86) |
| 840-859 | ccgagaggagctagacaagt | (SEC ID N°: 87) |
| 1176-1193 | tgagatcgccacctaccg | (SEC ID N°: 88) |

5 R1c: Región de posición de bases en la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 1

| | | |
|---------|--------------------------|------------------|
| 444-463 | gatcatcgaggacctgaggg | (SEC ID N°: 89) |
| 420-442 | cagagactggagccattactca | (SEC ID N°: 90) |
| 424-447 | gactggagccattactcaagatc | (SEC ID N°: 91) |
| 425-448 | actggagccattactcaagatca | (SEC ID N°: 92) |
| 426-450 | ctggagccattactcaagatcatc | (SEC ID N°: 93) |
| 427-451 | tgagccattactcaagatcatcg | (SEC ID N°: 94) |
| 428-451 | ggagccattactcaagatcatcg | (SEC ID N°: 95) |
| 429-453 | gagccattactcaagatcatcgag | (SEC ID N°: 96) |
| 430-454 | agccattactcaagatcatcgagg | (SEC ID N°: 97) |
| 431-454 | gccattactcaagatcatcgagg | (SEC ID N°: 98) |
| 432-456 | ccattactcaagatcatcgaggac | (SEC ID N°: 99) |
| 433-457 | cattactcaagatcatcgaggacc | (SEC ID N°: 100) |
| 587-605 | agaacgacatccatgggct | (SEC ID N°: 101) |
| 588-606 | gaacgacatccatgggctc | (SEC ID N°: 102) |
| 589-607 | aacgacatccatgggctcc | (SEC ID N°: 103) |
| 590-607 | acgacatccatgggctcc | (SEC ID N°: 104) |
| 598-614 | catgggctccgcaaggt | (SEC ID N°: 105) |

ES 2 367 108 T3

| | | |
|-----------|--------------------------|------------------|
| 632-649 | tcacacgactgcagctgg | (SEC ID Nº: 106) |
| 624-645 | caccaatatcacacgactgcag | (SEC ID Nº: 107) |
| 630-649 | tatcacacgactgcagctgg | (SEC ID Nº: 108) |
| 631-649 | atcacacgactgcagctgg | (SEC ID Nº: 109) |
| 685-708 | ttcatgaagaagaaccacgaagag | (SEC ID Nº: 110) |
| 739-756 | agctctgggtgaccgtg | (SEC ID Nº: 111) |
| 740-756 | gctctgggtgaccgtg | (SEC ID Nº: 112) |
| 741-757 | ctctgggtgaccgtgg | (SEC ID Nº: 113) |
| 742-758 | tctgggtgaccgtgga | (SEC ID Nº: 114) |
| 743-759 | ctgggtgaccgtggag | (SEC ID Nº: 115) |
| 744-760 | tgggtgaccgtggagg | (SEC ID Nº: 116) |
| 746-764 | ggttgaccgtggaggtaga | (SEC ID Nº: 117) |
| 747-767 | ggtgaccgtggaggtagatgc | (SEC ID Nº: 118) |
| 748-767 | tgaccgtggaggtagatgc | (SEC ID Nº: 119) |
| 749-767 | tgaccgtggaggtagatgc | (SEC ID Nº: 120) |
| 750-768 | gaccgtggaggtagatgcc | (SEC ID Nº: 121) |
| 751-768 | accgtggaggtagatgcc | (SEC ID Nº: 122) |
| 766-783 | gccccaaatctcaggac | (SEC ID Nº: 123) |
| 812-831 | cccaatatgacgagctggct | (SEC ID Nº: 124) |
| 855-877 | caagtactggtctcagcagattg | (SEC ID Nº: 125) |
| 924-941 | tgctgagacgacgctcac | (SEC ID Nº: 126) |
| 947-966 | tgagacgtacagtccagtcc | (SEC ID Nº: 127) |
| 1016-1032 | acagcctgagggaggtg | (SEC ID Nº: 128) |
| 360-379 | cgagaaccggaggctggaga | (SEC ID Nº: 129) |
| 443-464 | agatcatcgaggacctgagggc | (SEC ID Nº: 130) |
| 592-611 | gacatccatgggctccgcaa | (SEC ID Nº: 131) |
| 778-799 | caggacctcgccaagatcatgg | (SEC ID Nº: 132) |
| 900-921 | cacacagtctgctgaggttga | (SEC ID Nº: 133) |
| 928-948 | gagacgacgctcacagagctg | (SEC ID Nº: 134) |
| 1277-1296 | ccaccgccgatagtggat | (SEC ID Nº: 135) |

R2: Región de cadena complementaria para posición de bases en la secuencia de bases representada por la SEC ID Nº: 1

| | | |
|---------|-----------------------|------------------|
| 540-523 | gtcatcagcagcaagacg | (SEC ID Nº: 136) |
| 541-523 | agtcacgagcagcaagacg | (SEC ID Nº: 137) |
| 494-475 | gcattgtccacagtatttgc | (SEC ID Nº: 138) |
| 493-474 | cattgtccacagtatttgcg | (SEC ID Nº: 139) |
| 492-473 | attgtccacagtatttgcga | (SEC ID Nº: 140) |
| 491-473 | ttgtccacagtatttgcga | (SEC ID Nº: 141) |
| 490-472 | tgccacagtatttgcgaa | (SEC ID Nº: 142) |
| 489-470 | gtccacagtatttgcgaaga | (SEC ID Nº: 143) |
| 488-468 | tccacagtatttgcgaagatc | (SEC ID Nº: 144) |
| 487-467 | ccacagtatttgcgaagatct | (SEC ID Nº: 145) |
| 486-466 | cacagtatttgcgaagatctg | (SEC ID Nº: 146) |
| 678-662 | ctcctctgagagcct | (SEC ID Nº: 147) |
| 677-661 | tcctcctgagagcctc | (SEC ID Nº: 148) |
| 676-660 | cctcctgagagcctcg | (SEC ID Nº: 149) |
| 675-659 | ctcctgagagcctcga | (SEC ID Nº: 150) |
| 673-657 | ccttgagagcctcgatc | (SEC ID Nº: 151) |
| 672-655 | cttgagagcctcgatctc | (SEC ID Nº: 152) |
| 667-651 | gagcctcgatctctgtc | (SEC ID Nº: 153) |
| 666-649 | agcctcgatctctgtctc | (SEC ID Nº: 154) |
| 665-649 | gctcctgatctctgtctc | (SEC ID Nº: 155) |
| 713-696 | acttctctctcgtgttc | (SEC ID Nº: 156) |

ES 2 367 108 T3

| | | |
|-----------|----------------------|------------------|
| 721-702 | ggcctttacttctcttgc | (SEC ID N°: 157) |
| 714-696 | tacttctcttctgtggtc | (SEC ID N°: 158) |
| 762-746 | tacctccacggtaacc | (SEC ID N°: 159) |
| 809-792 | cggatgtctgccatgatc | (SEC ID N°: 160) |
| 808-790 | ggatgtctgccatgatctt | (SEC ID N°: 161) |
| 829-812 | ccagctcgtcatattggg | (SEC ID N°: 162) |
| 877-858 | caatctgctgagaccagtac | (SEC ID N°: 163) |
| 874-856 | tctgctgagaccagtactt | (SEC ID N°: 164) |
| 922-906 | ctccaacctcagcagac | (SEC ID N°: 165) |
| 985-969 | agtccaggctgatctcc | (SEC ID N°: 166) |
| 1006-987 | tggccttcagatttctcatg | (SEC ID N°: 167) |
| 1011-994 | caagctggccttcagatt | (SEC ID N°: 168) |
| 1086-1070 | aaggctcagcagatcc | (SEC ID N°: 169) |
| 437-417 | taatggctccagtcttgacc | (SEC ID N°: 170) |
| 515-496 | tcaatctgcagaacgatgcg | (SEC ID N°: 171) |
| 669-649 | gagagcctcgtctctgtctc | (SEC ID N°: 172) |
| 669-650 | gagagcctcgtctctgtct | (SEC ID N°: 173) |
| 857-837 | ttgtctagctcctctcggtc | (SEC ID N°: 174) |
| 857-838 | ttgtctagctcctctcggtt | (SEC ID N°: 175) |
| 981-962 | caggctgatccaaggact | (SEC ID N°: 176) |
| 1008-989 | gctggccttcagatttctca | (SEC ID N°: 177) |
| 1350-1331 | gctggcttaatgcctcagaa | (SEC ID N°: 178) |

R3: Región de cadena complementaria para la posición de bases en la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 1

| | | |
|-----------|-----------------------|------------------|
| 566-546 | agctctgtctcatacttgact | (SEC ID N°: 179) |
| 541-523 | agtcacagcagcaagacg | (SEC ID N°: 180) |
| 540-5239 | gtcatcagcagcaagacg | (SEC ID N°: 181) |
| 721-702 | ggcctttacttctcttgc | (SEC ID N°: 182) |
| 713-696 | acttctcttctgtggtc | (SEC ID N°: 183) |
| 740-724 | ctgg.caatctgggcttg | (SEC ID N°: 184) |
| 786-769 | gaggctctgagatttggg | (SEC ID N°: 185) |
| 854-837 | tctagctcctctcggtc | (SEC ID N°: 186) |
| 877-858 | caatctgctgagaccagtac | (SEC ID N°: 187) |
| 922-906 | ctccaacctcagcagac | (SEC ID N°: 188) |
| 910-894 | cagactgtgtggtgacc | (SEC ID N°: 189) |
| 893-877 | actgtggtgctctcctc | (SEC ID N°: 190) |
| 960-943 | gactgtacgtctcagctc | (SEC ID N°: 191) |
| 1021-1005 | ggctgttccaagctg | (SEC ID N°: 192) |
| 1056-1039 | catctgtagggcgtagcg | (SEC ID N°: 193) |
| 1141-1125 | catactcctgggcctgg | (SEC ID N°: 194) |
| 476-458 | gccaagatctgagccctca | (SEC ID N°: 195) |
| 538-521 | catcagcagcaagacggg | (SEC ID N°: 196) |
| 688-670 | tgaagagcagctcctcctt | (SEC ID N°: 197) |
| 885-866 | gctctcctcaatctgctgag | (SEC ID N°: 198) |
| 1008-989 | gctggccttcagatttctca | (SEC ID N°: 199) |
| 1030-1012 | cctccctcaggctgttctc | (SEC ID N°: 200) |
| 1370-1352 | ccaaagggtaccctgcttc | (SEC ID N°: 201) |

5 Bucle F: Región de cadena complementaria para la posición de bases en la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 1

| | | |
|---------|---------------------|------------------|
| 419-403 | acctggggctcccttctt | (SEC ID N°: 202) |
| 414-396 | gggtcccttcttccaag | (SEC ID N°: 203) |
| 413-394 | gggtcccttcttccaagt | (SEC ID N°: 204) |
| 399-380 | caagtgtcccggattttgc | (SEC ID N°: 205) |

| | | |
|-----------|-------------------------|------------------|
| 398-380 | aagtgtcccggattttgc | (SEC ID N°: 206) |
| 397-379 | agtgtcccggattttgct | (SEC ID N°: 207) |
| 396-378 | gtgtcccggattttgctc | (SEC ID N°: 208) |
| 395-377 | tggtcccggattttgctct | (SEC ID N°: 209) |
| 394-376 | gtcccggattttgctctc | (SEC ID N°: 210) |
| 567-544 | cagctctgtctcatactgactct | (SEC ID N°:211) |
| 584-568 | acagactggcgcgatggc | (SEC ID N°: 212) |
| 709-688 | cctctctgtggtctcttcat | (SEC ID N°: 213) |
| 916-898 | cctcagcagactgtgtggt | (SEC ID N°: 214) |
| 913-894 | cagcagactgtgtggtgacc | (SEC ID N°: 215) |
| 567-544 | cagctctgtctcatactgactct | (SEC ID N°: 216) |
| 743-726 | gagctggcaatctgggct | (SEC ID N°: 217) |
| 1243-1224 | gtccaaggcatcaccaaga | (SEC ID N°: 218) |
| 1242-1222 | gtccaaggcatcaccaagatt | (SEC ID N°: 219) |

Bucle R: Región de posición de bases en la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 1

| | | |
|-----------|--------------------------|------------------|
| 474-495 | cgcaaatactgtggacaatgcc | (SEC ID N°: 220) |
| 466-489 | cagatctcgcaaatactgtggac | (SEC ID N°: 221) |
| 444-463 | gatcatcgaggacctgaggg | (SEC ID N°: 222) |
| 626-646 | ccaatatcacacgactgcagc | (SEC ID N°: 223) |
| 617-640 | ttgatgacaccaatatcacacgac | (SEC ID N°: 224) |
| 632-649 | tcacacgactgcagctgg | (SEC ID N°: 225) |
| 659-676 | tcgaggctctcaaggagg | (SEC ID N°: 226) |
| 767-784 | ccccaaatctcaggacc | (SEC ID N°: 227) |
| 970-986 | gagatcgacctggactc | (SEC ID N°: 228) |
| 622-643 | gacaccaatatcacacgactgc | (SEC ID N°: 229) |
| 621-643 | tgacaccaatatcacacgactgc | (SEC ID N°: 230) |
| 623-644 | acaccaatatcacacgactgca | (SEC ID N°: 231) |
| 810-829 | Ggcccaatatgacgagctgg | (SEC ID N°: 232) |
| 1296-1315 | tggcaaagtgtgtctgaga, | (SEC ID N°: 233) |

5 (Ejemplo 1-2) (Referencia) Diseño de Cebador para Detectar CK18

A partir de las secuencias de las regiones seleccionadas en el Ejemplo 1-1, se obtuvieron los siguientes cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos a aplicar al método LAMP.

FIP: Cebador que tiene la secuencia de bases en la que están acopladas secuencias de bases de las regiones F1c y F2

| | | |
|----------------|--|------------------|
| 09FA971-376 | tgaagtaatggctccagtctctggagagcaaaatccggga | (SEC ID N°: 234) |
| 09FA971-377 | tgaagtaatggctccagtctctgagagcaaaatccgggag | (SEC ID N°: 235) |
| 09FA971-378 | tgaagtaatggctccagtctctggagcaaaatccgggagc | (SEC ID N°: 236) |
| 15 09FA971-384 | tgaagtaatggctccagtctctgaatccgggagcacttgg | (SEC ID N°: 237) |
| 09FA974-376 | agtaatggctccagtctctgacgagagcaaaatccggga | (SEC ID N°: 238) |
| 09FA974-377 | agtaatggctccagtctctgacagagcaaaatccgggag | (SEC ID N°: 239) |
| 09FA974-378 | agtaatggctccagtctctgacgagcaaaatccgggagc | (SEC ID N°: 240) |
| 09FA974-384 | agtaatggctccagtctctgacaatccgggagcacttgg | (SEC ID N°: 241) |
| 20 09FA970-376 | ttgaagtaatggctccagtctctgagagcaaaatccggga | (SEC ID N°: 242) |
| 09FA970-377 | ttgaagtaatggctccagtctctagagcaaaatccgggag | (SEC ID N°: 243) |
| 09FA970-378 | ttgaagtaatggctccagtctctgagcaaaatccgggagc | (SEC ID N°: 244) |
| 09FA970-384 | ttgaagtaatggctccagtctctaatccgggagcacttgg | (SEC ID N°: 245) |
| 09FA999-369 | gggtcccctcttccaaggaggctggagagcaaaa | (SEC ID N°: 246) |
| 25 09FA994-369 | acctggggcccttctgaggctggagagcaaaa | (SEC ID N°: 247) |
| 09FA1000-369 | ggtccccttcttccaagtggaggctggagagcaaaa | (SEC ID N°: 248) |
| 09FA1002-369 | tcccttcttccaagtctgaggctggagagcaaaa | (SEC ID N°: 249) |
| 09FA1004-369 | ccttcttccaagtctccgaggctggagagcaaaa | (SEC ID N°: 250) |
| 12FA829-523 | acagactggcgcgatggcgttctgctgctgatgac | (SEC ID N°: 251) |
| 30 12FA829-524 | acagactggcgcgatggcgttctgctgctgatgactt | (SEC ID N°: 252) |

- 13FA793-543 tcaatgaccttgaggagcctagatcaagatgagacagagc (SEC ID N°: 253)
- 13FA793-544 tcaatgaccttgaggagccagatcaagatgagacagagc (SEC ID N°: 254)
- 13FA793-546 tcaatgaccttgaggagccagatcaagatgagacagagct (SEC ID N°: 255)
- 13FA792-593 atcaatgaccttgaggagcctagatcaagatgagacagagc (SEC ID N°: 256)
- 5 13FA792-544 atcaatgaccttgaggagccagatcaagatgagacagagc (SEC ID N°: 257)
- 13FA792-546 atcaatgaccttgaggagccagatcaagatgagacagagct (SEC ID N°: 258)
- 13FA791-543 catcaatgaccttgaggagcctagatcaagatgagacagagc (SEC ID N°: 259)
- 13FA791-544 catcaatgaccttgaggagcagatcaagatgagacagagc (SEC ID N°: 260)
- 13FA791-546 catcaatgaccttgaggagcagatcaagatgagacagagct (SEC ID N°: 261)
- 10 13FA790-543 tcatcaatgaccttgaggagcctagatcaagatgagacagagc (SEC ID N°: 262)
- 13FA790-544 tcatcaatgaccttgaggagcagatcaagatgagacagagc (SEC ID N°: 263)
- 13FA790-546 tcatcaatgaccttgaggagcagatcaagatgagacagagct (SEC ID N°: 264)
- 14FA747-588 agcctcgatctgtctccgaacgacatccatgggc (SEC ID N°: 265)
- 18FA675-660 ggcaatctgggctgtaggccgaggtctcaaggagg (SEC ID N°: 266)
- 15 18FA670-660 gagctggcaatctgggctcaggtctcaaggagg (SEC ID N°: 267)
- 18FA670-662 gagctggcaatctgggctcaggtctcaaggagg (SEC ID N°: 268)
- 18FA674-660 tggcaatctgggctgtaggcgaggtctcaaggagg (SEC ID N°: 269)
- 18FA674-662 tggqaatctgggctgtaggcgaggtctcaaggagg (SEC ID N°: 270)
- 18FA675-661 ggcaatctgggctgtaggcgaggtctcaaggagg (SEC ID N°: 271)
- 20 18FA675-662 ggcaatctgggctgtaggcgaggtctcaaggagg (SEC ID N°: 272)
- 19FA657-687 cacggtcaaccagagccatgaagaagaaccacgaag (SEC ID N°: 273)
- 21FA618-719 gatctggcgaggtcctgagcctacaagcccagattg (SEC ID N°: 274)
- 21FA604-747 cggatgtctgcatgatcttggtgaccgtggaggtag (SEC ID N°: 275)
- 23FA584-768 ccagctgctatattgggcccccaaatctcaggacc (SEC ID N°: 276)
- 25 27FA500-839 cagcagactgtgtggtagaccaccgagaggagctagac (SEC ID N°: 277)
- 29FA472-878 gtgagcgtctcagcaaggagagcaccacagt (SEC ID N°: 278)
- 32FA405-943 gctggccttcagattctcatggagctgagacgtacagt (SEC ID N°: 279)
- ek 335-295 ccaggctctcactctgtccagagaccatgcaaacgctgaa (SEC ID N°: 280)
- ek 410-369 tccagctctgacctggggtcgaggctggagagcaaaa (SEC ID N°: 281)
- 30 30 569-523 ctccacagactggcgcatggcgcttctgctgctgac (SEC ID N°: 282)
- ek 748-708 gggcatctacctccaggtcaaggaagtaaaaggcctacaagcc (SEC ID N°: 283)
- ek 877-837 gaccactgtgtgctctcctgaaccgagaggagctagacaa (SEC ID N°: 284)
- ek 904-864 cagctcaacctcagcagactggctcagcagattgaggagag (SEC ID N°: 285)
- ek 1242-1202 ggttgcattgaggtgctgctggaagatggcgaggacttt (SEC ID N°: 286)

RIP: Cebador que tiene la secuencia de bases en la que están acopladas secuencias de bases de las regiones R1c y R2

- 09RA444-873 gatcatcgaggacctgaggggtcatcagcagcaagacg (SEC ID N°: 287)
- 40 09RA444-872 gatcatcgaggacctgagggagtcacagcagcaagacg (SEC ID N°: 288)
- 09RA420-927 cagagactggagccattacttcacacagatattgccaagatctg (SEC ID N°: 289)
- 09RA420-925 cagagactggagccattacttcacacagatattgccaagatc (SEC ID N°: 290)
- 09RA420-923 cagagactggagccattacttcacacagatattgccaag (SEC ID N°: 291)
- 09RA420-921 cagagactggagccattacttcacacagatattgccaag (SEC ID N°: 292)
- 45 09RA420-919 cagagactggagccattacttcacacagatattgccaag (SEC ID N°: 293)
- 09RA424-927 gactggagccattacttcacacagatattgccaagatctg (SEC ID N°: 294)
- 09RA424-923 gactggagccattacttcacacagatattgccaagatctg (SEC ID N°: 295)
- 09RA424-921 gactggagccattacttcacacagatattgccaagatctg (SEC ID N°: 296)
- 12RA598-737 catgggctcccgaaggtcctccttgagagcctcg (SEC ID N°: 297)
- 50 12RA587-746 agaacgacatccatgggctgagcctcgatctctgtc (SEC ID N°: 298)
- 12RA588-737 gaacgacatccatgggctcccctccttgagagcctcg (SEC ID N°: 299)
- 12RA588-746 gaacgacatccatgggctcagcctcgatctctgtc (SEC ID N°: 300)
- 12RA588-748 gaacgacatccatgggctcagcctcgatctctgtc (SEC ID N°: 301)
- 12RA590-737 acgacatccatgggctcccctccttgagagcctcg (SEC ID N°: 302)
- 55 12RA590-746 acgacatccatgggctcccctccttgagagcctcg (SEC ID N°: 303)
- 12RA590-748 acgacatccatgggctcccctccttgagagcctcg (SEC ID N°: 304)
- 12RA598-740 catgggctcccgaaggtccttgagagcctcgatc (SEC ID N°: 305)
- 12RA598-746 catgggctcccgaaggtccttgagagcctcgatctctgtc (SEC ID N°: 306)
- 13RA632-700 tcacacgactgcagctggactcctctctgtggttc (SEC ID N°: 307)
- 60 13RA632-692 tcacacgactgcagctgggcttttactcctctctg (SEC ID N°: 308)

- 13RA632-699 tcacacgactgcagctggtacttctctctctggttc (SEC ID N°: 309)
 13RA624-700 caccaatatcacacgactgcagacttctctctctggttc (SEC ID N°: 310)
 13RA624-699 caccaatatcacacgactgcagacttctctctctggttc (SEC ID N°: 311)
 13RA624-692 caccaatatcacacgactgcagggcctttacttctctctg (SEC ID N°: 312)
 5 13RA631-700 atcacacgactgcagctggacttctctctctggttc (SEC ID N°: 313)
 13RA631-699 atcacacgactgcagctggtacttctctctctggttc (SEC ID N°: 314)
 13RA631-692 atcacacgactgcagctggggcctttacttctctctg (SEC ID N°: 315)
 13RA630-700 tatcacacgactgcagctggacttctctctctggttc (SEC ID N°: 316)
 13RA630-699 tatcacacgactgcagctggtacttctctctctggttc (SEC ID N°: 317)
 10 13RA630-692 tatcacacgactgcagctggggcctttacttctctctg (SEC ID N°: 318)
 14RA685-651 tcatgaagaagaaccacgaagagtacctccacggtcaacc (SEC ID N°: 319)
 18RA743-604 ctgggttgaccgtggagcggatgtctgcatgatc (SEC ID N°: 320)
 18RA743-605 ctgggttgaccgtggagggatgtctgcatgatctt (SEC ID N°: 321)
 18RA747-604 gttgaccgtggaggtagatgccggatgtctgcatgatc (SEC ID N°: 322)
 15 18RNA749-604 tgaccgtggaggtagatgccggatgtctgcatgatc (SEC ID N°: 323)
 18RA751-604 accgtggaggtagatgccggatgtctgcatgatc (SEC ID N°: 324)
 18RA749-605 tgaccgtggaggtagatgccggatgtctgcatgatctt (SEC ID N°: 325)
 18RA751-605 accgtggaggtagatgccggatgtctgcatgatctt (SEC ID N°: 326)
 19RA766-584 gcccccaaatctcaggaccagctcgtcatattggg (SEC ID N°: 327)
 20 21RA812-536 cccaatatgacgagctggctcaatctgctgagaccagtac (SEC ID N°: 328)
 23RA855-491 caagtactggtctcagcagattgctccaacctcagcagac (SEC ID N°: 329)
 27RA924-428 tgctgagacgacgctcacagtcagggtcagatctcc (SEC ID N°: 330)
 29RA947-402 tgagacgtacagtcagtcaccaagctggccttcagatt (SEC ID N°: 331)
 29RA947-407 tgagacgtacagtcagtcctggccttcagatttctcatg (SEC ID N°: 332)
 25 32RA1016-327 acagctgaggagggtgaaggtgcagcaggatcc (SEC ID N°: 333)
 ek 360-417 cgagaaccggaggctgagataatggctccagtcctgacc (SEC ID N°: 334)
 ek 443-496 agatcatcgaggacctgagggtcaatctgcagaacgatgcg (SEC ID N°: 335)
 ek 592-649 gacatccatgggctccgcaagagagcctcagatctctgtct (SEC ID N°: 336)
 ek 592-650 gacatccatgggctccgcaagagagcctcagatctctgtct (SEC ID N°: 337)
 30 ek 778-837 caggacctcgccaagatcatgggaaccgagaggagctagacaa (SEC ID N°: 338)
 ek 900-962 cacacagctctgctgaggtggacaggtcagatctccaaggact (SEC ID N°: 339)
 ek 928-989 gagacgacgctcacagagctggctggccttcagatttctca (SEC ID N°: 340)
 ek 1277-1331 ccaccgccggatagtggtgctgcttaatgctcagaa (SEC ID N°: 341)
- 35 Cebador F3: (cebador que comprende la secuencia de bases representada por la SEC ID N° respectiva)
- F309-322 (SEC ID N°: 66), F309-293 (SEC ID N°: 67)
 F312-470 (SEC ID N°: 68), F312-466 (SEC ID N°: 69)
 F312-473 (SEC ID N°: 70), F312-476 (SEC ID N°: 71)
 40 F313-523 (SEC ID N°: 72), F314-546 (SEC ID N°: 73)
 F319-624 (SEC ID N°: 74), F321-687 (SEC ID N°: 75)
 F321-695 (SEC ID N°: 76), F323-747 (SEC ID N°: 77)
 F327-812 (SEC ID N°: 78), F329-845 (SEC ID N°: 79)
 F329-855 (SEC ID N°: 80), F332-907 (SEC ID N°: 81)
 45 F3 8 (SEC ID N°: 82), F3 13 (SEC ID N°: 83),
 F3 14 (SEC ID N°: 84), F3 16 (SEC ID N°: 85),
 F3 23 (SEC ID N°: 86), F3 29 (SEC ID N°: 87)
 F3 37 (SEC ID N°: 88)
- 50 Cebador R3: (cebador que comprende la secuencia de bases representada por la SEC ID N° respectiva)
- R309-847 (SEC ID N°: 179), R309-872 (SEC ID N°: 180),
 R309-873 (SEC ID N°: 181), R312-692 (SEC ID N°: 182),
 R312-700 (SEC ID N°: 183), R313-673(SEC ID N°: 184),
 55 R314-627 (SEC ID N°: 185), R318-559(SEC ID N°: 186),
 R319-536 (SEC ID N°: 187), R321-491(SEC ID N°: 188),
 R321-503 (SEC ID N°: 189), R321-520(SEC ID N°: 190),
 R323-453 (SEC ID N°: 191), R327-392(SEC ID N°: 192),
 R329-357 (SEC ID N°: 193), R332-272(SEC ID N°: 194),
 60 B3 8 (SEC ID N°: 195), B3 13 (SEC ID N°: 196),

B3 14 (SEC ID N°: 197), B3 19 (SEC ID N°: 198),
 B3 21 (SEC ID N°: 199), B3 35 (SEC ID N°: 200),
 B3 37 (SEC ID N°: 201)

5 Cebador de bucle: (cebador que comprende la secuencia de bases representada por SEC ID N° respectiva)

10 LF09-994 (SEC ID N°: 202), LF09-999 (SEC ID N°: 203),
 LF09-1000 (SEC ID N°: 204), LF09-1014(SEC ID N°: 205),
 LF09-1015 (SEC ID N°: 206), LF09-1016(SEC ID N°: 207),
 LF09-1017 (SEC ID N°: 208), LF09-1018(SEC ID N°: 209),
 LF09-1019 (SEC ID N°: 210), LF12-846 (SEC ID N°: 211),
 LF13-829 (SEC ID N°: 212), LF18-704 (SEC ID N°: 213),
 LF29-497 (SEC ID N°: 214), LF29-500 (SEC ID N°: 215),
 15 LF 14 (SEC ID N°: 216), LF 20 (SEC ID N°: 217),
 LF 371 (SEC ID N°: 218), LF 372 (SEC ID N°: 219)
 LR09-474 (SEC ID N°: 220), LR09-466 (SEC ID N°: 221),
 LR09-444 (SEC ID N°: 222), LR12-626 (SEC ID N°: 223),
 LR12-617 (SEC ID N°: 224), LR12-632 (SEC ID N°: 225),
 LR13-659 (SEC ID N°: 226), LR18-767 (SEC ID N°: 227),
 20 LR29-970 (SEC ID N°: 228), LB 14 (SEC ID N°: 229),
 LB 151 (SEC ID N°: 230), LB 152 (SEC ID N°: 231),
 LB 371 (SEC ID N°: 232), LB 372 (SEC ID N°: 233)

(Ejemplo 2-1) Selección de región a partir de la secuencia de bases de CK19 humana

25 Se investigó la secuencia de bases de CK19 humana representada por la SEC ID N°: 342 con respecto a
 posiciones de regiones apropiadas para el método LAMP usando un software de diseño de sondas. Como
 resultado de la selección de regiones de acuerdo con el criterio de que Tm 58,5-63,5°C para F1c y R1c, Tm 61,5-
 62,5°C para F2 y R2, y Tm 58,5-62,5°C para F3 y R3, se seleccionan las regiones indicadas a continuación. Las
 30 regiones seleccionadas se incluyen en una región de posiciones de bases 270-930 de la secuencia de bases
 representada por la SEC ID N°: 342 y una región de cadena complementaria de la misma.

F1c: Regiones en cadena complementaria de secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 342

426-405 5'-tgtagtagtgctgtagtcgcg-3' (SEC ID N°: 343)
 429-407 5'-tcgtgtagtagtgctgtagtcg-3' (SEC ID N°: 344)
 479-458 5'-ggagttctcaatggtggcacca-3' (SEC ID N°: 345)
 716-700 5'-ttggcccctcagcgtac-3' (SEC ID N°: 346)
 752-735 5'-agcggaatccacctccac-3' (SEC ID N°: 347)
 747-728 5'-aatccacctccacactgacc-3' (SEC ID N°: 348)
 746-728 5'-atccacctccacactgacc-3' (SEC ID N°: 349)
 745-728 5'-tccacctccacactgacc-3' (SEC ID N°: 350)

35 F2: Regiones en la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 342

352-370 5'-agctagaggtgaagatccg-3' (SEC ID N°: 351)
 364-380 5'-agatccgcgactggtac-3' (SEC ID N°: 352)
 360-376 5'-gtgaagatccgcgactg-3' (SEC ID N°: 353)
 417-437 5'-actactacacgaccatccagg-3' (SEC ID N°: 354)
 658-679 5'-aagagctggcctacctg-3' (SEC ID N°: 355)
 690-709 5'-gaggaaatcagtacgctgag-3' (SEC ID N°: 356)

40 F3: Regiones en la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 342

275-293 5'-gctaaccatgcagaacctc-3' (SEC ID N°: 357)
 375-392 5'-tggtagcagaagcagggg-3' (SEC ID N°: 358)
 628-645 5'-acctggagatgcagatcg-3' (SEC ID N°: 359)
 658-674 5'-aagagctggcctacctg-3' (SEC ID N°: 360)

| | | |
|---|-----------------------------|------------------|
| 661-677 | 5'-agctggcctacctaag-3' | (SEC ID N°: 361) |
| R1c: Regiones en la secuencia de bases representada por | | SEC ID N°: 342 |
| 533-516 | 5'-gtgccaccattgagaactcc-3' | (SEC ID N°: 362) |
| 485-505 | 5'-tgtcctgcagatcgacaacgc-3' | (SEC ID N°: 363) |
| 486-506 | 5'-gtcctgcagatcgacaacgcc-3' | (SEC ID N°: 364) |
| 727-744 | 5'-aggtcagtgtggaggtgg-3' | (SEC ID N°: 365) |
| 764-783 | 5'-tctcgccaagatcctgagtg-3' | (SEC ID N°: 366) |
| 766-785 | 5'-tcgccaagatcctgagtgac-3' | (SEC ID N°: 367) |
| 772-793 | 5'-agatcctgagtgacatgcaag-3' | (SEC ID N°: 368) |

R2: Regiones en cadena complementaria de la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 342

| | | |
|---------|---------------------------|------------------|
| 533-516 | 5'-ggttcgaagtcattctgc-3' | (SEC ID N°: 369) |
| 545-526 | 5'-cgtctcaactggttcggga-3' | (SEC ID N°: 370) |
| 547-528 | 5'-tccgtctcaactggttcgg-3' | (SEC ID N°: 371) |
| 790-773 | 5'-cgcatgtcactcaggatc-3' | (SEC ID N°: 372) |
| 841-824 | 5'-caggcttcagcatccttc-3' | (SEC ID N°: 373) |
| 848-832 | 5'-ggtgaaccaggcttcag-3' | (SEC ID N°: 374) |
| 847-831 | 5'-gtgaaccaggcttcagc-3' | (SEC ID N°: 375) |
| 845-828 | 5'-gaaccaggcttcagcatc-3' | (SEC ID N°: 376) |
| 843-827 | 5'-accaggcttcagcatcc-3' | (SEC ID N°: 377) |

5 R3: Regiones en cadena complementaria de la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 342

| | | |
|---------|--------------------------|------------------|
| 556-540 | 5'-agagcctgttccgtctc-3' | (SEC ID N°: 378) |
| 567-584 | 5'-gtggaggccgacatcaac-3' | (SEC ID N°: 379) |
| 841-824 | 5'-caggcttcagcatccttc-3' | (SEC ID N°: 380) |
| 916-900 | 5'-tcggacctgctcatctg-3' | (SEC ID N°: 381) |
| 925-908 | 5'-tcagtaacctcggacctg-3' | (SEC ID N°: 382) |
| 923-907 | 5'-agtaacctcggacctgc-3' | (SEC ID N°: 383) |
| 921-905 | 5'-taacctcggacctgctc-3' | (SEC ID N°: 384) |

Bucle F: Regiones en cadena complementaria de la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 342

| | | |
|---------|---------------------------|------------------|
| 395-381 | 5'-aggcccctgcttctg-3' | (SEC ID N°: 385) |
| 393-379 | 5'-gcccctgcttctgtg-3' | (SEC ID N°: 386) |
| 392-376 | 5'-cccctgcttctgtacc-3' | (SEC ID N°: 387) |
| 392-375 | 5'-cccctgcttctgtacca-3' | (SEC ID N°: 388) |
| 393-376 | 5'-gcccctgcttctgtacc-3' | (SEC ID N°: 389) |
| 395-380 | 5'-aggcccctgcttctgg-3' | (SEC ID N°: 390) |
| 394-379 | 5'-ggcccctgcttctgtg-3' | (SEC ID N°: 391) |
| 457-440 | 5'-agaatctgtcccgcagg-3' | (SEC ID N°: 392) |
| 456-440 | 5'-gaatctgtcccgcagg-3' | (SEC ID N°: 393) |
| 699-680 | 5'-tgattcctcctcatggttc-3' | (SEC ID N°: 394) |
| 698-679 | 5'-gattcctcctcatggttc-3' | (SEC ID N°: 395) |
| 694-676 | 5'-tcctcctcatggttctt-3' | (SEC ID N°: 396) |
| 734-318 | 5'-actgacctggcctcca-3' | (SEC ID N°: 397) |
| 724-710 | 5'-cctcccactggccc-3' | (SEC ID N°: 398) |

10

Bucle R: Regiones en cadena complementaria de la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 342

| | | |
|---------|--------------------------|------------------|
| 493-510 | 5'-agatcgacaacgcccgtc-3' | (SEC ID N°: 399) |
| 495-512 | 5'-atcgacaacgcccgtctg-3' | (SEC ID N°: 400) |
| 495-509 | 5'-atcgacaacgcccgt-3' | (SEC ID N°: 401) |

| | | |
|---------|--------------------------|------------------|
| 496-509 | 5'-tcgacaacgcccgt-3' | (SEC ID N°: 402) |
| 506-520 | 5'-ccgtctggctgcaga-3' | (SEC ID N°: 403) |
| 507-520 | 5'-cgtctggctgcagatga-3' | (SEC ID N°: 404) |
| 508-525 | 5'-gtctggctgcagatgact-3' | (SEC ID N°: 405) |
| 509-526 | 5'-tctggctgcagatgact-3' | (SEC ID N°: 406) |
| 752-767 | 5'-tccgggcaccgatctc-3' | (SEC ID N°: 407) |
| 756-771 | 5'-ggcaccgatctcgcca-3' | (SEC ID N°: 408) |
| 755-769 | 5'-gggcaccgatctcgc-3' | (SEC ID N°: 409) |
| 757-771 | 5'-gcaccgatctcgcca-3' | (SEC ID N°: 410) |
| 805-822 | 5'-tcatggccgagcagaacc-3' | (SEC ID N°:411) |
| 806-821 | 5'-catggccgagcagaac-3' | (SEC ID N°:412) |

(Ejemplo 2-2) Diseño de cebador para detectar CK19

5 A partir de las secuencias de las regiones seleccionadas en el Ejemplo 2-1, se obtuvieron los siguientes cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos a aplicar al método LAMP.

10 Cada cebador se muestra en un conjunto de cebadores a usar en el método RT-LAMP y se clasificó en cuatro Grupos A a D dependiendo de la región. Cada cebador perteneciente al Grupo A se selecciona a partir de una región de posiciones de bases 270-560 en la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 342 y una
 15 región de cadena complementaria de la misma; de forma similar, cada cebador perteneciente al Grupo B se selecciona de una región de posiciones de bases 370-585 y una región de cadena complementaria de la misma; de forma similar, cada cebador perteneciente al Grupo C se selecciona a partir de una región de posiciones de bases 625-854 en una región de cadena complementaria de la misma; y de forma similar cada cebador perteneciente al Grupo D se selecciona a partir de una región de posiciones de bases 655-930 y una región de cadena complementaria de la misma.

(Grupo A)

20 FIP: Secuencias de Bases de Regiones F1c y F2 Acopladas
 FA-401 5'-tgttagtagtgctgtagtcgagctagaggtgaagatccg-3' (SEC ID N°: 413) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 343 y la SEC ID N°: 351 están acopladas)
 FA-403 5'-tgttagtagtgctgtagtcgagctagaggtggtac-3' (SEC ID N°: 414) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 343 y la SEC ID N°: 352 están acopladas)
 25 FA-404 5'-tcgttagtagtgctgtagtcgagctagaggtgaagatccg-3' (SEC ID N°: 415) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 344 y la SEC ID N°: 351 están acopladas)
 FA-405 5'-tcgttagtagtgctgtagtcgagctagaggtggtac-3' (SEC ID N°: 416) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 344 y la SEC ID N°: 353 están acopladas)
 FA-406 5'-tcgttagtagtgctgtagtcgagctagaggtggtac-3' (SEC ID N°: 917) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 344 y SEC ID N°: 352 están acopladas)
 30 RIP: Secuencias de Bases de las Regiones R1c y R2 Acopladas
 RA-401 5'-gtgccaccattgagaactccggttcggaagtcatctgc-3' (SEC ID N°: 418) (Las secuencias de las bases de la SEC ID N°: 362 y la SEC ID N°: 369 están acopladas)

35 Cebador F3: (secuencia idéntica a secuencia de bases de la región F3)

| | | |
|---|---------------------------|------------------|
| F3-401 | 5'-gctaaccatgcagaacctc-3' | (SEC ID N°: 357) |
| Cebador R3: (secuencia idéntica a secuencia de bases de la Región R3) | | |
| R3-401 | 5'-agagcctgttccgtctc-3' | (SEC ID N°: 378) |

Cebador de bucle: (secuencia idéntica a secuencia de bases de la región del bucle F o del bucle R)

| | | |
|---------|--------------------------|------------------|
| LPF-401 | 5'-aggcccctgcttctg-3' | (SEC ID N°: 385) |
| LPF-402 | 5'-gccctgcttctggt-3' | (SEC ID N°: 386) |
| LPF-403 | 5'-cccctgcttctgtacc-3' | (SEC ID N°: 387) |
| LPF-404 | 5'-cccctgcttctgtacca-3' | (SEC ID N°: 388) |
| LPF-405 | 5'-gccctgcttctgtacc-3' | (SEC ID N°: 389) |
| LPF-406 | 5'-aggcccctgcttctgg-3' | (SEC ID N°: 390) |
| LPF-407 | 5'-ggcccctgcttctggt-3' | (SEC ID N°: 391) |
| LPR-401 | 5'-agatcgacaacgcccgtc-3' | (SEC ID N°: 399) |
| LPR-402 | 5'-afcgacaacgcccgtctg-3' | (SEC ID N°: 400) |

LPR-403 5'-atcgacaacgcccg-3' (SEC ID N°: 401)
 LPR-404 5'-tcgacaacgcccg-3' (SEC ID N°: 402)

(Grupo B)

FIP: Secuencias de Bases de Regiones F1c y F2 Acopladas

5 FA1 -EK 5'-ggagttctcaatgggtggcaccactactacagaccatccagg-3' (SEC ID N°: 419) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 346 y de SEC ID N°: 354 están acopladas)

RIP: Secuencias de Bases de Regiones R1c y R2 Acopladas

RA2-EK5'-tgtcctgcagatcgacaacgcctctcaaactgggtcgga-3' (SEC ID N°: 420) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 363 y la SEC ID N°: 370 están acopladas)

10 RA6-EK 5'-gtcctgcagatcgacaacgcctcctctcaaactgggtcg-3' (SEC ID N°: 421) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 364 y la SEC ID N°: 371 están acopladas)

Cebador F3: (secuencia idéntica a secuencia de bases de la región F3)

F3-EK 5'-tggtaccagaagcagggg-3' (SEC ID N°: 358)

15 Cebador R3: (secuencia idéntica a secuencia de bases de la región R3)

R3-EK 5'-gtggaggccgacatcaac-3' (SEC ID N°: 379)

Cebador de bucle: (secuencia idéntica a secuencia de bases de la región de bucle F o bucle R)

LPF1-EK 5'-agaatctgtcccgcagg-3' (SEC ID N°: 392)

LPF2-EK 5'-gaatctgtcccgcagg-3' (SEC ID N°: 393)

LPR1-EK 5'-ccgtctggctgcaga-3' (SEC ID N°: 403)

LPR2-EK 5'-cgtctggctgcagatga-3' (SEC ID N°: 404)

LPR3-EK 5'-gtctggctgcagatgact-3' (SEC ID N°: 405)

LPR4-EK 5'-tctggctgcagatgactt-3' (SEC ID N°: 406)

20 (Grupo C)

FIP: Secuencias de Bases de Regiones F1c y F2 Acopladas

25 FA-1101 5'-ttggcccctcagcgtacaagagctggcctacctg-3' (SEC ID N°: 422) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 346 y la SEC ID N°: 355 están acopladas)

RIP: Secuencias de Bases de las Regiones R1c y R2 Acopladas

RA-11015'-aggtcagtgtggagtggtggcgcagatgactcagcaggatc-3' (SEC ID N°: 423) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 365 y la SEC ID N°: 372 están acopladas)

Cebador F3: (secuencia idéntica a secuencia de bases de la región F3)

F3-1101 5'-acctggagatgcagatcg-3' (SEC ID N°: 359)

30 Cebador R3: (secuencia idéntica a secuencia de bases de la región R3)

R3-1101 5'-caggcttcagcatccttc-3' (SEC ID N°: 380)

Cebador de bucle: (secuencia idéntica a secuencia de bases de la región del bucle F o bucle R)

LPF-1101 5'-tgatttctcctcatggttc-3' (SEC ID N°: 394)

LPF-1102 5'-gatttctcctcatggttct-3' (SEC ID N°: 395)

LPF-1103 5'-tcctcctcatggttcttct-3' (SEC ID N°: 396)

LPR-1101 5'-tccgggcaccgatctc-3' (SEC ID N°: 407)

LPR-1102 5'-ggcaccgatctcgcca-3' (SEC ID N°: 408)

LPR-1103 5'-gggcaccgatctcgc-3' (SEC ID N°: 409)

LPR-1104 5'-gcaccgatctcgcca-3' (SEC ID N°: 410)

35

(Grupo D)

FIP: Secuencias de Bases de Regiones F1c y F2 Acopladas

40 FA-601 5'-agcggatccacctccagaggaaatcagctagctgag-3' (SEC ID N°: 424) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 347 y la SEC ID N°: 356 están acopladas)

FA-602 5'-aatccacctccacactgaccgaggaaatcagtagctgag-3' (SEC ID N°: 425) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 348 y la SEC ID N°: 356 están acopladas)

FA-603 5'-atccacctccacactgaccgaggaaatcagtagctgag-3' (SEC ID N°: 426) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 349 y la SEC ID N°: 359 están acopladas)

5 FA-604 5'-tccacctccacactgaccgaggaaatcagtagctgag-3' (SEC ID N°: 427) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 350 y la SEC ID N°: 356 están acopladas)

RIP: Secuencias de Bases de Regiones R1c y R2 Acopladas

RA-6015'-tctcgccaagatcctgagtgaccgagcttcagcatc-3' (SEC ID N°: 428) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 366 y la SEC ID N°: 373 están acopladas)

10 RA-602 5'-tctcgccaagatcctgagtgaccgagcttcagcatc-3' (SEC ID N°: 429) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 366 y la SEC ID N°: 374 están acopladas)

RA-603 5'-tctcgccaagatcctgagtgaccgagcttcagcatc-3' (SEC ID N°: 430) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 366 y la SEC ID N°: 375 están acopladas)

15 RA-6045'-tctcgccaagatcctgagtgaccgagcttcagcatc-3' (SEC ID N°: 431) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 366 y la SEC ID N°: 376 están acopladas)

RA-605 5'-tctcgccaagatcctgagtgaccgagcttcagcatc-3' (SEC ID N°: 432) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 366 y la SEC ID N°: 377 están acopladas)

RA-606 5'-tctcgccaagatcctgagtgaccgagcttcagcatc-3' (SEC ID N°: 433) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 367 y la SEC ID N°: 373 están acopladas)

20 RA-607 5'-agatcctgagtgacatgcaagcaggcttcagcatc-3' (SEC ID N°: 434) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 368 y la SEC ID N°: 373 están acopladas)

Cebador F3: (secuencia idéntica a secuencia de bases de la región F3)

F3-601 5'-aagagctggcctacctg-3' (SEC ID N°: 360)

F3-602 5'-agctggcctacctgaag-3' (SEC ID N°: 361)

25

Cebador R3: (secuencia idéntica a secuencia de bases de la región R3)

R3-601 5'-tcggacctgctcatctg-3' (SEC ID N°: 381)

R3-602 5'-tcagtaacctcggacctg-3' (SEC ID N°: 382)

R3-603 5'-agtaacctcggacctgc-3' (SEC ID N°: 383)

R3-604 5'-taacctcggacctgtc-3' (SEC ID N°: 384)

Cebador de bucle: (secuencia idéntica a secuencia de bases de la región del bucle F o bucle R)

LPF-601 5'-actgacctggcctcca-3' (SEC ID N°: 397)

LPF-602 5'-cctcccactggccc-3' (SEC ID N°: 398)

LPR-601 5'-tcatggccgagcagaacc-3' (SEC ID N°: 411)

LPR-602 5'-catggccgagcagaac-3' (SEC ID N°: 412)

30

(Ejemplo 3-1) (Referencia) Selección de región a partir de la secuencia de bases de CK20 humana

La secuencia de bases de CK20 humana representada por la SEC ID N°: 435 se investigó por respecto a las posiciones de regiones apropiadas para el método LAMP usando un software de diseño de sondas. Como resultado de la selección de regiones de acuerdo con el criterio de que Tm 58,5-63,5°C para F1c y R1c, Tm 61,5-62,5°C para F2 y R2, y Tm 58,5-62,5°C para F3 y R3, se seleccionan las regiones indicadas a continuación. Las regiones seleccionadas se incluyen en una región de posición de bases 340-1050 de la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 435 y una región de cadena complementaria de la misma. F1c: Regiones en cadena complementaria de secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 435.

40

920-900 5'-ttcatgctgagatgggactgg-3' (SEC ID N°: 436)

915-895 5'-gctgagatgggactggagttc-3' (SEC ID N°: 437)

436-416 5'-caatttgcaggacacaccga g-3' (SEC ID N°: 438)

F2: Regiones en la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 435

847-865 5'-gaggttcaactaacggagc-3' (SEC ID N°: 439)

850-869 5'-gttcaactaacggagctgag-3' (SEC ID N°: 440)

855-872 5'-actaacggagctgagacg-3' (SEC ID N°: 441)

370-388 5'-attgaagagctgcaagtc-3' (SEC ID N°: 442)

45 F3: Regiones en la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 435

345-367 5'-cgactacagtgcattacagac-3' (SEC ID N°: 443)
 805-822 5'-caacaacaggtcacagtg-3' (SEC ID N°: 444)

R1c: Regiones en la secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 435

940-958 5'-ctagaggagaccaaggccc-3' (SEC ID N°: 445)
 939-958 5'-tctagaggagaccaaggccc-3' (SEC ID N°: 446)
 947-966 5'-agaccaaggcccgttacagc-3' (SEC ID N°: 447)
 452-972 5'-ctgctgaggactcagactga-3' (SEC ID N°: 448)

5

R2: Regiones en cadena complementaria de secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 935.

1004-987 5'-agagagctcaacagcgac-3' (SEC ID N°: 449)
 1007-990 5'-tccagagagctcaacagc-3' (SEC ID N°: 950)
 994-978 5'-acagcgactggagggtg-3' (SEC ID N°: 451)
 1000-984 5'-agctcaacagcgactgg-3' (SEC ID N°: 452)
 523-505 5'-ctggagatcagctccac-3' (SEC ID N°: 453)

R3: Regiones en cadena complementaria de secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 435

10

556-535 5'-gtagggttagtcatcaagac-3' (SEC ID N°: 454)
 1044-1027 5'-gcgttccatgttactccg-3' (SEC ID N°: 455)

Bucle F: Regiones en cadena complementaria de secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 435

409-389 5'-gcagtgagcatcctaatct-3' (SEC ID N°: 456)
 891-875 5'-ctcaaggctctggagg-3' (SEC ID N°: 457)
 Bucle R: Regiones en secuencia de bases representada por la SEC ID N°: 435
 480-499 5'-gactgagagaggaatacgtc-3' (SEC ID N°: 458)
 968-985 5'-gccagttagccaactcc-3' (SEC ID N°: 459)
 970-985 5'-cagttagccaactcc-3' (SEC ID N°: 460)

15 (Ejemplo 3-2) (Referencia) Diseño de Cebador para Detectar CK20

A partir de las secuencias de las regiones seleccionadas en el Ejemplo 3-1, se obtuvieron los siguientes cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos a aplicar al método LAMP.

20 FIP: Secuencias de bases de Regiones F1c y F2 Acopladas
 KFA-5 5'-ttcatgctgagatgggactgggaggttcaactaacggagc-3' (SEC ID N°: 461) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 436 y la SEC ID N°: 439 están acopladas)
 KFA-5 a 5'-ttcatgctgagatgggactgggttcaactaacggagctgag-3' (SEC ID N°: 462) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 436 y la SEC ID N°: 440 están acopladas)
 25 KFA-5b 5'-ttcatgctgagatgggactggactaacggagctgagacg-3' (SEC ID N°: 463) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 436 y la SEC ID N°: 441 están acopladas)
 KFA-5d 5'-gctgagatgggactggagttcagagttcaactaacggagc-3' (SEC ID N°: 464) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 437 y la SEC ID N°: 439 están acopladas)
 KFA-5e 5'-gctgagatgggactggagttcgttcaactaacggagctgag-3' (SEC ID N°: 465) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 437 y la SEC ID N°: 440 están acopladas)
 30 KFA-5f 5'-gctgagatgggactggagttcactaacggagctgagacg-3' (SEC ID N°: 466) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 437 y la SEC ID N°: 441 están acopladas)
 AFA5'-caatttcaggacacaccgagattgaagagctgcaagtc-3' (SEC ID N°: 467) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 438 y la SEC ID N°: 442 están acopladas)
 35 RIP: Secuencias de bases de Regiones R1c y R2 Acopladas
 KRA-5 5'-ctagaggagaccaaggccagagagctcaacagcgac-3' (SEC ID N°: 468) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 445 y la SEC ID N°: 449 están acopladas)
 KRA-5a 5'-tctagaggagaccaaggccctccagagagctcaacagc-3' (SEC ID N°: 469) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 446 y la SEC ID N°: 450 están acopladas)
 40 KRA-5c 5'-tctagaggagaccaaggccacagcgactggaggtg-3' (SEC ID N°: 470) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 446 y la SEC ID N°: 451 están acopladas)
 KRA-5d 5'-agaccaaggcccgttacagcagagagctcaacagcgac-3' (SEC ID N°: 471) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 447 y la SEC ID N°: 449 están acopladas)
 KRA-5e 5'-agaccaaggcccgttacagctccagagagctcaacagc-3' (SEC ID N°: 472) (Las secuencias de bases de la

SEC ID N°: 447 y la SEC ID N°: 450 están acopladas)

KRA-5f 5'-agac caaggccgttacagcagctcaacagcgactgg-3' (SEC ID N°: 473) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 447 y la SEC ID N°: 452 están acopladas)

5 ARAf 5'-ctgctgaggacttcagactgacttgagatcagctccac-3' (SEC ID N°: 474) (Las secuencias de bases de la SEC ID N°: 448 y la SEC ID N°: 453 están acopladas)

Cebador F3: (secuencia idéntica a secuencia de bases de la región F3)

AF3 5'-cgactacagtgcattacagac-3' (SEC ID N°: 443)

KF3-5 5'-cagcaacaggtcacagtg-3' (SEC ID N°: 444)

10 Cebador R3: (secuencia idéntica a secuencia de bases de la región R3)

AR3 5'-gtagggttaggtcatcaaagac-3' (SEC ID N°: 454)

KR3-5 5'-gcgttccatgttactccg-3' (SEC ID N°: 455)

Cebador de bucle: (secuencia idéntica a secuencia de bases de la región de bucle F o bucle R)

LPF2 5'-gcagttgagcatcctaatct-3' (SEC ID N°: 456)

K-LPF2 5'-ctcaaggctctggagg-3' (SEC ID N°: 457)

LPR6 5'-gactgagagaggaatacgtc-3' (SEC ID N°: 458)

K-LPR1 5'-gccagttagccaacctcc-3' (SEC ID N°: 459)

K-LPR2 5'-cagttagccaacctcc-3' (SEC ID N°: 460)

15

EJEMPLOS DE ENSAYO

Se midieron los efectos obtenidos cuando se realiza el método RT-LAMP usando diferentes cebadores para detectar CK18, CK19 o CK20 obtenidos anteriormente y se determinaron de acuerdo con los ejemplos de Ensayo 1 a 3.

20

(Ejemplo de ensayo 1-1) (Referencia) Observación de Amplificación

Este ensayo se realizó para examinar el tiempo necesario desde el inicio de la reacción hasta que pudo observarse amplificación; en todos los casos, la medición se realizó por el método RT-LAMP usando la siguiente combinación de diversos cebadores para detectar CK18 humana.

25

1) Método para preparar muestra de ARN de CK18 humana

Realizando RT-PCR usando un cebador diseñado basándose en una secuencia de bases de CK18 humana, se aisló ADNc de CK18 humana a partir de ARN total derivado de KATOIII (células de cáncer de estómago). A partir de ADNc de CK18 humana clonado en pBluescript (plásmido fabricado por STRATAGENE), se sintetizó un producto de transcripción usando un sistema de transcripción *in vitro* (sistema de transcripción *in vitro* Riboprobe (fabricado por Promega)). La concentración de ARN de la solución no diluida obtenida de esta manera se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y, basándose en el resultado, la solución se diluyó en 50 ng/μl de ARN de levadura (fabricado por Ambion) de forma que el número de copias del ARN de CK18 humana fue 60000, 6000, 600, 60, 6 y 0 (control), que se usaron como soluciones de molde.

35

2) Conjunto de cebadores para detectar CK18 humana

40 Se usó una diversidad de cebadores en las combinaciones mostradas en la Tabla 1.

(Tabla 1) Conjunto de cebadores

(Cada número representa el número de SEC ID, y cada cebador significa un cebador que comprende una secuencia representada por cada número de SEC ID)

| Conjunto de cebadores | I | II | III | IV |
|----------------------------|-----|-----|-----|-----|
| FIP | 234 | 252 | 259 | 278 |
| RIP | 287 | 297 | 307 | 332 |
| Cebador F3 | 66 | 68 | 72 | 79 |
| Cebador R3 | 179 | 182 | 184 | 193 |
| Cebador de bucle (bucle F) | 203 | 211 | 212 | 214 |
| Cebador de bucle (bucle R) | 220 | 223 | 226 | 228 |

3) Composición de solución de reacción

45

| | |
|---|-------------|
| dNTP (fabricados por GIBCO) | 0,4 mM |
| MgSO ₄ | 2 mM |
| Ditiotreitol | 5 mM |
| Betaína (fabricado por Sigma) | 640 mM |
| Tampón Thermopol (fabricado por New England BioLabs) | 0,125 mg/ml |
| Transcriptasa inversa de AMV (fabricada por Promega) | 1,25 U |
| ADN polimerasa de Bst (fabricada por New England BioLabs) | 16 U |
| Bromuro de etidio | |

| | | | |
|------------------|--------------------|------------|------------------|
| Cebador | | | |
| FIP | 40 pmol, | RIP | 40 pmol, |
| Cebador F3 | 5 pmol, | Cebador R3 | 5 pmol, |
| Cebador de bucle | (bucle F, bucle R) | | cada uno 20 pmol |

4) Método RT-LAMP

- 5 A 23 µl de solución de reacción que contenía los seis tipos de cebadores anteriores, se añadieron 2 µl de muestra de ARN de CK18 humana y la mezcla se calentó a 65°C durante una hora.

5) Observación de amplificación

- 10 Como el producto amplificado tiene una estructura bicatenaria, el bromuro de etidio se intercala en la estructura bicatenaria para emitir fluorescencia. El aumento de intensidad de fluorescencia (Rn) se midió a tiempo real usando PRISM 7700 fabricado por ABI.

6) Resultados

- 15 Los resultados de los casos en los que se usaron respectivamente los conjuntos de cebadores I a IV se muestran en las FIG. 1 a 4. Estos resultados demuestran que cuanto mayor es la cantidad de molde de CK18 humana, más corto es el tiempo necesario hasta que puede observarse la amplificación, en cada conjunto. En los conjuntos de cebadores I y III, se observó amplificación en 20 minutos incluso en el caso de 600 copias, mientras que en el conjunto de cebadores II, la amplificación se observó después de aproximadamente 20 minutos en el caso de 6000 copias. Como ocurre en el caso del conjunto de cebadores IV, se observó amplificación después de aproximadamente 20 minutos en el caso de 6000 copias, y después de aproximadamente 30 minutos incluso en el caso de 600 copias.

- 25 (Ejemplo de ensayo 1-2) (Referencia) Efecto de cebador de bucle

Entre los conjuntos de cebadores considerados en el Ejemplo de ensayo 1-1, se seleccionó el conjunto de cebadores I en el que el tiempo necesario para la observación de la amplificación fue más corto, y se realizó un ensayo para examinar la sensibilidad en presencia/ausencia de un cebador de bucle.

- 30 1) Método para preparar muestra de ARN de CK18 humana

Se prepararon muestras que tenían números de copias de 60000, 6000, 600 y 0 (control) de una manera similar a la descrita en el Ejemplo de ensayo 1-1.

- 35 2) Conjunto de cebadores

Se usaron el conjunto de cebadores I mostrado en la Tabla 1 y un conjunto de cebadores excluyendo cada cebador de bucle del conjunto de cebadores I.

- 40 3) Composición de solución de reacción.

Se usó una solución de reacción similar a la del Ejemplo de ensayo 1-1, y en cuanto el conjunto que excluía el cebador de bucle, no se añadió ningún cebador de bucle.

- 45 4) Método RT-LAMP

A 23 µl de solución de reacción que contenía seis o cuatro tipos de cebadores, se añadieron 2 µl de muestra de ARN de CK18 humana y la mezcla se calentó a 65°C durante una hora.

- 50 5) Observación de amplificación

La medición se realizó a tiempo real de una manera similar al Ejemplo de ensayo 1-1.

6) Resultados

Los resultados de la determinación se muestran en las FIG. 5 y 6. Estos resultados demuestran que el tiempo necesario hasta que pudo observarse la amplificación fue menor en el caso en el que no se usó un cebador de bucle. Sin embargo, incluso en el caso en el que se usó un cebador de bucle, se observó amplificación de CK18 humana después de aproximadamente 50 minutos incluso en el caso de 60000 copias.

(Ejemplo 1-3) (Referencia) Especificidad de amplificación para CK18 humana

Se examinó la especificidad de amplificación para CK18 humana cuando la medición se realizó usando el conjunto de cebadores I. Se sabe que las citoqueratinas (CK) tienen isoformas tales como CK19, 20 humanas y similares aparte de CK18 humana. Estas isoformas comprenden una secuencia de bases que tienen una homología de aproximadamente un 60% con CK18 humana. Este ensayo se realizó para determinar si la CK18 humana podía ensayarse de forma distinguible de la CK19 o 20 humanas cuando la medición se realizaba usando el conjunto de cebadores anterior.

1) Método para preparar muestra de ARN

Se preparó una muestra de ARN de CK18 humana que tenía un número de copias de 60000 de una manera similar a la descrita en el Ejemplo de ensayo 1-1. También con respecto a los ARN de CK19 humana y CK20 humana, se prepararon muestras de una manera similar.

2) Conjunto de cebadores

Se usó el conjunto de cebadores I mostrado en la Tabla 1.

3) Composición de solución de reacción

Se usó una solución de reacción similar a la del Ejemplo de ensayo 1-1.

4) Método RT-LAMP

Se usaron condiciones similares a las descritas en el Ejemplo de ensayo 1.

5) Observación de amplificación.

La medición se realizó a tiempo real de una manera similar al Ejemplo de ensayo 1-1.

6) Resultados

Los resultados se muestran en la FIG. 7. Estos resultados demuestran que el ARN de CK18 humana, pero no el ARN de CK19 humana ni el ARN de CK20 humana se amplificaron cuando se usó el conjunto de cebadores I, revelando especificidad del conjunto de cebadores I por el ARN de CK18 humana.

(Ejemplo de ensayo 2-1) (Referencia) Efecto de conjuntos de cebadores (Grupo A) para detectar CK19 humana

Este ensayo se realizó para examinar un patrón de amplificación cuando se midió el ARN de CK19 humana por el método RT-LAMP usando un conjunto de cebadores seleccionado del Grupo A mostrado en el Ejemplo 2-2.

1) Conjunto de cebadores (Grupo A)

El examen se realizó usando un conjunto de cebadores que consistía en FIP: FA-401, RIP: RA-401, F3: F3-401 y R3: R3-401, y un conjunto de cebadores en combinación con diversos cebadores de bucle: LPF-401 y LPR-401, LPF-401 y LPR-402, LPF-401 y LPR-403 o LPF-401 y LPR-404.

2) Método para preparar ARN de CK19 humana

Al realizar RT-PCR usando un cebador diseñado basándose en una secuencia de bases de CK19 humana, se aisló ADNc de CK19 humana a partir del ARN total derivado de KATOIII (células de cáncer de estómago). A partir del ADNc de CK19 humana clonado en pBluescript (plásmido fabricado por STRATAGENE), se sintetizó un producto de transcripción usando un sistema de transcripción *in vitro* (sistema de transcripción *in vitro* Riboprobe (fabricado por Promega)). La concentración de ARN de la solución no diluida obtenida de esta manera se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y, basándose en el resultado, la solución se diluyó en 50 ng/μl de ARN de levadura (fabricado

por Ambion) de forma que el número de copias del ARN de CK19 humana fue 60000, 6000, 600, 60, 6 y 0 (control), que se usaron como soluciones de molde.

3) Composición de solución de reacción

Se usó una solución de reacción similar a la del Ejemplo de ensayo 1-1 y, en cuanto al conjunto que excluía el cebador de bucle, no se añadió un cebador de bucle.

4) Método RT-LAMP

A 23 µl de solución de reacción que contenía cuatro tipos de cebadores que no incluía cebadores de bucle o que contenía seis tipos de cebadores incluyendo cebadores de bucle, se añadieron 2 µl de muestra de ARN de CK19 humana, y la mezcla se calentó a 65°C durante una hora.

5) Observación de amplificación

La medición se realizó a tiempo real de una manera similar a la del Ejemplo de ensayo 1-1.

6) Resultados

Los resultados obtenidos para el conjunto de cebadores que no incluía cebadores de bucle y el conjunto de cebadores que incluía diversos cebadores de bucle se muestran en las FIG. 8 a 12. Estos resultados demuestran que el tiempo necesario hasta que pudo observarse amplificación fue de aproximadamente 40 minutos después de iniciar el ensayo cuando no se usaron cebadores de bucle. Por otra parte, como se muestra en las FIG. 9 a 12, en el caso de los sistemas que incluyen cebadores de bucle, pudo observarse amplificación aproximadamente entre 10 minutos y 20 minutos.

(Ejemplo de ensayo 2-2) (Referencia) Efecto de conjunto de cebadores (Grupo C) para detectar CK19 humana

Este ensayo se realizó para examinar un patrón de amplificación cuando se midió ARN de CK19 humana por el método RT-LAMP usando un conjunto de cebadores seleccionado del Grupo A mostrado en el Ejemplo 2-2.

1) Conjunto de cebadores (Grupo C)

Se realizó un examen usando un conjunto de cebadores consistente en: FIP: FA-1101, RIP: RA-1101, F3: F3-1101 y R3: R3-1101, y un conjunto de cebadores en combinación con diversos cebadores de bucle: LPF-1101 y LPR-1101, LPF-1101 y LPR-1102, LPF-1101 y LPR-1103, LPF-1101 y LPR-1104, LPF-1102 y LPR-1101 o LPF-1103 y LPR-1101.

2) Preparación de muestra de ARN de CK19 humana

Siguiendo la operación mostrada en el Ejemplo de ensayo 2-1, se prepararon muestras de forma que los números de copias fueran 60000, 6000, 600, 60 y 0 (control), respectivamente.

3) La composición de la solución de reacción, 4) el método RT-LAMP y 5) la observación de la amplificación se realizaron de una manera similar al Ejemplo de ensayo 2-1.

6) Resultados

Los resultados obtenidos para el conjunto de cebadores que no incluía cebadores de bucle y el conjunto de cebadores que incluía diversos cebadores de bucle se muestran en las FIG. 13 a 19. Estos resultados demuestran que cuando no se usaban cebadores de bucle, el tiempo necesario hasta que pudo observarse la amplificación fue de aproximadamente 30 minutos después de iniciar el ensayo (FIG. 13). Por otra parte, en los sistemas que usan cebadores de bucle, pudo observarse amplificación aproximadamente entre 10 minutos y 20 minutos, cuando se combinaron con LPF-1101 y LPR-1101 (FIG. 14), LPF-1101 y LPR-1102 (FIG. 15), LPF-1101 y LPR-1104 (FIG. 17), LPF-1102 y LPR-1101 (FIG. 18) o LPF-1103 y LPR-1101 (FIG. 19). Cuando se combinaron con LPF-1101 y LPR-1103 (FIG. 16) pudo observarse amplificación aproximadamente a 20 minutos.

(Ejemplo de ensayo 2-3) (Referencia) Efecto de conjuntos de cebadores (Grupo D) para detectar CK19 humana

Este ensayo se realizó para examinar el patrón de amplificación cuando se midió el ARN de CK19 humana por el método RT-LAMP usando un conjunto de cebadores seleccionado del Grupo D mostrado en el Ejemplo 2-2.

1) Conjunto de cebadores (Grupo D)

El examen se realizó usando un conjunto de cebadores que consistía en FIP: FA-601, RIP: RA-604, F3: F3-601 y

R3: R3-601, y un conjunto de cebadores en combinación con diversos cebadores de bucles: LPF-601 y LPR-601.

2) Preparación de muestra de ARN de CK19 humana

5 Después de la operación mostrada en el Ejemplo de ensayo 2-1, se prepararon muestras de forma que los números de copias fueran 60000, 6000, 600, 60 y 0 (control), respectivamente.

3) La composición de la solución de reacción, 4) el método RT-LAMP y 5) la observación de la amplificación se realizaron de una manera similar al Ejemplo de ensayo 2-1.

10

6) Resultados

15 Los resultados obtenidos para el conjunto de cebadores que no incluía cebadores de bucle y el conjunto de cebadores que incluía diversos cebadores de bucle se muestran en la FIG. 20 y FIG. 21, respectivamente. Estos resultados demuestran que cuando no se usaron cebadores de bucle, el tiempo necesario hasta que pudo observarse la amplificación de ácidos nucleicos fue de aproximadamente 70 minutos. Además, incluso para el número de copias de 0, se observó una amplificación no específica, sugiriendo una especificidad ligeramente baja. Por otra parte, cuando se usaron cebadores de bucle, pudo observarse amplificación aproximadamente a los 20 minutos, y no se observó amplificación no específica para el número de copias de 0. La especificidad se mejoró mediante el uso de cebadores de bucle.

20

(Ejemplo de ensayo 2-4) Medición de sensibilidad

25 Este ensayo se realizó para examinar la sensibilidad de medición de ARN de CK19 humana cuando la medición se realizó usando cada conjunto de cebadores seleccionado del Grupo A, C y D mostrados en los Ejemplos de ensayo 2-1 a 2-3, o un conjunto de cebadores seleccionado del Grupo B.

1) Conjunto de cebadores

30 Grupo A: FIP: FA-401, RIP: RA-401, F3: F3-401, R3: R3-401, Cebador de bucle: LPF-401, LPR-404
 Grupo B: FIP: FA1-EK, RIP: RA6-EK, F3: F3-EK, R3: R3-EK, Cebador de bucle: LPFL-EK, LPR2-EK
 Grupo C: FIP: FA-1101, RIP: RA-1101, F3: F3-1101, R3: R3-1101, Cebador de bucle: LPF-1101, LPR-1101
 Grupo D: FIP: FA-601, RIP: RA-604, F3: F3-601, R3: R3-601, Cebador de bucle: LPF-601, LPR-601

35 2) Preparación de muestra de ARN de CK19 humana

Siguiendo la operación mostrada en el Ejemplo de ensayo 2-1, se prepararon muestras de forma que los número de copias fueran de 60000, 20000, 6000, 2000, 600, 200, 60, 20 y 0 (control), respectivamente.

40 3) La composición de la solución de reacción, 4) el método RT-LAMP y 5) la observación de amplificación se realizaron de una manera similar al Ejemplo de ensayo 2-1.

6) Resultados

45 Los resultados se muestran en las FIG. 22 a 25. Estos resultados demuestran que en todos los grupos de conjuntos de cebadores, cuanto mayor es el número de copias menor es el tiempo necesario hasta que puede observarse la amplificación de ácidos nucleicos, y se observó amplificación aproximadamente a 15-25 minutos cuando el número de copias fue de 60000. En cuanto al Grupo A, se observó amplificación a 20-30 minutos cuando el número de copias fue de 200 o mayor (FIG. 22); en cuanto al Grupo B, se observó amplificación a 15-20 minutos cuando el número de copias fue de 200 o mayor (FIG. 23), en cuanto al Grupo C, se observó amplificación a 15-25 minutos cuando el número de copias fue de 600 o mayor (FIG. 24); y en cuanto al Grupo D, se observó amplificación a 25-35 minutos cuando el número de copias fue de 200 o mayor (FIG. 25).

50

(Ejemplo de ensayo 2-5) Especificidad de amplificación por ARN de CK19 humana

55 La especificidad de amplificación por ARN de CK19 humana se examinó cuando la medición se realizó usando cada conjunto de cebadores mostrado en el Ejemplo de ensayo 2-4. Se sabe que las citoqueratinas (CK) tienen isoformas tales como CK18, 20 humanas y similares además de CK19 humana. Estas isoformas comprenden una secuencia de bases que tiene aproximadamente un 60% de homología con CK19 humana. Este ensayo se realizó para determinar si CK19 humana podía ensayarse de forma distinguible de CK18 o 20 humanas cuando la medición se realizó usando el conjunto de cebadores anterior.

60

1) Conjunto de cebadores

65 El examen se realizó para el mismo conjunto de cebadores que se usó en el Ejemplo de ensayo 2-4.

2) Preparación de muestra de ARN

Se prepararon muestras de ARN de CK19 humana de forma que los números de copias fueran 60000, 6000, 600 y 0 (control) realizando una operación similar a la del Ejemplo de ensayo 2-1. En cuanto a los ARN de CK18 humana y CK20 humana, se prepararon muestras de una manera similar de forma que los números respectivos de copias fueran 60000.

3) La composición de la solución de reacción, 4) el método RT-LAMP y 5) la observación de la amplificación se realizaron de una manera similar al Ejemplo de ensayo 2-1.

6) Resultados

Las FIG. 26 a 29 muestran resultados usando cada conjunto de cebadores mostrado en el Ejemplo de ensayo 2-4. Estos resultados demuestran que el ARN de CK19 humana, pero no el ARN de CK18 humana ni el ARN de CK20 humana se amplifican cuando se usa cualquier grupo de conjunto de cebadores.

(Ejemplo de ensayo 2-6) (Referencia) Observación de amplificación con respecto al ARN de CK19 humana (medición de turbidez)

1) Conjunto de cebadores (Grupo C)

Se realizó el examen para un conjunto de cebadores usando FIP: FA-1101, RIP: RA-1101, F3: F3-1101, R3: R3-1101 y cebadores de bucle: LPF-1101 y LPR-1101 en combinación.

2) Preparación de muestra de ARN de CK19 humana

Se prepararon muestras de forma que los números de copias fueran 100000, 10000, 1000 y 0 (control) realizando una operación similar a la del Ejemplo de ensayo 2-1.

3) Composición de solución de reacción

| | |
|--|--------|
| dNTPs (fabricado por GIBCO) | 0,4 mM |
| MgSO ₄ | 2 mM |
| Ditiotreitol | 5 mM |
| Betaina (fabricado por Sigma) | 640 mM |
| Tampón Thermopol (fabricado por New England BioLabs) | |
| Transcriptasa inversa de AMV (fabricada por Promega) | 1,25 U |
| Bst ADN polimerasa (fabricada por New England BioLabs) | 16 U |
| Tergitol (fabricado por Sigma) | 1% |

| | | | |
|-------------------------------------|----------|------------|------------------|
| Cebador | | | |
| FIP | 40 pmol, | RIP | 40 pmol, |
| Cebador F3 | 5 pmol, | Cebador R3 | 5 pmol, |
| Cebador de bucle (bucle F, bucle R) | | | cada uno 20 pmol |
| Tris HCl (pH 8) | | | 60 mM |

4) El método RT-LAMP se realizó de la manera descrita en el Ejemplo de ensayo 2-1. La reacción se dejó durante 1,5 horas en un tubo de 0,2 ml a 65°C.

5) Observación de la amplificación

Se determinó la turbidez de la reacción RT-LAMP a lo largo del tiempo a partir de la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm. Como máquina de medición se usó LA-200 fabricada por Teramecs.

6) Resultados

Los resultados se muestran en la FIG. 30. Dependiendo del número de copias del molde, el inicio de la amplificación se observó entre 11 y 13 minutos después de iniciar la medición.

(Ejemplo de ensayo 2-7) (Referencia) Observación de amplificación con respecto a ARN de CK19 humana (medición de turbidez)

1) Conjunto de cebadores (Grupo C)

Se realizó el examen para un conjunto de cebadores usando FIP: FA-1101, RIP: RA-1101, F3: F3-1101, R3: R3-1101 y cebadores de bucle: LPF-1101 y LPR-1101 en combinación, y para el conjunto de cebadores al que se añadió inhibidor de RNasa.

2) Preparación de muestra de ARN de CK19 humana

Se prepararon muestras de forma que los números de copias fueran 100000, 10000, 1000 y 0 (control) realizando una operación similar a la del Ejemplo de ensayo 2-1.

3) Composición de solución de reacción

Se usó una solución de reacción que tenía una composición similar a la del Ejemplo de ensayo 2-6 con la excepción de que se añadieron 25 U de inhibidor de RNasa (fabricado por TOYOBO).

4) El método RT-LAMP y 5) la observación de la amplificación se realizaron de una manera similar al Ejemplo de ensayo 2-6.

6) Resultados

Los resultados se muestran en la FIG. 31. Dependiendo del número de copias del molde, se observó el inicio de la amplificación entre 10 y 12 minutos después de iniciar la medición. Al añadir inhibidor de RNasa, se redujo la influencia de las sustancias que inhiben la reacción de amplificación, de forma que se redujo el tiempo necesario hasta que pudo observarse la amplificación.

(Ejemplo de ensayo 3-1) (Referencia)

Este ensayo se realizó para examinar el tiempo necesario hasta que pudo observarse la amplificación desde el inicio de la reacción para cada conjunto de cebadores, medido por el método RT-LAMP usando las siguientes combinaciones de cebadores a partir de los diversos cebadores mostrados en el Ejemplo 3-2.

1) Método para preparar muestra de ARN de CK20 humana

Al realizar RT-PCR usando un cebador diseñado basándose en una secuencia de bases de CK20 humana, se aisló ADNc de CK20 humana a partir de ARN total derivado de KATOIII (células de cáncer de estómago). A partir de ADNc de CK20 humana clonado en pBluescript (plásmido fabricado por STRATAGENE), se sintetizó un producto de transcripción usando un sistema de transcripción *in vitro* (sistema de transcripción *in vitro* Riboprobe (fabricado por Promega)). La concentración de ARN de la solución no diluida obtenida de esta manera se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y, basándose en los resultados, la solución se diluyó en 50 ng/μl de ARN de levadura (fabricado por Ambion) de manera que el número de copias de ARN de CK20 humana fue 600000, y estas soluciones se usaron como soluciones de molde.

2) Conjunto de cebadores

En la Tabla 2 se muestra una diversidad de cebadores que se usaron en las combinaciones.

(Tabla 2) Puede observarse el conjunto de cebadores y el tiempo necesario hasta la amplificación

| FIP | RIP | Cebador F3 | Cebador R3 | Tiempo (min) |
|--------|--------|------------|------------|--------------|
| KFA-5 | KRA-5 | KF3-5 | KR3-5 | 25 |
| KFA-5a | KRA-5 | KF3-5 | KR3-5 | 26 |
| KFA-5b | KRA-5 | KF3-5 | KR3-5 | 23 |
| KFA-5d | KRA-5 | KF3-5 | KR3-5 | 26 |
| KFA-5e | KRA-5 | KF3-5 | KR3-5 | 25 |
| KFA-5f | KRA-5 | KF3-5 | KR3-5 | 24 |
| KFA-5 | KRA-5a | KF3-5 | KR3-5 | 30 |
| KFA-5 | KRA-5b | KF3-5 | KR3-5 | 35 |
| KFA-5 | KRA-5d | KF3-5 | KR3-5 | 30 |
| KFA-5 | KRA-5e | KF3-5 | KR3-5 | 36 |
| KFA-5 | KRA-5f | KF3-5 | KR3-5 | 40 |

3) Composición de la solución de reacción

Se usó una composición similar a la del Ejemplo de ensayo 1-1, y no se añadieron cebadores de bucle

4) Método RT-LAMP

5 A 23 µl de solución de reacción que contenía los cuatro cebadores anteriores, se añadieron 2 µl de muestra de ARN de CK20 humana y la mezcla se calentó a 65°C durante una hora.

5) Observación de amplificación

10 La medición se realizó a tiempo real de una manera similar a la del Ejemplo de ensayo 1-1

6) Resultados

15 El tiempo necesario hasta la amplificación pudo observarse cuando la reacción se realizó usando cada conjunto de cebadores y se muestra en la Tabla 2. Estos resultados muestran que el tiempo máximo es 40 minutos y la amplificación se confirmó en 30 minutos en la mayoría de los conjuntos de cebadores.

(Ejemplo de ensayo 3-2) (Referencia)

20 Este ensayo se realizó para examinar la sensibilidad cuando se realizó la medición por el método RT-LAMP usando un conjunto de cebadores que requería un tiempo corto de observación de amplificación seleccionado a partir de los conjuntos de cebadores examinados en el Ejemplo de ensayo 3-1, y usando un conjunto de cebadores combinado con cebadores de bucle.

25 1) Método para preparar muestra de ARN de CK20 humana

Se prepararon muestras de forma que los números de copias fueran 0, 190, 960, 4800, 24000, 120000 y 600000 respectivamente realizando una operación similar a la del Ejemplo de ensayo 3-1.

30 2) Conjunto de cebadores

Se realizó el examen para los conjuntos de cebadores de las siguientes combinaciones

35 Conjunto 1: FIP (KFA-5b), RIP (KRA-5)
 Cebador F3 (KF3-5), Cebador R3 (KR3-5)
 Cebadores de bucle (K-LPF2, K-LPR1)
 Conjunto 2: FIP (KFA-5b), RIP (KRA-5)
 Cebador F3 (KF3-5), Cebador R3 (KR3-5)
 Cebadores de bucle (K-LPF2, K-LPR2)

40 3) Composición de la solución de reacción

Se usó una composición similar a la del Ejemplo de ensayo 1-1.

45 4) El método RT-LAMP y 5) la observación de la amplificación se realizaron de una manera similar a la del Ejemplo de ensayo 3-1.

6) Resultados

50 El resultado del examen en cuanto al conjunto de cebadores 1 se muestra en la FIG. 32. El resultado muestra que cuanto mayor es la cantidad de molde de ARN de CK20 humana, más corto es el tiempo necesario hasta que puede observarse la amplificación. Sin embargo, incluso en el caso en el que la cantidad de molde fue de 190 copias, se observó amplificación de ADN en 30 minutos, e incluso en el caso en el que la cantidad de molde era de 600000 copias, se observó amplificación de ADN aproximadamente a los 10 minutos. Se obtuvo un resultado similar para el caso del conjunto de cebadores 2.

55

(Ejemplo de ensayo 3-3) (Referencia) Especificidad de amplificación por ARN de CK20 humana

60 Se examinó la especificidad de amplificación por CK20 humana cuando la medición se realizó usando los conjuntos de cebadores seleccionados en el Ejemplo de ensayo 3-2. Se demuestra que las citoqueratinas (CK) tienen isoformas tales como CK18, 19 humanas y similares aparte de CK20 humana. Estas isoformas comprenden una secuencia de bases que tiene aproximadamente un 60% de homología con CK20 humana. Este ensayo se realizó para determinar si CK20 humana podía ensayarse de forma distinguible de CK18 o 19 humanas cuando la medición se realizó usando los conjuntos de cebadores de acuerdo con la presente invención.

65

1) Método para preparar una muestra de ARN

Se preparó una muestra de ARN de CK20 humana que tenía un número de copias de 600000 de una manera similar a la descrita en el Ejemplo de ensayo 3-1. En cuanto los ARN de CK18 humana y CK19 humana, las muestras se prepararon de una manera similar.

- 5 2) Conjunto de cebadores
- Se usaron los conjuntos de cebadores 1 y 2 seleccionados en el Ejemplo de ensayo 3-2.
- 10 3) La composición de la solución de reacción, 4) el método RT-LAMP y 5) la observación de amplificación se realizaron de una manera similar al Ejemplo de ensayo 3-2.

6) Resultados

15 En la FIG. 33 se muestra un resultado del examen en relación con el conjunto de cebadores 1. El resultado demuestra que el ARN de CK20 humana, pero no el ARN de CK18 humana ni el ARN de CK19 humana se amplifican cuando se usa el conjunto de cebadores 1, revelando especificidad por el ARN de CK20 humana. Se obtuvo un resultado similar para el caso del conjunto de cebadores 2.

20 (Ejemplo de ensayo 3-4) (Referencia) Sensibilidad de medición

Este ensayo se realizó para examinar la sensibilidad de medición para el ARN de CK20 humana, cuando la medición se realizó usando cada conjunto de cebadores.

25 1) Método para preparar una muestra de ARN de CK20 humana

Se prepararon muestras de forma que los números de copias fueran 0, 190, 960, 4800, 24000, 120000 y 600000 respectivamente realizando una operación similar a la del Ejemplo de ensayo 3-1.

30 2) Conjunto de cebadores

El examen se realizó para el conjunto de cebadores de la siguiente combinación.

Conjunto 3: FIP (AFA), RIP (ARAF), cebador F3 (AF3), cebador R3 (AR3) Cebadores de Bucle (LPF2, LPR6)

35 3) La composición de la solución de reacción, 4) el método RT-LAMP y 5) la observación de la amplificación se realizaron de una manera similar al Ejemplo de ensayo 3-2.

6) Resultados

40 Los resultados del examen se muestran en la FIG. 34. Los resultados demuestran que cuanto mayor es la cantidad de molde de ARN de CK20 humana, más corto es el tiempo necesario hasta que puede observarse la amplificación. Sin embargo, incluso en el caso en el que la cantidad de molde era de 190 copias, se observó amplificación de ADN en 30 minutos, e incluso en el caso en el que la cantidad de molde era de 600000 copias, se observó amplificación de ADN aproximadamente a los 10 minutos.

(Ejemplo de ensayo 3-5) (Referencia)

50 Este ensayo se realizó para examinar la especificidad de amplificación por ARN de CK20 humana cuando la medición se realizó usando el conjunto de cebadores seleccionado en el Ejemplo de ensayo 3-4.

1) Método para preparar muestra de ARN

55 Se preparó una muestra de ARN de CK20 humana de forma que el número de copias fuera 600000. También se prepararon muestras de ARN de CK18 y CK19 humanas de una manera similar.

2) Conjunto de cebadores

Se seleccionó el conjunto de cebadores (conjunto 3) seleccionado en el Ejemplo de ensayo 3-4.

60 3) La composición de la solución de reacción, 4) el método RT-LAMP y 5) la observación de la amplificación se realizaron de una manera similar al Ejemplo de ensayo 3-2.

6) Resultados

65 Los resultados se muestran en la FIG. 35. Estos resultados demuestran que el ARN de CK20 humana, pero no el

ARN de CK18 humana ni el ARN de CK19 humana se amplifican por el conjunto de cebadores seleccionado.

Aplicabilidad Industrial

5 Como se ha descrito anteriormente, se descubrió que cuando se realiza el método LAMP usando un conjunto de cebadores de la presente invención, el ARN de CK19 humana puede amplificarse con eficacia y especificidad. De acuerdo con este descubrimiento, los conjuntos de cebadores de la presente invención permiten la detección de ARN de CK19 humana en un periodo corto, y se consigue una reducción del tiempo necesario para el diagnóstico de metástasis de cáncer en ganglios linfáticos usando medios de amplificación de ácidos nucleicos.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Sysmex Corporation

15

<120> Cebador CK

<130> GP03-1006PCT

20

<150> JP P2002-145689 <151 > 21-05-2002

<150> JP P2002-175271 <151 > 17-06-2002

<150> JP P2002-199759 <151 > 09-07-2002

<160> 474

25

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 1412

<212> ADN

30

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

cggggtcgtc cgcaaagcct gagtcctgtc cttctctctt ccccggacag catgagcttc      60
accactcgct ccaccttctc caccaactac cggtcctctg gctctgtcca ggcgcccagc      120
tacggcgccc ggccggtcag cagcgcggcc agcgtctatg caggcgctgg gggctctggt      180
tcccgatctt ccgtgtcccg ctccaccagc ttcaggggcg gcatggggtc cgggggacctg      240
gccaccggga tagccggggg tctggcagga atgggaggca tccagaacga gaaggagacc      300
atgcaaagcc tgaacgaccg cctggcctct tacctggaca gagtgaggag cctggagacc      360
gagaaccgga ggctggagag caaaatccgg gagcacttgg agaagaaggg accccaggtc      420
agagactgga gccattactt caagatcatc gaggacctga gggctcagat cttcgcaaat      480
actgtggaca atgcccgcct cgttctgcag attgacaatg cccgtcttgc tgctgatgac      540
tttagagtca agtatgagac agagctggcc atgcgccagt ctgtggagaa cgacatccat      600
gggctccgca aggtcattga tgacaccaat atcacacgac tgacagtgga gacagagatc      660
gaggetctca aggaggagct gctcttcatg aagaagaacc acgaagagga agtaaaaggc      720
ctacaagccc agattgccag ctctgggttg accgtggagg tagatgcccc caaatctcag      780
gacctcgcca agatcatggc agacatccgg gcccaatatg acgagctggc tcggaagaac      840
cgagaggagc tagacaagta ctggtctcag cagattgagg agagcaccac agtggtcacc      900
acacagtctg ctgaggttgg agctgctgag acgacgctca cagagctgag acgtacagtc      960
cagtccttgg agatcgacct ggactccatg agaaatctga aggccagctt ggagaacagc     1020
ctgagggagg tggaggcccg ctacgccta cagatggagc agctcaacgg gatcctgctg     1080

caccttgagt cagagctggc acagaccgg gcagagggac agcgccaggc ccaggagtat     1140
gaggccctgc tgaacatcaa ggtcaagctg gaggctgaga tcgccaccta ccgccgctg     1200
ctggaagatg gcgaggactt taatcttggg gatgccttgg acagcagcaa ctccatgcaa     1260
accatccaaa agaccaccac ccgccggata gtggatggca aagtgggtgc tgagaccaat     1320
gacaccaaag ttctgaggca ttaagccagc agaagcaggg tacccttggg ggagcaggag     1380
gccataaaaa agttcagagt tcattggatg tc .                               1412

```

5 <210> 2
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 2
 tgaagtaatg gctccagtct ctg 23

15 <210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 5 <400> 3
 agtaatggct ccagtctctg ac 22
 <210> 4
 <211> 23
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 15 <400> 4
 ttgaagtaat ggctccagtc tct 23
 <210> 5
 <211> 17
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 5
 acctggggtc ccttctt 17
 30 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 6
 40 gggtccttc ttctcaag 19
 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 7
 50 ggtcccttct tctcaagtgc 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 60 <400> 8
 gtcccttctt ctccaagtgc 20
 <210> 9
 <211> 20
 65 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 5 <400> 9
 tcccttcttc tccaagtgct 20
 <210> 10
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 15 <400> 10
 cccttctct ccaagtgctc 20
 <210> 11
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 11
 ccttctctc caagtgtcc 20
 <210> 12
 <211> 17
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 12
 acagactggc gcatggc 17
 <210> 13
 <211> 19
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 13
 tcaatgacct tgcgagcc 19
 <210> 14
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 55 <400> 14
 atcaatgacc tgcgagcc 20
 <210> 15
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Artificial
 65

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 5 <400> 15
 catcaatgac ctgCGGgagc 20
 <210> 16
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 15 <400> 16
 tcatcaatga ccttCGGgag c 21
 <210> 17
 <211> 19
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 17
 agcctcgatc tctgtctcc 19
 <210> 18
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 18
 gagctggcaa tctgggct 18
 <210> 19
 <211> 18
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 19
 agctggcaat ctgggctt 18
 <210> 20
 <211> 18
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 55 <400> 20
 gctggcaatc tgggcttg 18
 <210> 21
 <211> 21
 60 <212> ADN
 <213> Artificial
 65

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 5 <400> 21
 ctggcaatct gggcttntag g 21
 <210> 22
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 15 <400> 22
 tggcaatctg ggctttagg 20
 <210> 23
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 23
 ggcaatctgg gctttaggc 20
 <210> 24
 <211> 17
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 24
 cacggtcaac ccagagc 17
 <210> 25
 <211> 19
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 25
 gatcttggcg aggtcctga 19
 <210> 26
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 55 <400> 26
 cggatgtctg ccatgatctt g 21
 <210> 27
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Artificial
 65

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 5 <400> 27
 ccagctcgtc atattgggcc 20
 <210> 28
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 15 <400> 28
 cagcagactg tgtggtgacc 20
 <210> 29
 <211> 18
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 29
 gtgagcgtcg tctcagca 18
 <210> 30
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 30
 gctggccttc agatttctca tg 22
 <210> 31
 <211> 21
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 31
 ccaggctct cactctgtcc a 21
 <210> 32
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 55 <400> 32
 tccagtctct gacctggggt c 21
 <210> 33
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Artificial
 65

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 5 <400> 33
 ctccacagac tggcgcgatgg 20
 <210> 34
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 15 <400> 34
 gggcatctac ctccacggtc aa 22
 <210> 35
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 35
 gaccactgtg gtgctctct c 21
 <210> 36
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 36
 cagctccaac ctgacagac tg 22
 <210> 37
 <211> 22
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 37
 ggttgcatg gagttgctgc tg 22
 <210> 38
 <211> 17
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 38
 gagagcaaaa tccggga 17
 <210> 39
 <211> 17
 60 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 65 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 39
 agagcaaaat cggggag 17
 5 <210> 40
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 40
 gagcaaaatc cggggagc 17
 15 <210> 41
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 41
 aatccgggag cacttg 17
 25 <210> 42
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 42
 gaggctggag agcaaaa 17
 35 <210> 43
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 43
 cgtcttgctg ctgatgac 18
 45 <210> 44
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 44
 gtcttgctgc tgatgact 19
 55 <210> 45
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 65

<400> 45
 tagagtcaag tatgagacag agc 23
 5 <210> 46
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 46
 15 agagtcaagt atgagacaga gc 22

 <210> 47
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 47
 25 agtcaagtat gagacagagc t 21

 <210> 48
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 48
 35 gaacgacatc catgggc 17

 <210> 49
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 49
 45 cgaggctctc aaggagg 17

 <210> 50
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 50
 55 gaggctctca aggagga 17

 <210> 51
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 51
 65 gaggctctca aggagga 17

 <210> 51
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 70 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 51
 aggctctcaa ggaggag 17
 5 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 52
 catgaagaag aaccacgaag 20
 15 <210> 53
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 53
 gcctacaagc ccagattg 18
 25 <210> 54
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 54
 gttgaccgtg gaggtag 17
 35 <210> 55
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 55
 ccccaaatct caggacc 17
 45 <210> 56
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 56
 accgagagga gctagac 17
 55 <210> 57
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 65

<400> 57
 aggagagcac cacagtg 17

 5 <210> 58
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 58
 gagctgagac gtacagtc 18
 15
 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 59
 gagacatgc aaagcctgaa 20
 25
 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 60
 gaggctggag agcaaaatcc 20
 35
 <210> 61
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45
 <400> 61
 cgtcttgctg ctgatgact 20

 <210> 62
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 62
 ggaagtaaaa ggctacaag cc 22
 55
 <210> 63
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 65

<400> 63
 gaaccgagag gagctagaca a 21
 5 <210> 64
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 64
 gtctcagcag attgaggaga g 21
 15 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 65
 tggaagatgg cgaggacttt 20
 25 <210> 66
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 66
 ctggcctctt acctgga 17
 35 <210> 67
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 67
 aggagaccat gcaaagc 17
 45 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 68
 tcttcgcaaa tactgtggac 20
 55 <210> 69
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 65

<400> 69
 cagatcttcg caaactgtg g 21
 5
 <210> 70
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 70
 tcgcaaatac tgtggacaa 19
 15
 <210> 71
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 71
 caaactgtg ggacaatgcc 20
 25
 <210> 72
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 72
 cgtcttgctg ctgatgac 18
 35
 <210> 73
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 73
 agtcaagtat gagacagagc t 21
 45
 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 74
 caccaatatc acacgactgc 20
 55
 <210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 65

<400> 75
 catgaagaag aaccacgaag 20
 5 <210> 76
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 76
 agaaccacga agaggaag 18
 15 <210> 77
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 77
 ggtgaccgtg gaggtag 17
 25 <210> 78
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 78
 ccaatatga cgagctgg 18
 35 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 79
 aggagctaga caagtactgg 20
 45 <210> 80
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 80
 caagtactgg tctcagcag 19
 55 <210> 81
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 65

<400> 81
 tctgctgagg ttggagc 17
 5
 <210> 82
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 82
 gaggcatcca gaacgagaag 20
 15
 <210> 83
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 83
 agcctggaga ccgagaac 18
 25
 <210> 84
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 84
 aatgcccgca tcgttctg 18
 35
 <210> 85
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 85
 ggaggagctg ctcttcatg 19
 45
 <210> 86
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 86
 ccgggcccaa tatgacga 18
 55
 <210> 87
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 65

<400> 87
 ccgagaggag ctagacaagt 20

5

<210> 88
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 88
 tgagatcgcc acctaccg 18

15

<210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 89
 gatcatcgag gacctgaggg 20

25

<210> 90
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 90
 cagagactgg agccattact tca 23

35

<210> 91
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

45

<400> 91
 gactggagcc attacttcaa gate 24

50

<210> 92
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 92
 actggagcca ttacttcaag atca 24

60

<210> 93
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 93
 ctggagccat tactcaaga tcatc 25
 5 <210> 94
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 94
 15 tggagccatt actcaagat catcg 25
 <210> 95
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 95
 25 ggagccatta ctcaagatc atcg 24
 <210> 96
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 96
 35 gagccattac tcaagatca tcgag 25
 <210> 97
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 97
 45 agccattact tcaagatcat cgagg 25
 <210> 98
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 98
 55 gccattact caagatcatc gagg 24
 <210> 99
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 65

<400> 99
 ccattacttc aagatcatcg aggac 25
 5 <210> 100
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 100
 cattactca agatcatcga ggacc 25
 15 <210> 101
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 101
 agaacgacat ccatgggct 19
 25 <210> 102
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 102
 gaacgacatc catgggctc 19
 35 <210> 103
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 103
 aacgacatcc atgggctcc 19
 45 <210> 104
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 104
 acgacatcca tgggctcc 18
 55 <210> 105
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 65

<400> 105
 catgggctcc gcaaggt 17
 5 <210> 106
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 106
 tcacacgact gcagctgg 18
 15 <210> 107
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 107
 caccaatatc acacgactgc ag 22
 25 <210> 108
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 108
 tatcacacga ctgcagctgg 20
 <210> 109
 <211> 19
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 109
 atcacacgac tgcagctgg 19
 <210> 110
 <211> 24
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 55 <400> 110
 ttcacgaaga agaaccacga agag 24
 60 <210> 111
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 111
 agctctgggt tgaccgtg 18
 5 <210> 112
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 112
 gctctgggtt gaccgtg 17
 15 <210> 113
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 113
 ctctgggttg accgtgg 17
 25 <210> 114
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 114
 tctgggttga ccgtgga 17
 35 <210> 115
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 115
 ctgggtgac cgtggag 17
 45 <210> 116
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 116
 tgggtgacc gtggagg 17
 55 <210> 117
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 65

<400> 117
 ggttgaccgt ggaggtaga 19
 5 <210> 118
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 118
 ggtgaccgtg gaggtatg c 21
 15 <210> 119
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 119
 ttgaccgtgg aggtatgac 20
 25 <210> 120
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 120
 tgaccgtgga ggtagatgc 19
 35 <210> 121
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 121
 gaccgtggag gtagatgcc 19
 45 <210> 122
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 122
 accgtggagg tagatgcc 18
 55 <210> 123
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 65

<400> 123
 gcccccaaat ctgaggac 18

5

<210> 124
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 124
 cccaatatga cgagctggct 20

15

<210> 125
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 125
 caagtactgg tctcagcaga ttg 23

25

<210> 126
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

35

<400> 126
 tgctgagacg acgctcac 18

40

<210> 127
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

45

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 127
 tgagacgtac agtccagtcc 20

50

<210> 128
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 128
 acagcctgag ggaggtg 17

60

<210> 129
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 129
 cgagaaccgg aggctggaga 20

5 <210> 130
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 130
 15 agatcatcga ggacctgagg gc 22

<210> 131
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 131
 25 gacatccatg ggctccgcaa 20

<210> 132
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 132
 35 caggacctcg ccaagatcat gg 22

<210> 133
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 133
 45 cacacagtct gctgaggttg ga 22

<210> 134
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 134
 55 gagacgacgc tcacagagct g 21

<210> 135
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

65 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 135
 ccacccgccg gatagtggat 20
 5
 <210> 136
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 136
 gtcatcagca gcaagacg 18
 15
 <210> 137
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 137
 agtcatcagc agcaagacg 19
 25
 <210> 138
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35
 <400> 138
 gcattgtcca cagtatttgc 20
 40
 <210> 139
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 139
 cattgtccac agtatttgcg 20
 50
 <210> 140
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 140
 attgtccaca gtatttgcga 20
 60
 <210> 141
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 141
 ttgccacag tatttgcga 19

5

<210> 142
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 142
 tgccacagt atttgcgaa 19

15

<210> 143
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 143
 gtccacagta ttgccaaga 20

25

<210> 144
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 144
 tccacagtat ttgccaagat c 21

35

<210> 145
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

45

<400> 145
 ccacagtatt tgccaagatc t 21

50

<210> 146
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 146
 cacagtattt gcgaagatct g 21

60

<210> 147
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 147
 ctctccttg agagcct 17
 5 <210> 148
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 148
 tcctcctga gagcctc 17
 15 <210> 149
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 149
 cctccttgag agcctcg 17
 25 <210> 150
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 150
 ctcttgaga gcctcga 17
 35 <210> 151
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 151
 ccttgagagc ctcgatc 17
 45 <210> 152
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 152
 cttgagagcc tcgatctc 18
 55 <210> 153
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 152
 cttgagagcc tcgatctc 18
 65 <210> 153
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 70 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 153
 gagcctcgat ctctgtc 17
 5 <210> 154
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 154
 agcctcgatc tctgtctc 18
 15 <210> 155
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 155
 gcctcgatct ctgtctc 17
 25 <210> 156
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 156
 acttcctctt cgtgggtc 18
 35 <210> 157
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 157
 ggccttttac ttctcttcg 20
 45 <210> 158
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 158
 tacttctctt tcgtgggtc 19
 55 <210> 159
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 65

<400> 159
 tacctccacg gtcaacc 17
 5
 <210> 160
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 160
 cggatgtctg ccatgatc 18
 15
 <210> 161
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 161
 ggatgtctgc catgatctt 19
 25
 <210> 162
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 162
 ccagctcgtc atattggg 18
 35
 <210> 163
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 163
 caatctgctg agaccagtac 20
 45
 <210> 164
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 164
 tctgctgaga ccagtactt 19
 55
 <210> 165
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 65

<400> 165
 ctccaacctc agcagac 17

5

<210> 166
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 166
 agtccaggtc gatctcc 17

15

<210> 167
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 167
 tggcctcag atttctcatg 20

25

<210> 168
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 168
 caagctggcc ttcagatt 18

35

<210> 169
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

45

<400> 169
 aaggtgcagc aggatcc 17

50

<210> 170
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 170
 taatggctcc agtctctgac c 21

60

<210> 171
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 171
 tcaatctgca gaacgatgcg 20

5

<210> 172
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 172
 gagagcctcg atctctgtct c 21

15

<210> 173
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 173
 gagagcctcg atctctgtct 20

25

<210> 174
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 174
 ttgtctagct cctctcggtt c 21

35

<210> 175
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 175
 ttgtctagct cctctcggtt 20

45

<210> 176
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 176
 caggctgatc tccaaggact 20

55

<210> 177
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

65

<400> 177
 gctggccttc agatttctca 20

5

<210> 178
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 178
 gctggccttaa tgcctcagaa 20

15

<210> 179
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 179
 agctctgtct catacttgac t 21

25

<210> 180
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 180
 agtcatcagc agcaagacg 19

35

<210> 181
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 181
 gtcatcagca gcaagacg 18

45

<210> 182
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 182
 ggcccttttac ttctcttcg 20

55

<210> 183
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

65

<400> 183
 acttcctctt cgtgggtc 18

5

<210> 184
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 184
 ctggcaatct gggcttg 17

15

<210> 185
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 185
 gaggtcctga gatttggg 18

25

<210> 186
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 186
 tctagctcct ctcggttc 18

35

<210> 187
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

45

<400> 187
 caatctgctg agaccagtac 20

50

<210> 188
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 188
 ctccaacctc agcagac 17

60

<210> 189
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 189
 cagactgtgt ggtgacc 17
 5
 <210> 190
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 190
 actgtggtgc tctcctc 17
 15
 <210> 191
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 191
 gactgtacgt ctgagctc 18
 25
 <210> 192
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 192
 ggctgttctc caagctg 17
 35
 <210> 193
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 193
 catctgtagg gcgtagcg 18
 45
 <210> 194
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 194
 catactcctg ggcctgg 17
 60
 <210> 195
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 195
 gcgaagatct gagccctca 19
 5 <210> 196
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 196
 catcagcagc aagacggg 18
 15 <210> 197
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 197
 25 tgaagagcag ctcctcctt 19
 <210> 198
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 198
 gctctcctca atctgctgag 20
 <210> 199
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 199
 gctggccttc agatttctca 20
 <210> 200
 50 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 200
 cctccctcag gctgttctc 19
 60 <210> 201
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 201
 ccaaagggta cctgcttc 19
 5 <210> 202
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 202
 acctggggtc ccttct 17
 15 <210> 203
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 203
 gggtccttc ttctcaag 19
 25 <210> 204
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 204
 ggtcccttc tctcaagt 20
 35 <210> 205
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 205
 caagtgtcc cggatttgc 20
 45 <210> 206
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 206
 aagtgtccc ggatttgc 19
 55 <210> 207
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 65

<400> 207
 agtgctcccg gatttgct 19
 5 <210> 208
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 208
 gtgctcccg attttgct 19
 15 <210> 209
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 209
 tgctcccgga ttttgctct 19
 25 <210> 210
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 210
 gctcccgga tttgctct 19
 35 <210> 211
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 211
 cagctctgtc tcatactga ctct 24
 45 <210> 212
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

 <400> 212
 acagactggc gcatggc 17
 55 <210> 213
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 65

<400> 213
 cctcttcgtg gttcttcttc at 22

5

<210> 214
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 214
 cctcagcaga ctgtgtggt 19

15

<210> 215
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 215
 cagcagactg tgtggtgacc 20

25

<210> 216
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

35

<400> 216
 cagctctgtc tcatactga ctct 24

40

<210> 217
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

45

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 217
 gagctggcaa tctgggct 18

50

<210> 218
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 218
 tgtccaaggc atcaccaaga 20

60

<210> 219
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 219
 gtccaaggca tcaccaagat t 21

5

<210> 220
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 220
 cgcaaatact gtggacaatg cc 22

15

<210> 221
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 221
 cagatcttcg caaatactgt ggac 24

25

<210> 222
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

35

<400> 222
 gatcatcgag gacctgaggg 20

40

<210> 223
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

45

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 223
 ccaatatcac acgactgcag c 21

50

<210> 224
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 224
 ttgatgacac caatatcaca cgac 24

60

<210> 225
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 225
 tcacacgact gcagctgg 18
 5 <210> 226
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 226
 15 tcgaggctct caaggagg 18
 <210> 227
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 227
 25 ccccaaatc tcaggacc 18
 <210> 228
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 228
 35 gagatcgacc tggactc 17
 <210> 229
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 229
 45 gacaccaata tcacacgact gc 22
 <210> 230
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 230
 55 tgacaccaat atcacacgac tgc 23
 <210> 231
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 65

<400> 231
 acaccaatat cacacgactg ca 22

5

<210> 232
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 232
 ggccaatat gacgagctgg 20

15

<210> 233
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 233
 tggcaaagtg gtgtctgaga 20

25

<210> 234
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 234
 tgaagtaatg gctccagtct ctggagagca aaatccggga 40

35

<210> 235
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 235
 tgaagtaatg gctccagtct ctgagagcaa aatccgggag 40

45

<210> 236
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 236
 tgaagtaatg gctccagtct ctggagcaaa atccgggagc 40

55

<210> 237
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

65

<400> 237
 tgaagtaatg gctccagtct ctgaatccgg gagcacttg 40

5 <210> 238
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

15 <400> 238
 agtaatggct ccagtctctg acgagagcaa aatccggga 39

20 <210> 239
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

30 <400> 239
 agtaatggct ccagtctctg acagagcaaa atccgggag 39

35 <210> 240
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

45 <400> 240
 agtaatggct ccagtctctg acgagcaaaa tccgggagc 39

50 <210> 241
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

60 <400> 241
 agtaatggct ccagtctctg acaatccggg agcacttg 39

65 <210> 242
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

70 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

75 <400> 242
 tgaagtaat ggctccagtc tctgagagca aatccggga 40

80 <210> 243
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

85 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

<400> 243
 ttgaagtaat ggctccagtc tctagagcaa aatccgggag 40
 5 <210> 244
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 244
 ttgaagtaat ggctccagtc tctgagcaaa atccgggagc 40
 15 <210> 245
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 245
 ttgaagtaat ggctccagtc tctaaccgg gagcacttgg 40
 25 <210> 246
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 246
 gggtccttc ttctcaagg aggctggaga gcaaaa 36
 40 <210> 247
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 247
 acctggggtc ccttcttgag gctggagagc aaaa 34
 50 <210> 248
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 248
 ggtcccttct tctcaagtg gaggctggag agcaaaa 37
 60 <210> 249
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

| | | |
|----|---|----|
| | <400> 249 tcccttctc tccaagtct gaggctggag agcaaaa | 37 |
| 5 | <210> 250 <211> 37 <212> ADN <213> Artificial | |
| 10 | <220> <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18 | |
| 15 | <400> 250 ccttctctc caagtgtcc gaggctggag agcaaaa | 37 |
| 20 | <210> 251 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial | |
| 25 | <220> <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18 | |
| 30 | <400> 251 acagactggc gcatggcgt cttgctgctg atgac | 35 |
| 35 | <210> 252 <211> 36 <212> ADN <213> Artificial | |
| 40 | <220> <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18 | |
| 45 | <400> 252 acagactggc gcatggcgtc ttgctgctga tgact | 36 |
| 50 | <210> 253 <211> 42 <212> ADN <213> Artificial | |
| 55 | <220> <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18 | |
| 60 | <400> 253 tcaatgacct tgcggagcct agagtcaagt atgagacaga gc | 42 |
| 65 | <210> 254 <211> 41 <212> ADN <213> Artificial | |
| 70 | <220> <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18 | |
| 75 | <400> 254 tcaatgacct tgcggagcca gagtcaagta tgagacagag c | 41 |
| 80 | <210> 255 <211> 40 <212> ADN <213> Artificial | |
| 85 | <220> <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18 | |

<400> 255

5 tcaatgacct tgcggagcca gtcaagtatg agacagagct 40

<210> 256
<211> 43
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

15 <400> 256
atcaatgacc ttgcggagcc tagagtcaag tatgagacag agc 43

<210> 257
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

25 <400> 257
atcaatgacc ttgcggagcc agagtcaagt atgagacaga gc 42

<210> 258
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

35 <400> 258
atcaatgacc ttgcggagcc agtcaagtat gagacagagc t 41

<210> 259
<211> 43
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

45 <400> 259
catcaatgac ctgcggagc tagagtcaag tatgagacag agc 43

<210> 260
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18

55 <400> 260
catcaatgac ctgcggagc agagtcaagt atgagacaga gc 42

<210> 261
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>

65

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 261
 5 catcaatgac cttgcgagc agtcaagtat gagacagagc t 41
 <210> 262
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 262
 15 tcatcaatga ccttgcgagc ctagagtcaa gtatgagaca gagc 44
 <210> 263
 <211> 43
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 263
 tcatcaatga ccttgcgagc cagagtcaag tatgagacag agc 43
 <210> 264
 <211> 42
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 264
 tcatcaatga ccttgcgagc cagtcaagta tgagacagag ct 42
 <210> 265
 <211> 36
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 265
 agcctcgatc tctgtctccg aacgacatcc atgggc 36
 50 <210> 266
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 266
 60 ggcaatctgg gctttaggc cgaggctctc aaggagg 37
 <210> 267
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 267
 5 gagctggcaa tctgggctcg aggctctcaa ggagg 35
 <210> 268
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 268
 15 gagctggcaa tctgggctag gctctcaagg aggag 35
 <210> 269
 <211> 37
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 269
 tggcaatctg ggctttagg cgaggctctc aaggagg 37
 <210> 270
 <211> 37
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 270
 tggcaatctg ggctttagg aggctctcaa ggaggag 37
 <210> 271
 <211> 37
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 271
 ggcaatctgg gctttaggc gaggctctca aggagga 37
 <210> 272
 <211> 37
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 55 <400> 272
 ggcaatctgg gctttaggc aggctctcaa ggaggag 37
 <210> 273
 <211> 37
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 65

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 273
 cacggtcaac ccagagccat gaagaagaac cacgaag 37
 5
 <210> 274
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 274
 gatctggcg aggtcctgag cctacaagcc cagattg 37
 15
 <210> 275
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 275
 cggatgtctg ccatgatctt ggtgaccgt ggaggtag 38
 25
 <210> 276
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 276
 ccagctcgtc atattgggcc ccccaaatct caggacc 37
 35
 <210> 277
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 277
 cagcagactg tgtggtgacc accgagagga gctagac 37
 45
 <210> 278
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 278
 gtgagcgtcg tctcagcaag gagagcacca cagtg 35
 60
 <210> 279
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65
 <220>

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 279
 5 gctggccttc agatttctca tggagctgag acgtacagtc 40
 <210> 280
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 280
 15 ccaggctcct cactctgtcc agagaccatg caaagcctga a 41
 <210> 281
 <211> 38
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 281
 tccagtctct gacctggggt cgaggctgga gagcaaaa 38
 <210> 282
 <211> 38
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 282
 ctccacagac tggcgcgatgg cgtcttgctg ctgatgac 38
 <210> 283
 <211> 44
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 283
 gggcatctac ctccacggtc aaggaagtaa aaggcctaca agcc 44
 50 <210> 284
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 284
 60 gaccactgtg gtgctctct cgaaccgaga ggagctagac aa 42
 <210> 285
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 285
 5 cagctccaac ctcagcagac tggctcagc agattgagga gag 43
 <210> 286
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 286
 15 ggtttgcattg gagttgctgc tgggaagat ggcgaggact tt 42
 <210> 287
 <211> 38
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 287
 gatcatcgag gacctgaggg gtcatcagca gcaagacg 38
 <210> 288
 <211> 39
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 288
 gatcatcgag gacctgaggg agtcatcagc agcaagacg 39
 <210> 289
 <211> 44
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 289
 cagagactgg agccattact tcacacagta ttgccaaga tctg 44
 <210> 290
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 290
 55 cagagactgg agccattact tcacacag tatttgcgaa gatc 44
 <210> 291
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 65

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 291
 5 cagagactgg agccattact tcatgtccac agtattgcg aa 42
 <210> 292
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 292
 15 cagagactgg agccattact tcaattgtcc acagtattg cga 43
 <210> 293
 <211> 43
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 293
 cagagactgg agccattact tcagcattgt ccacagtatt tgc 43
 <210> 294
 <211> 45
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 294
 gactggagcc attacttcaa gatccacagt attgccaag atctg 45
 <210> 295
 <211> 43
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 295
 gactggagcc attacttcaa gatctgtcca cagtattgc gaa 43
 <210> 296
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 296
 55 gactggagcc attacttcaa gatcattgtc cacagtattt goga 44
 <210> 297
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 65

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 297
 5 catgggctcc gcaaggtcct ccttgagagc ctcg 34
 <210> 298
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 298
 15 agaacgacat ccatgggctg agcctcgatc tctgtc 36
 <210> 299
 <211> 36
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 299
 gaacgacatc catgggctcc ctcttgaga gcctcg 36
 <210> 300
 <211> 36
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 300
 gaacgacatc catgggctcg agcctcgatc tctgtc 36
 <210> 301
 <211> 36
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 301
 gaacgacatc catgggctcg cctcgatctc tgtctc 36
 <210> 302
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 302
 55 acgacatcca tgggctcccc tcttgagag cctcg 35
 <210> 303
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 65

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 303
 5 acgacatcca tgggctccga gcctcgatct ctgtc 35
 <210> 304
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 304
 15 acgacatcca tgggctccgc ctcgatctct gtctc 35
 <210> 305
 <211> 34
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 305
 catgggctcc gcaaggtcct tgagagcctc gatc 34
 <210> 306
 <211> 34
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 306
 catgggctcc gcaaggtgag cctcgatctc tgtc 34
 <210> 307
 <211> 36
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 307
 tcacacgact gcagctggac ttctcttcg tggttc 36
 <210> 308
 <211> 38
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 55 <400> 308
 60 tcacacgact gcagctgggg ccttttactt cctcttcg 38
 <210> 309
 <211> 37
 <212> ADN
 65 <213> Artificial
 <220>

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 309
 tcacacgact gcagctggta cttcctcttc gtgggtc 37
 5
 <210> 310
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 310
 caccaatatac acacgactgc agactctctc ttcgtgggtc 40
 15
 <210> 311
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 311
 caccaatatac acacgactgc agtactctct cttcgtgggt c 41
 25
 <210> 312
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 312
 caccaatatac acacgactgc agggcctttt acttctcttt cg 42
 35
 <210> 313
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 313
 atcacacgac tgcagctgga cttcctcttc gtgggtc 37
 45
 <210> 314
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 314
 atcacacgac tgcagctggt acttctcttt cgtgggtc 38
 55
 <210> 315
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 65

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 315
 atcacacgac tgcagctggg gcctttact tcctcttcg 39
 5
 <210> 316
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 316
 15 taccacacga ctgcagctgg acttctctt cgtgggtc 38
 <210> 317
 <211> 39
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 317
 taccacacga ctgcagctgg tacttctctt cgtgggtc 39
 <210> 318
 <211> 40
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 318
 taccacacga ctgcagctgg ggcctttac ttctcttcg 40
 <210> 319
 <211> 41
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 319
 ttcatgaaga agaaccacga agagtacctc cacggtcaac c 41
 50 <210> 320
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 320
 60 ctgggttgac cgtggagcgg atgtctgcca tgatc 35
 <210> 321
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 321
 5 ctgggtgac cgtggaggga tgtctgcat gatctt 36
 <210> 322
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 322
 15 gttgaccgtg gaggtagatg ccggtgtct gccatgatc 39
 <210> 323
 <211> 37
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 323
 tgaccgtgga ggtagatgcc ggatgtctgc catgatc 37
 <210> 324
 <211> 36
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 324
 accgtggagg tagatgcccg gatgtctgcc atgatc 36
 <210> 325
 <211> 38
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 325
 tgaccgtgga ggtagatgcg gatgtctgcc atgatctt 38
 <210> 326
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 326
 55 accgtggagg tagatgccgg atgtctgcca tgatctt 37
 <210> 327
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 65

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 327
 gcccccaaat ctcaggaccc agctcgtcat attggg 36
 5
 <210> 328
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 328
 15 cccaatatga cgagctggct caatctgctg agaccagtac 40
 <210> 329
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 329
 caagtactgg tctcagcaga ttgctccaac ctcagcagac 40
 <210> 330
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 330
 tgctgagacg acgctcacag tccaggtcga tctcc 35
 <210> 331
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 331
 tgagacgtac agtccagtcc caagctggcc ttcagatt 38
 50 <210> 332
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 332
 60 tgagacgtac agtccagtcc tggcctcag atttctcatg 40
 <210> 333
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 333
 5 acagcctgag ggaggtgaag gtcagcagg atcc 34
 <210> 334
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 334
 15 cgagaaccgg aggctggaga taatggctcc agtctctgac c 41
 <210> 335
 <211> 42
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 25 <400> 335
 agatcatcga ggacctgagg gctcaatctg cagaacgatg cg 42
 <210> 336
 <211> 41
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 35 <400> 336
 gacatccatg ggctccgcaa gagagcctcg atctctgtct c 41
 <210> 337
 <211> 40
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 45 <400> 337
 gacatccatg ggctccgcaa gagagcctcg atctctgtct 40
 <210> 338
 <211> 43
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 55 <400> 338
 caggacctcg ccaagatcat gggaaccgag aggagctaga caa 43
 60 <210> 339
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 339
 5 cacacagtct gctgaggttg gacaggtcga tctccaagga ct 42
 <210> 340
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 340
 15 gagacgacgc tcacagagct ggctggcctt cagattctc a 41
 <210> 341
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK18
 <400> 341
 25 ccacccgccg gatagtggat gctggcttaa tgcctcagaa 40
 <210> 342
 <211> 1360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 342

cggggggttgc tccgtccgtg ctccgcctcg ccatgacttc ctacagctat cgccagtcgt 60
 cggccacgtc gtccttcgga ggccctgggcg gcggtccgt gcgttttggg ccggggggtcg 120
 cttttcgcgc gccagcatt cacgggggct ccggcgccg cggcgtatcc gtgtcctccg 180
 cccgctttgt gtcctcgtcc tcctcggggg gctacggcgg cggctacggc ggcgtcctga 240
 ccgcgtccga cgggctgctg gcgggcaacg agaagctaac catgcagaac ctcaacgacc 300
 gcctggcctc ctacctggac aagggtgcgc ccctggaggc ggccaacggc gagctagagg 360
 tgaagatccg cgactggtac cagaagcagg ggctgggcc ctcccgcgac tacagccact 420
 actacacgac catccaggac ctgcgggaca agattcttgg tgccaccatt gagaactcca 480
 ggattgtcct gcagatcgac aacgcccgtc tggctgcaga tgacttccga accaagtttg 540
 agacggaaca ggctctgcgc atgagcgtgg aggccgacat caacggcctg cgcagggcgc 600
 tggatgagct gaccctggcc aggaccgacc tggagatgca gatcgaaggc ctgaaggaa 660
 agctggccta cctgaagaag aaccatgagg aggaaatcag tacgctgagg ggccaagtgg 720
 gagccagggt cagtgtggag gtggattccg ctccgggcac cgatctcgcc aagatcctga 780
 gtgacatgcg aagccaatat gaggtcatgg ccgagcagaa ccggaaggat gctgaagcct 840
 ggttcaccag cggactgaa gaattgaacc gggaggtcgc tggccacacg gagcagctcc 900
 agatgagcag gtccgaggtt actgacctgc ggcgcaccct tcagggtctt gagatgagc 960
 tgcagtcaca gctgagcatg aaagctgcct tggaaagcac actggcagaa acggagggcg 1020
 gctttggagc ccagctggcg catatccagg cgctgatcag cggatttgaa gccagctgg 1080
 cggatgtgcg agctgatagt gagcggcaga atcaggagta ccagcggctc atggacatca 1140
 agtcgcggct ggagcaggag attgccacct accgcagcct gctcgaggga caggaagatc 1200
 actacaacaa tttgtctgcc tccaaggctc tctgaggcag caggctctgg ggcttctgct 1260
 gtcctttgga ggggtgtctc tgggtagagg gatgggaagg aagggaccct taccgccggc 1320
 tcttctctg acctgccaat aaaaatttat ggtccaaggg 1360

5 <210> 343
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 343
 tgtagtagtg gctgtagtcg cg 22

15 <210> 344
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 344
 tcgtgtagta gtggctgtag tcg 23
 5
 <210> 345
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 345
 ggagttctca atggggcac ca 22
 15
 <210> 346
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 346
 ttggcccctc agcgtac 17
 25
 <210> 347
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 347
 agcggaatcc acctccac 18
 35
 <210> 348
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 348
 aatccacctc cacactgacc 20
 45
 <210> 349
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 349
 atccacctcc aactgacc 19
 55
 <210> 350
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 65

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 350
 tccacctcca cactgacc 18
 5
 <210> 351
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 351
 agctagaggt gaagatccg 19
 15
 <210> 352
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 352
 agatccgcga ctggtac 17
 25
 <210> 353
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 353
 gtgaagatcc gcgactg 17
 35
 <210> 354
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 354
 actactacac gaccatccag g 21
 45
 <210> 355
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 355
 aagagctggc ctacctg 17
 55
 <210> 356
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 65

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 356
 gaggaatca gtacgctgag 20
 5
 <210> 357
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 357
 gctaaccatg cagaacctc 19
 15
 <210> 358
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 358
 tggtaaccaga agcagggg 18
 25
 <210> 359
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 359
 acctggagat gcagatcg 18
 35
 <210> 360
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 360
 aagagctggc ctacctg 17
 45
 <210> 361
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 361
 agctggccta cctgaag 17
 55
 <210> 362
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 65

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 362
 5 gtcaccat tgagaactcc 20
 <210> 363
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 363
 15 tgcctgcag atcgacaacg c 21
 <210> 364
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 25 <400> 364
 gtctgcaga tcgacaacgc c 21
 <210> 365
 <211> 18
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 35 <400> 365
 aggtcagtgt ggaggtgg 18
 <210> 366
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 45 <400> 366
 tctcgccaag atcctgagtg 20
 <210> 367
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 55 <400> 367
 60 tcgccaagat cctgagtgac 20
 <210> 368
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 368
 agatcctgag tgacatgcca ag 22
 5
 <210> 369
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 369
 gggtcgaag tcactctgc 18
 15
 <210> 370
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 370
 cgtctcaaac ttggtcga 20
 25
 <210> 371
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 371
 tccgtctcaa acttggttcg 20
 35
 <210> 372
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 372
 cgcattcac tcaggatc 18
 45
 <210> 373
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 373
 caggcttcag catccttc 18
 55
 <210> 374
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 65

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 374
 5 ggtgaaccag gcttcag 17
 <210> 375
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 375
 15 gtgaaccagg cttcagc 17
 <210> 376
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 25 <400> 376
 gaaccaggct tcagcatc 18
 <210> 377
 <211> 17
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 35 <400> 377
 accaggcttc agcatcc 17
 <210> 378
 <211> 17
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 45 <400> 378
 agagcctgtt ccgtctc 17
 <210> 379
 <211> 18
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 55 <400> 379
 60 gtggaggccg acatcaac 18
 <210> 380
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 380
 caggcttcag catccttc 18
 5
 <210> 381
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 381
 tcggacctgc tcatctg 17
 15
 <210> 382
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 382
 tcagtaacct cggacctg 18
 25
 <210> 383
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 383
 agtaacctcg gacctgc 17
 35
 <210> 384
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 384
 taacctcgga cctgctc 17
 45
 <210> 385
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 385
 aggccctgc ttctg 15
 60
 <210> 386
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65
 <220>

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 386
 gcccctgctt ctggt 15
 5
 <210> 387
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 387
 cccctgcttc tggacc 17
 15
 <210> 388
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 388
 cccctgcttc tggacca 18
 25
 <210> 389
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 389
 gcccctgctt ctggtacc 18
 35
 <210> 390
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 390
 agggccctgc ttctgg 16
 45
 <210> 391
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 391
 ggcccctgct tctggt 16
 55
 <210> 392
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 65

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 392
 5 agaatcttgt cccgcagg 18
 <210> 393
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 393
 15 gaatctgtgc ccgcagg 17
 <210> 394
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 25
 <400> 394
 tgatttcctc ctcatggttc 20
 <210> 395
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 35
 <400> 395
 gatttcctcc tcatggttct 20
 <210> 396
 <211> 19
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 45
 <400> 396
 tcctcctcat ggttcttct 19
 <210> 397
 <211> 17
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 55
 <400> 397
 actgacctgg cctccca 17
 <210> 398
 <211> 15
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 65

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 398
 cctcccactt ggccc 15
 5
 <210> 399
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 399
 agatcgacaa cgcccgtc 18
 15
 <210> 400
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 400
 atcgacaacg cccgtctg 18
 25
 <210> 401
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 401
 atcgacaacg cccgt 15
 35
 <210> 402
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 402
 tcgacaacgc ccgt 14
 45
 <210> 403
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 403
 ccgtctggct gcaga 15
 55
 <210> 404
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 65

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 404
 5 cgctcggctg cagatga 17
 <210> 405
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 405
 15 gtctggctgc agatgact 18
 <210> 406
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 25 <400> 406
 tctggctgca gatgactt 18
 <210> 407
 <211> 16
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 35 <400> 407
 tccgggcacc gatctc 16
 <210> 408
 <211> 16
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 45 <400> 408
 ggcaccgatc tcgcca 16
 <210> 409
 <211> 15
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 55 <400> 409
 gggcaccgat ctgcg 15
 <210> 410
 <211> 15
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 65

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 410
 gcaccgatct cgcca 15
 5
 <210> 411
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 411
 tcatggccga gcagaacc 18
 15
 <210> 412
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 412
 catggccgag cagaac 16
 25
 <210> 413
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 413
 tgtagtagtg gctgtagtgc cgagctagag gtgaagatcc g 41
 35
 <210> 414
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 414
 tgtagtagtg gctgtagtgc cgagatccgc gactggtac 39
 45
 <210> 415
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 415
 tcgtgtagta gtggctgtag tcgagctaga ggtgaagatc cg 42
 55
 <210> 416
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 65

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 416
 5 tcgtgtagta gtggctgtag tcggtgaaga tccgcgactg 40
 <210> 417
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 417
 15 tcgtgtagta gtggctgtag tcgagatccg cgactggtac 40
 <210> 418
 <211> 38
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 25 <400> 418
 gtgccaccat tgagaactcc ggttcggaag tcatctgc 38
 <210> 419
 <211> 43
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 35 <400> 419
 ggagttctca atggtggcac caactactac acgaccatcc agg 43
 <210> 420
 <211> 41
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 45 <400> 420
 tgcctgcag atcgacaacg ccgtctcaa cttggttcg a 41
 50 <210> 421
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 421
 60 gtcctgcaga tcgacaacgc ctccgtctca aactggttc g 41
 <210> 422
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 422
 5 tggcccctc agcgtacaag agctggccta cctg 34
 <210> 423
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 423
 15 aggtcagtgt ggagtggcg catgtcactc aggatc 36
 <210> 424
 <211> 38
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 25 <400> 424
 agcggaatcc acctccacga ggaaatcagt acgctgag 38
 <210> 425
 <211> 40
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 35 <400> 425
 aatccacctc cactgacc gaggaaatca gtacgctgag 40
 <210> 426
 <211> 39
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 45 <400> 426
 atccacctcc acactgaccg aggaaatcag tacgctgag 39
 <210> 427
 <211> 38
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 55 <400> 427
 60 tccacctcca cactgaccga ggaaatcagt acgctgag 38
 <210> 428
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 428
 5 tctcgccaag atcctgagtg caggcttcag catccttc 38
 <210> 429
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 <400> 429
 15 tctcgccaag atcctgagtg ggtgaaccag gcttcag 37
 <210> 430
 <211> 37
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 25 <400> 430
 tctcgccaag atcctgagtg gtgaaccagg cttcagc 37
 <210> 431
 <211> 38
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 35 <400> 431
 tctcgccaag atcctgagtg gaaccaggct tcagcatc 38
 <210> 432
 <211> 37
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 45 <400> 432
 tctcgccaag atcctgagtg accaggcttc agcatcc 37
 <210> 433
 <211> 38
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK19
 55 <400> 433
 60 tcgccaagat cctgagtgac caggcttcag catccttc 38
 <210> 434
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> ADN diseñado basado en el gen de CK19

<400> 434
 agatcctgag tgacatgca agcaggcttc agcatcctc 40

5

<210> 435
 <211> 1275
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<400> 435

```

atggatttca gtcgcagaag cttccacaga agcctgagct cctccttgca ggccccctgta 60
gtcagtacag tgggcatgca ggcctcggg acgacacca gcgtttatgg gggtgctgga 120
ggccggggca tccgcatctc caactccaga cacacgggta actatgggag cgatctcaca 180
ggcggcgggg acctgtttgt tggcaatgag aaaatggcca tgcagaacct aaatgaccgt 240
ctagcgagct acctagaaaa ggtgcgacc ctggagcagt ccaactcaa acttgaagtg 300
caaatcaagc agtggtagca aaccaacgcc ccgagggctg gtcgcgacta cagtgcatat 360
tacagacaaa ttgaagagct gcgaagtcag attaaggatg ctcaactgca aaatgctcgg 420
tgtgtcctgc aaattgataa tgctaaactg gctgctgagg acttcagact gaagtatgag 480
actgagagag gaatacgtct aacagtggaa gctgatctcc aaggcctgaa taaggctctt 540
gatgacctaa ccctacataa aacagatttg gagattcaaa ttgaagaact gaataaagac 600
ctagctctcc tcaaaaagga gcctcaggag gaagtogatg gcctacaca gcatctgggc 660
aacactgtca atgtggaggt tgatgctgct ccaggcctga accttggcgt catcatgaat 720
gaaatgagcc agaagtatga agtcatggcc cagaagaacc ttcaagagcc caaagaacag 780
tttgagagac agactgcagt tctgcagcaa caggtcacag tgaatactga agaattaa 840
ggaactgagg tcaactaac ggagctgaga cgcacctccc agagccttga gatagaactc 900
cagteccatc tcagcatgaa agagtctttg gagcacactc tagaggagac caaggcccgt 960
tacagcagcc agttagccaa cctccagtcg ctgttgagct ctctggagcc ccaactgatg 1020
cagattcgga gtaacatgga acgccagaac aacgaatacc atatccttct tgacataaag 1080

actcgacttg aacaggaaat tgctacttac cgccgccttc tggaaggaga agacgtaaaa 1140
actacagaat atcagttaag caccctggaa gagagagata taaagaaaac caggaagatt 1200
aagacagtcg tgcaagaagt agtggatggc aaggctcgtg catctgaagt caaagaggtg 1260
gaagaaaata tctaa 1275
    
```

15

<210> 436
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

5 <400> 436
 ttcatgctga gatgggactg g 21

10 <210> 437
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

20 <400> 437
 gctgagatgg gactggagtt c 21

25 <210> 438
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

35 <400> 438
 caatttcag gacacaccga g 21

40 <210> 439
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

50 <400> 439
 gaggtcaac taacggagc 19

55 <210> 440
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

65 <400> 440
 gttcaactaa cggagctgag 20

<210> 441
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

<400> 441
 actaacggag ctgagacg 18

<210> 442
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

5 <400> 442
 attgaagagc tgcgaagtc 19

10 <210> 443
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

20 <400> 443
 cgactacagt gcatattaca gac 23

25 <210> 444
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

35 <400> 444
 cagcaacagg tcacagtg 18

40 <210> 445
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

50 <400> 445
 ctagaggaga ccaaggccc 19

55 <210> 446
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

65 <400> 446
 tctagaggag accaaggccc 20

70 <210> 447
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

75 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

80 <400> 447
 agaccaaggc cggttacagc 20

85 <210> 448
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

5 <400> 448
 ctgctgagga cttcagactg a 21

<210> 449
 <211> 18
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

15 <400> 449
 agagagctca acagcgac 18

<210> 450
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

25 <400> 450
 tccagagagc tcaacagc 18

<210> 451
 <211> 17
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

35 <400> 451
 acagcgactg gaggttg 17

<210> 452
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

<400> 452
 agctcaacag cgactgg 17

50 <210> 453
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

<400> 453
 60 cftggagatc agctccac 19

<210> 454
 <211> 22
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

5 <400> 454
 gtagggttag gtcacaaag ac 22

10 <210> 455
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

20 <400> 455
 gcgtccatg ttactcgg 18

25 <210> 456
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

35 <400> 456
 gcagttgagc atcctaac t 21

40 <210> 457
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

50 <400> 457
 ctcaaggctc tgggagg 17

55 <210> 458
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

65 <400> 458
 gactgagaga ggaatacgtc 20

70 <210> 459
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

75 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

80 <400> 459
 gccagttagc caacctcc 18

85 <210> 460
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

 5 <400> 460
 cagttagcca acctcc 16

 <210> 461
 <211> 40
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

 15 <400> 461
 ttcattgctga gatgggactg ggaggtcaa ctaacggagc 40

 <210> 462
 <211> 41
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

 25 <400> 462
 ttcattgctga gatgggactg ggttcaacta acggagctga g 41

 <210> 463
 <211> 39
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

 35 <400> 463
 ttcattgctga gatgggactg gactaacgga gctgagacg 39

 <210> 464
 <211> 40
 <212> ADN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

 45 <400> 464
 gctgagatgg gactggagtt cgaggtcaa ctaacggagc 40

 50 <210> 465
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

 55 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

 60 <400> 465
 gctgagatgg gactggagtt cgttcaacta acggagctga g 41

 <210> 466
 <211> 39
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

5 <400> 466
 gctgagatgg gactggagtt cactaacgga gctgagacg 39

10 <210> 467
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

20 <400> 467
 caatttcag gacacaccga gattgaagag ctgogaagtc 40

25 <210> 468
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

35 <400> 468
 ctagaggaga ccaaggccca gagagctcaa cagcgac 37

40 <210> 469
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

50 <400> 469
 tctagaggag accaaggccc tccagagagc tcaacagc 38

55 <210> 470
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

65 <400> 470
 tctagaggag accaaggccc acagcgactg gaggttg 37

<210> 471
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

<400> 471
 agaccaaggc ccgttacagc agagagctca acagcgac 38

<210> 472
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

5 <400> 472
 agaccaaggc cggttacagc tccagagagc tcaacagc 38

10 <210> 473
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

20 <400> 473
 agaccaaggc cggttacagc agctcaacag cgactgg 37

25 <210> 474
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN diseñado basado en el gen de CK20

<400> 474
 ctgctgagga cttcagactg acttgagat cagctccac 40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos para detectar citoqueratina 19 humana por el método LAMP que comprende al menos cuatro tipos de cebadores, en el que dicho conjunto de cebadores comprende un oligonucleótido de acuerdo con la SEC ID N°: 419, o una cadena complementaria de la SEC ID N°: 419; o un cebador capaz de hibridar con el cebador de acuerdo con la SEC ID N°: 419 o el complemento del mismo en condiciones rigurosas.
- 10 2. Un método para detectar citoqueratina 19 humana por el método LAMP usando el conjunto de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Uso del conjunto de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1 para la detección de un ácido nucleico de citoqueratina 19 en una muestra usando el método LAMP.

FIG. 1

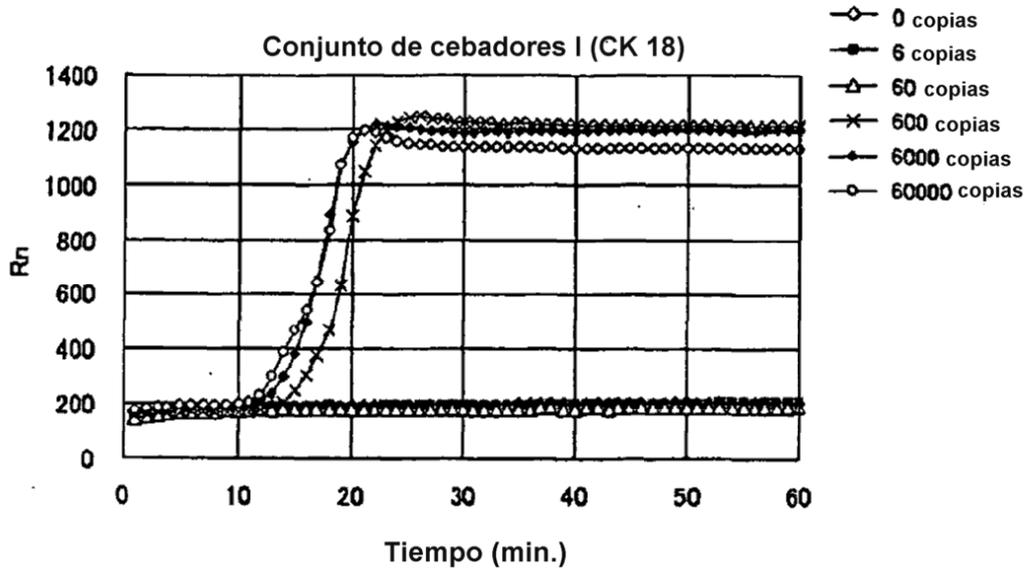


FIG. 2

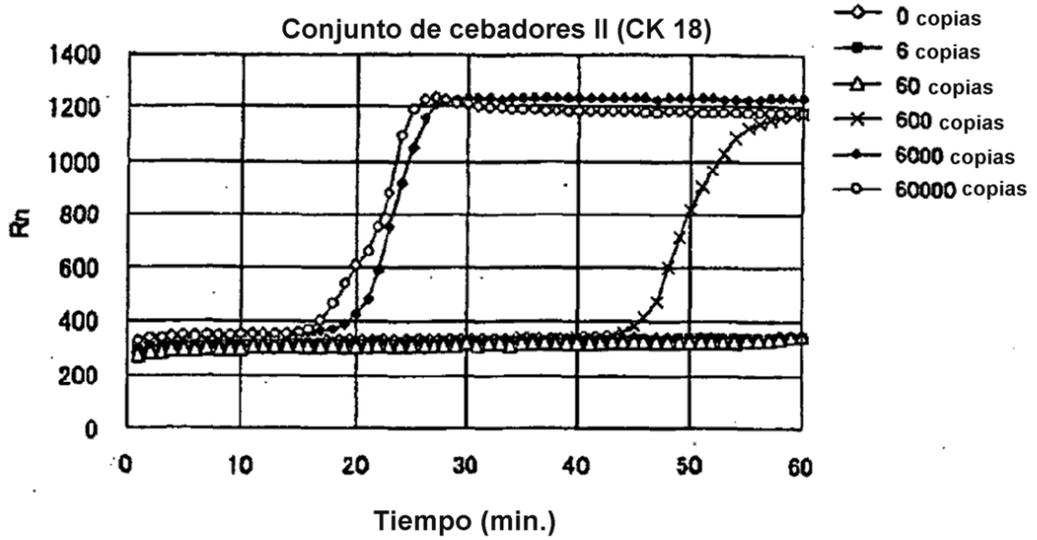


FIG. 3

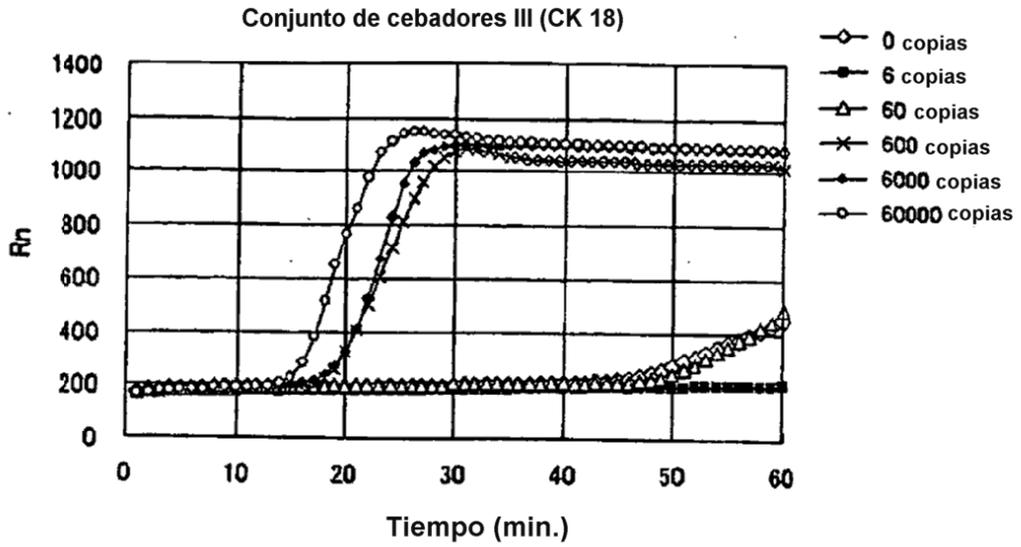


FIG. 4

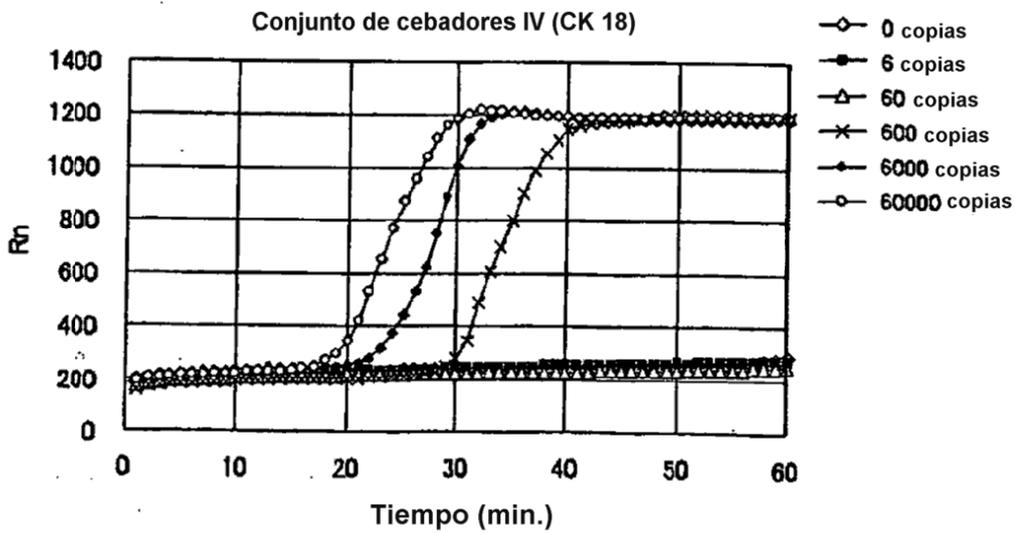


FIG. 5

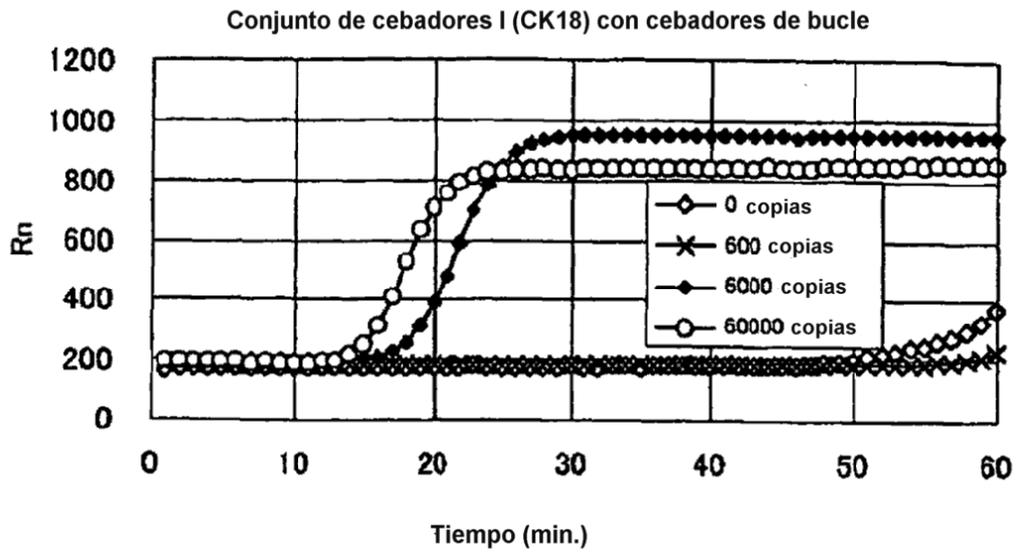


FIG. 6

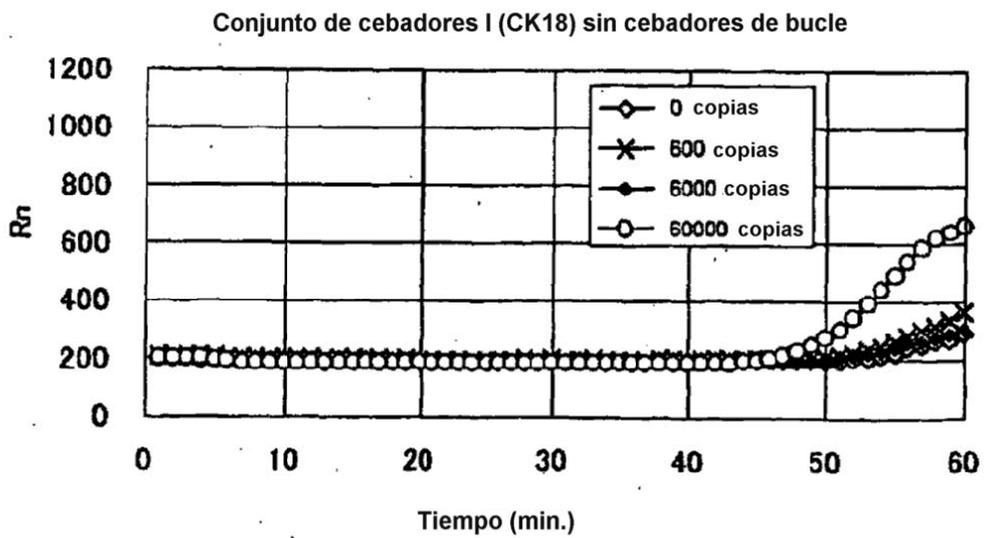


FIG. 7

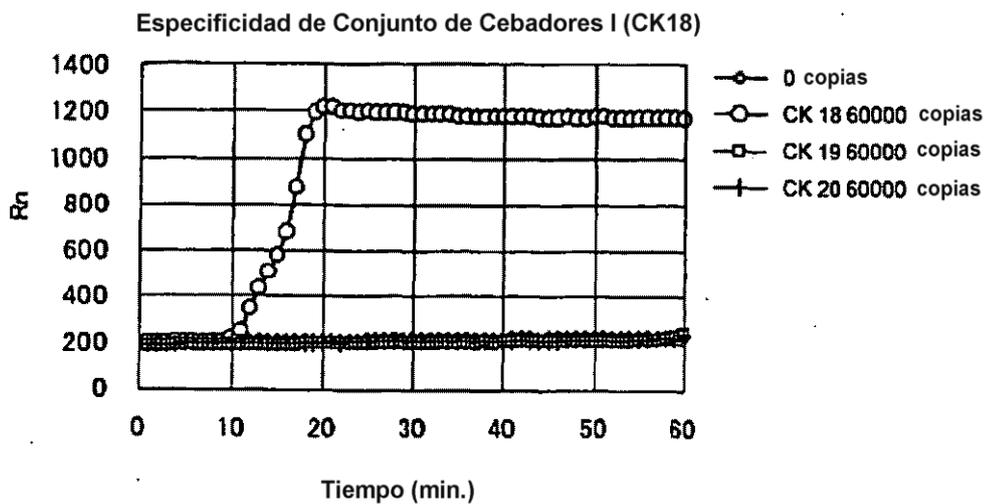


FIG. 8

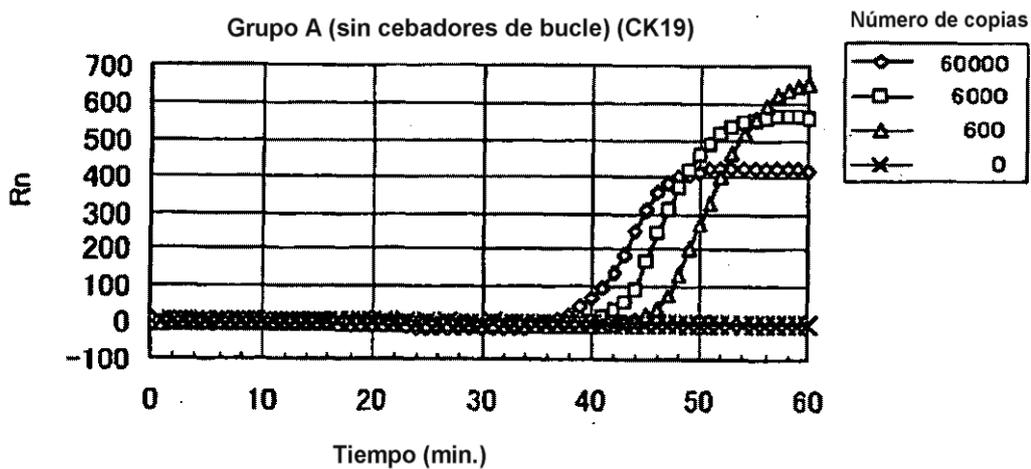


FIG. 9

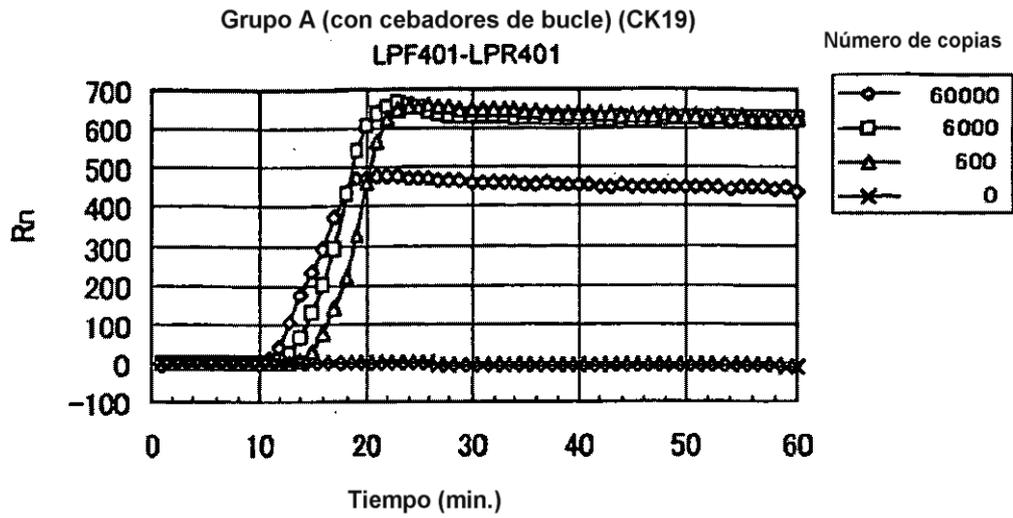


FIG. 10

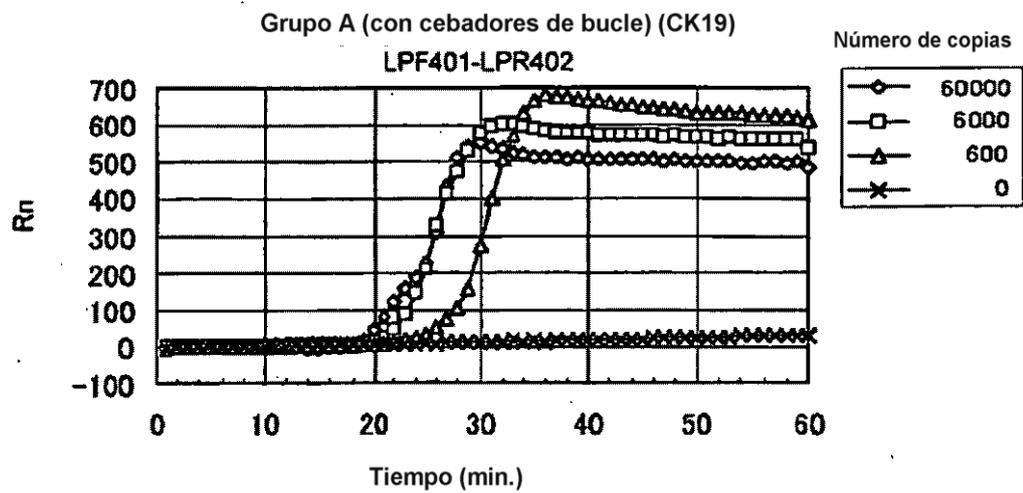


FIG. 11

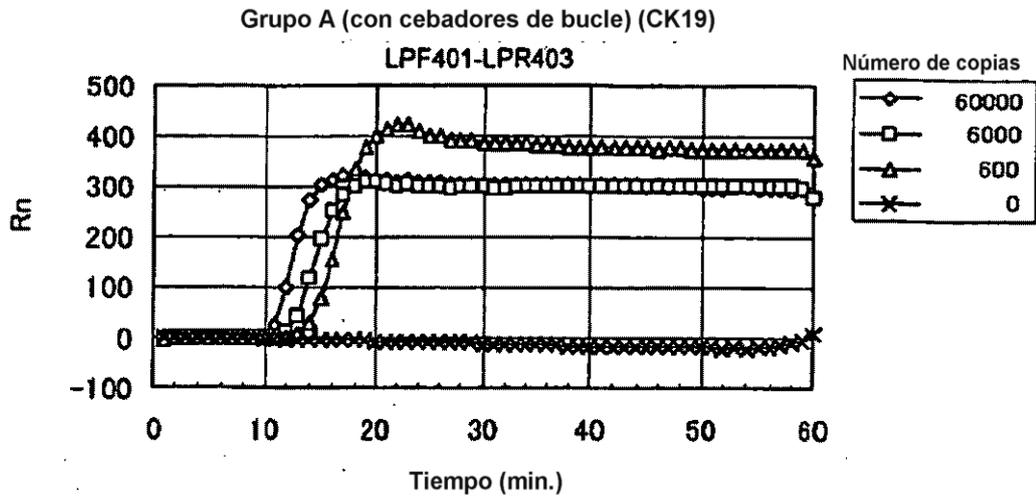


FIG. 12

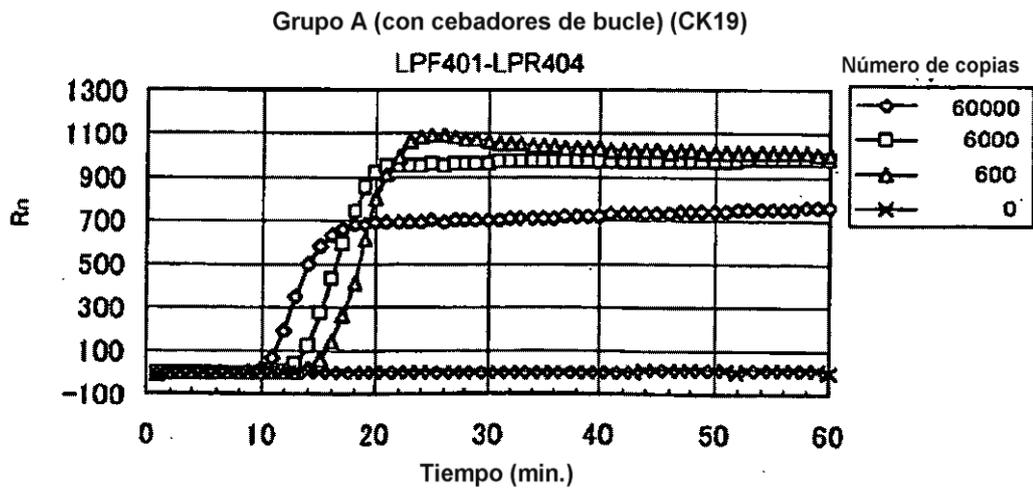


FIG. 13

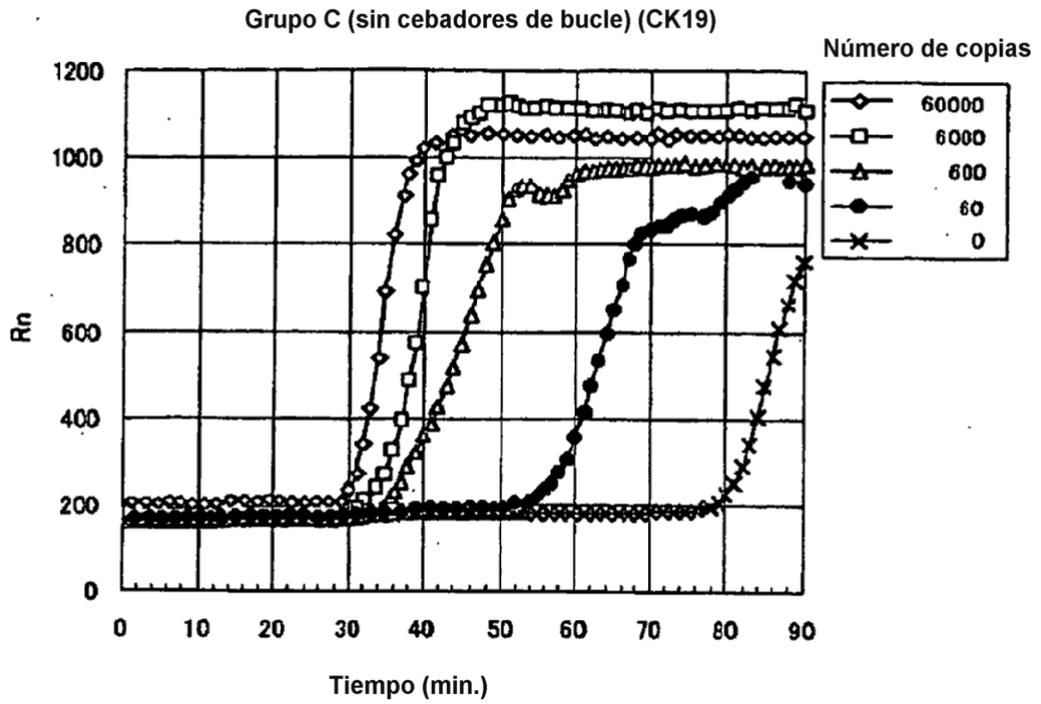


FIG. 14

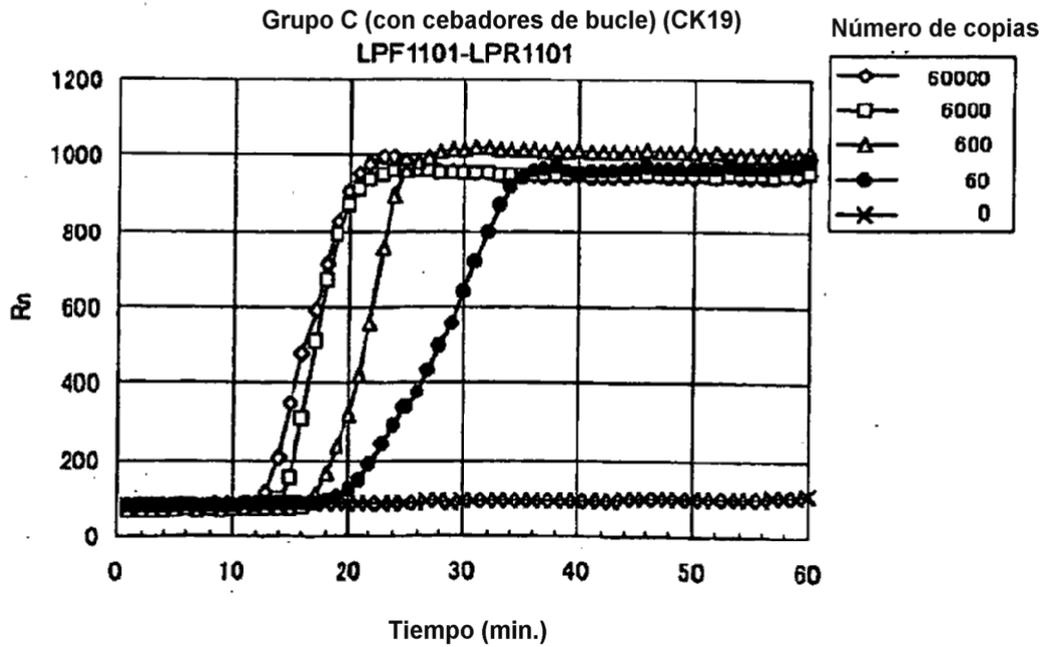


FIG. 15

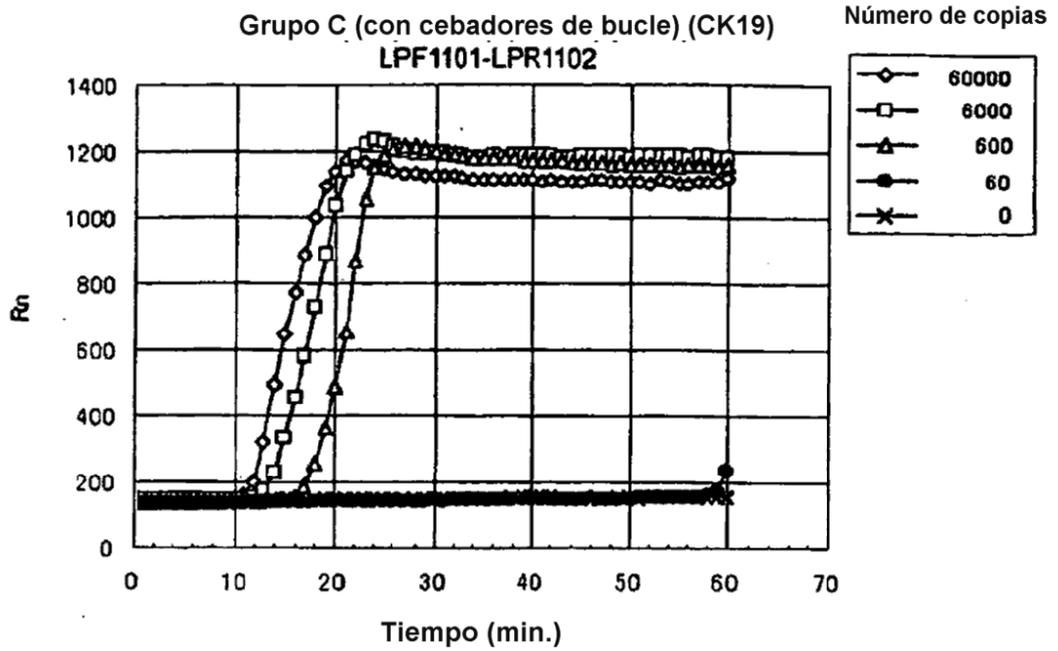


FIG. 16

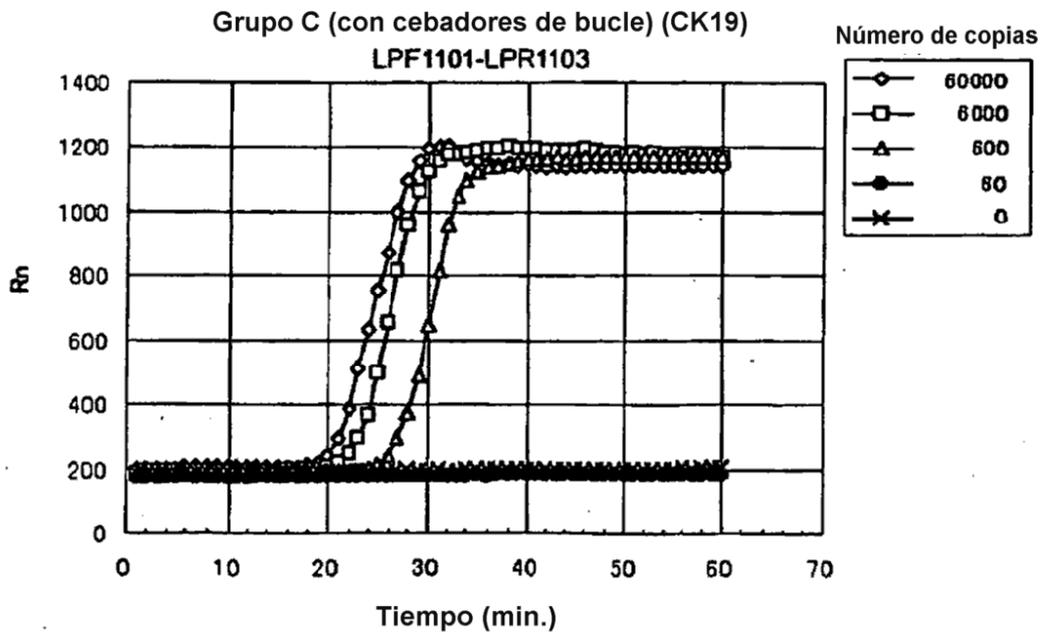


FIG. 17

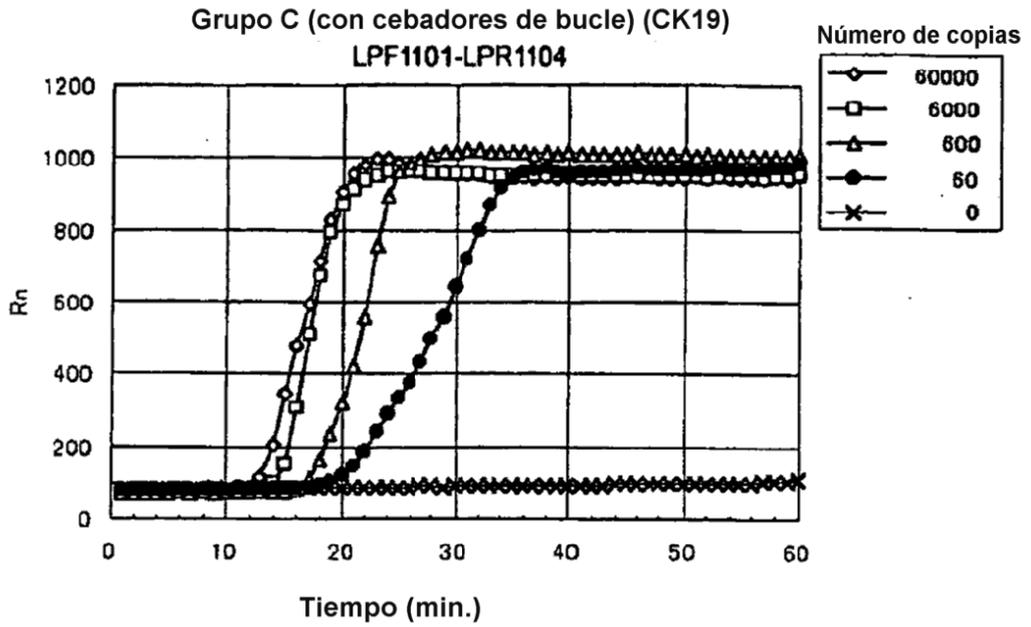


FIG. 18

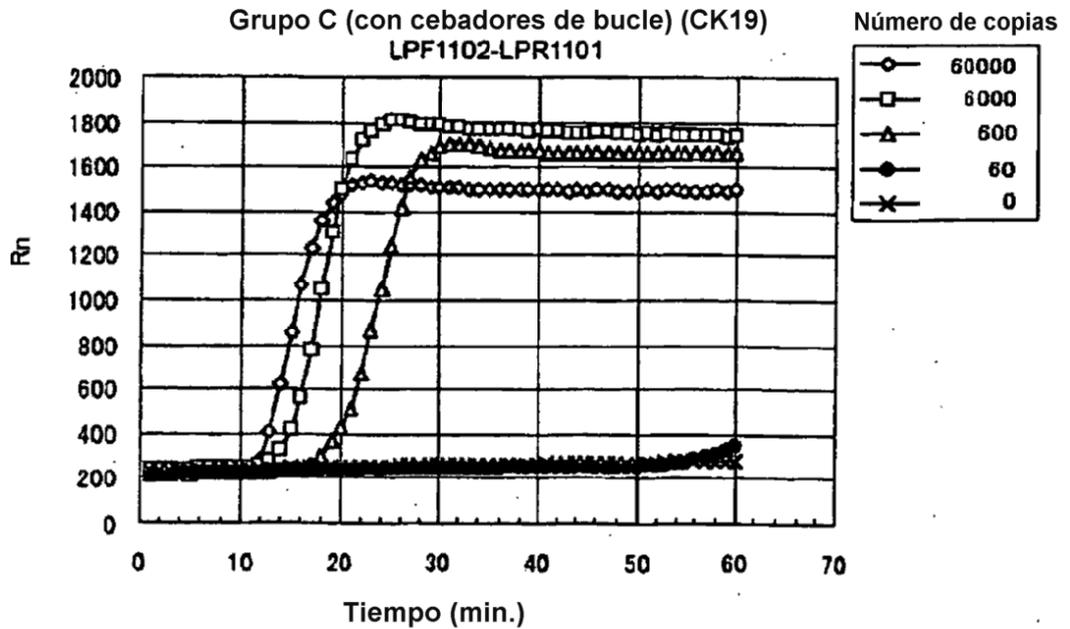


FIG. 19

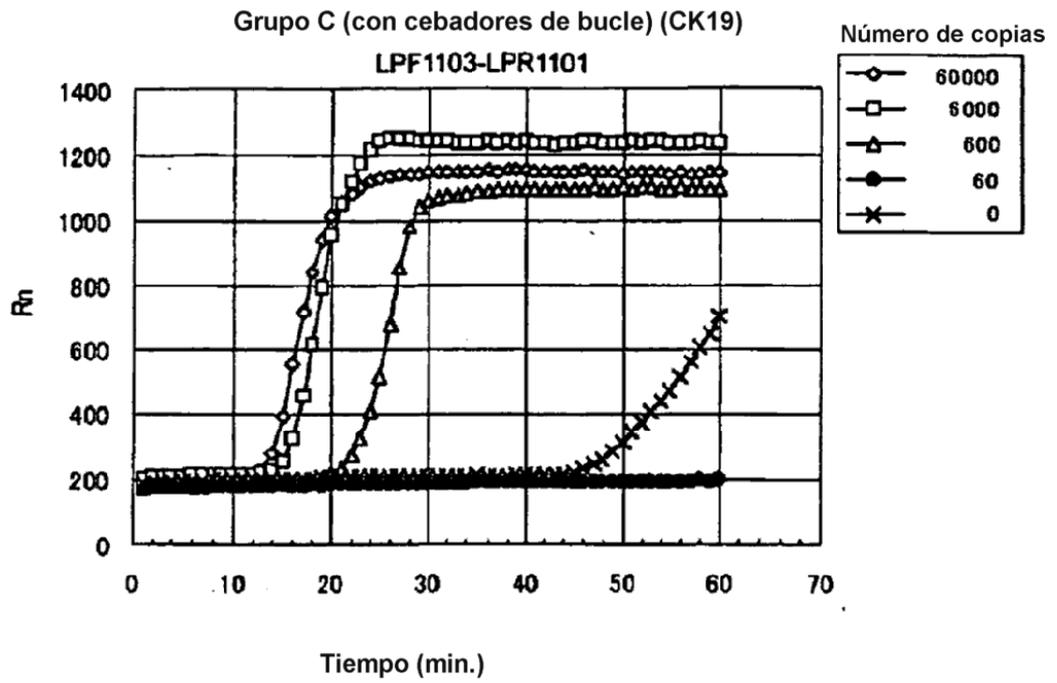


FIG. 20

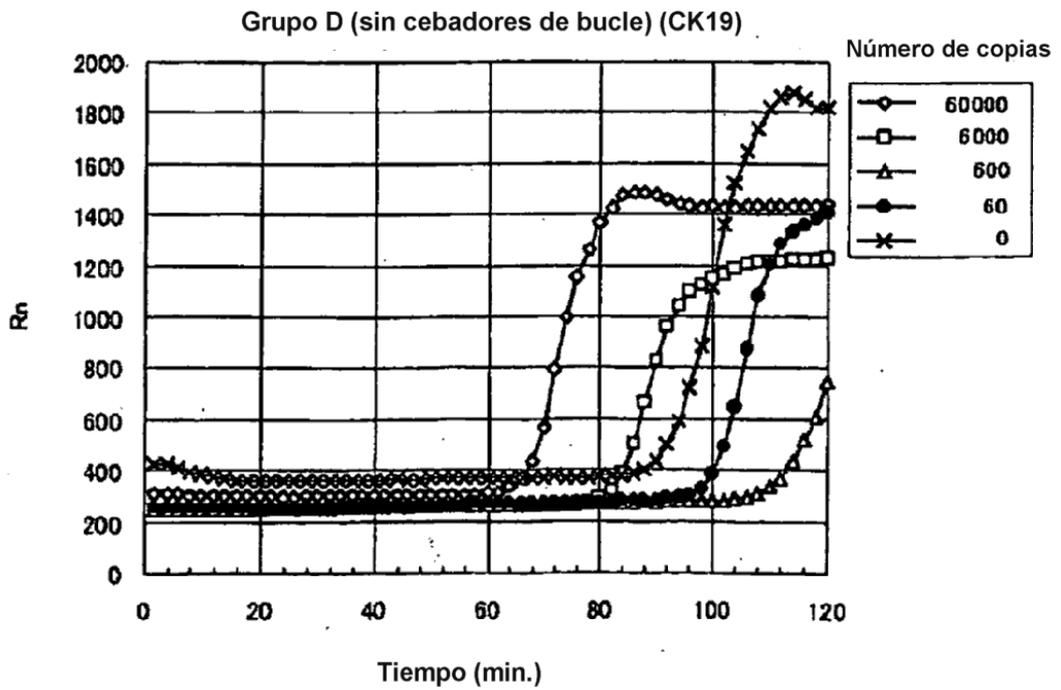


FIG. 21

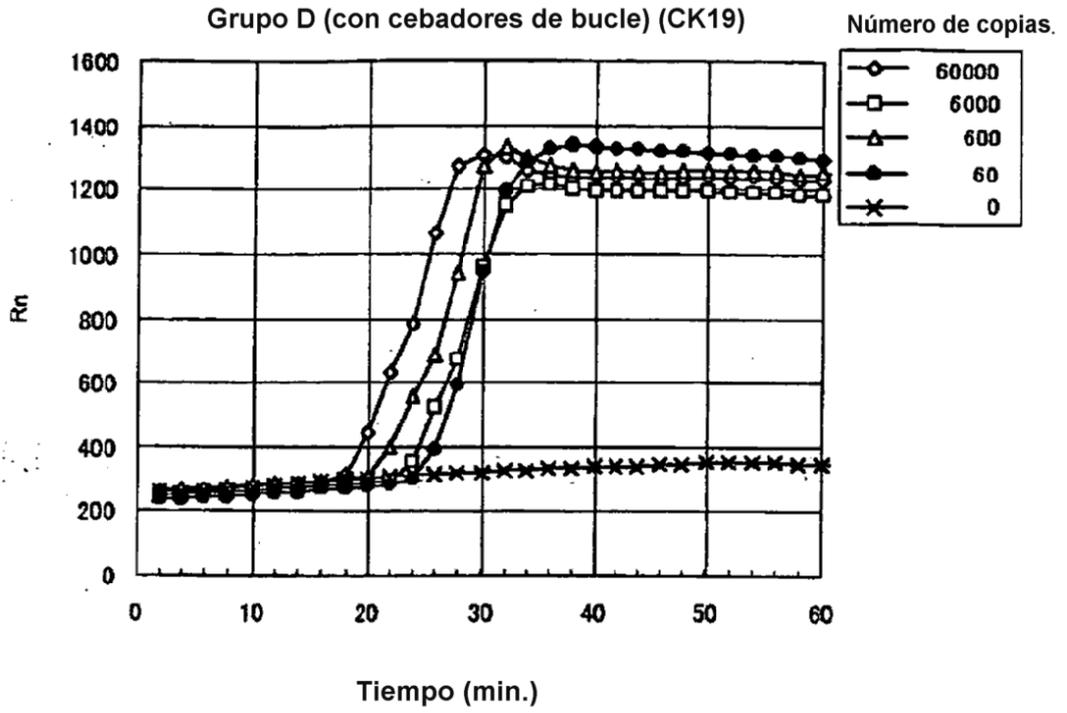


FIG. 22

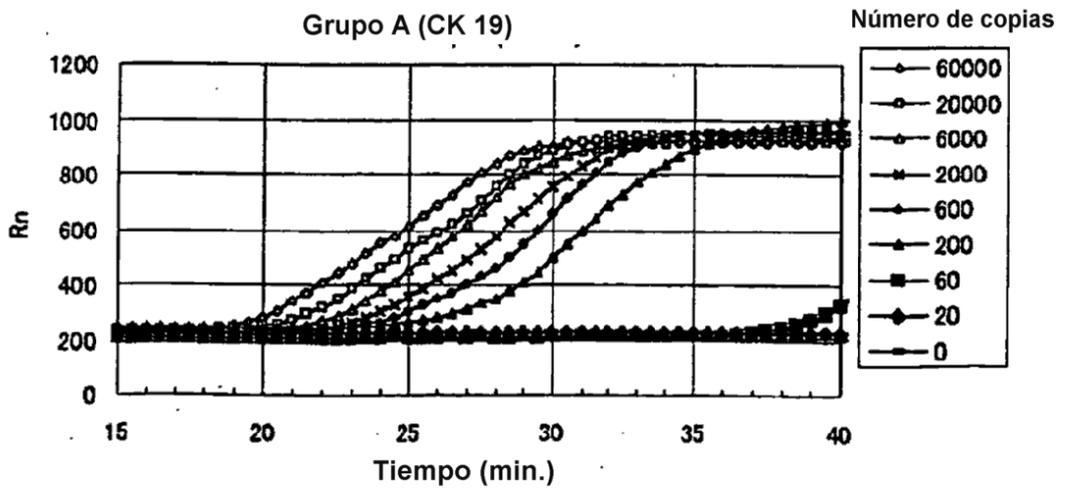


FIG. 23

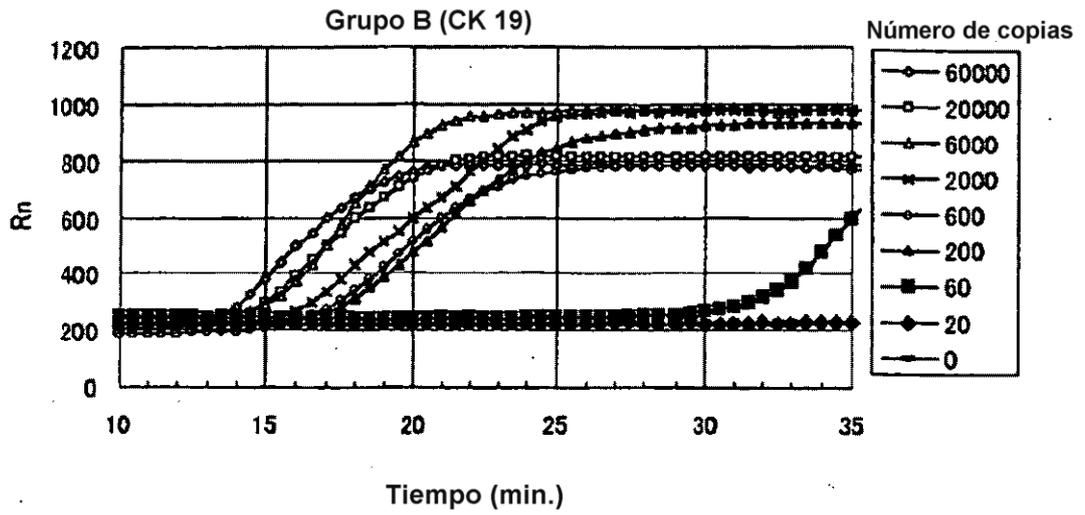


FIG. 24

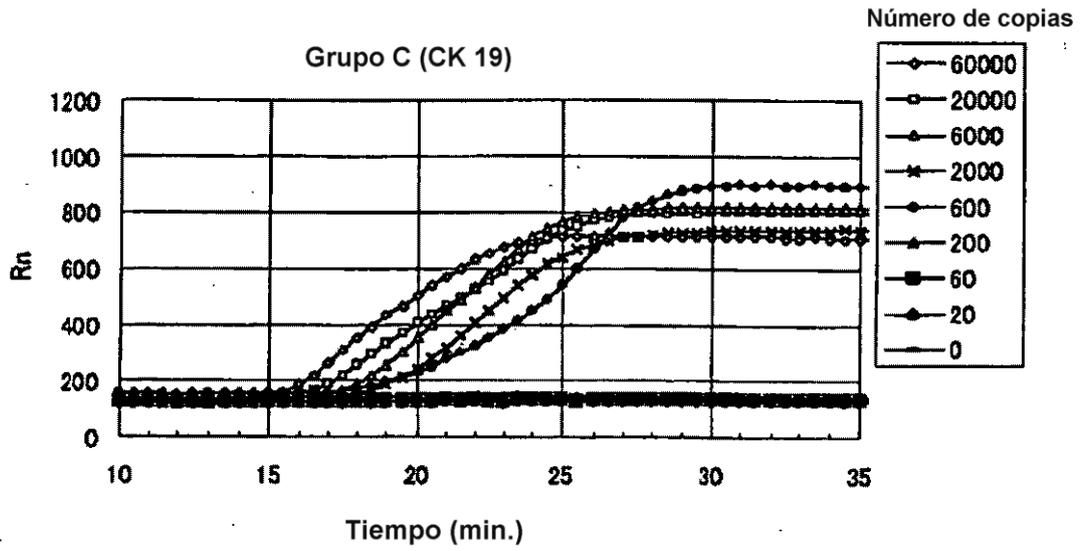


FIG. 25

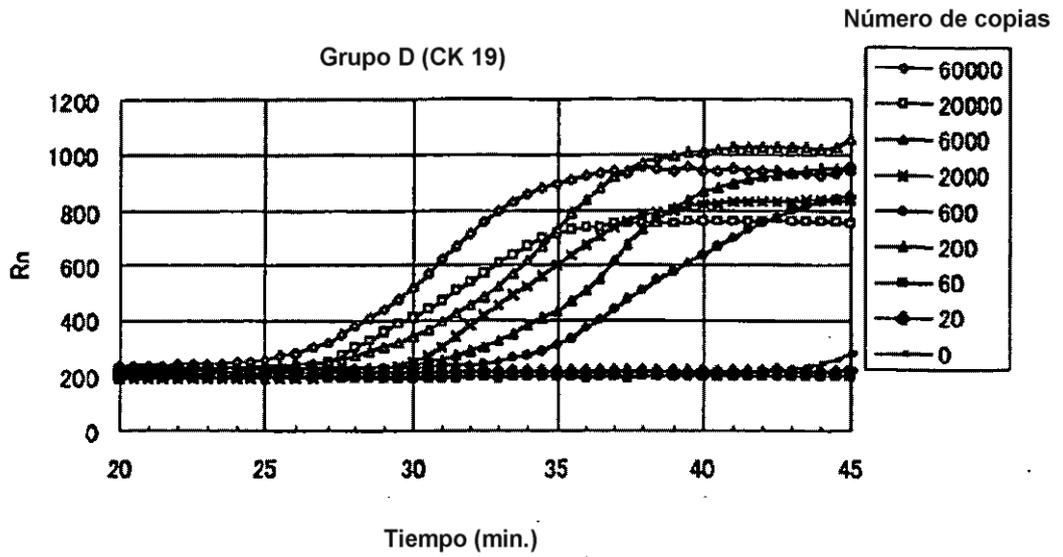


FIG. 26

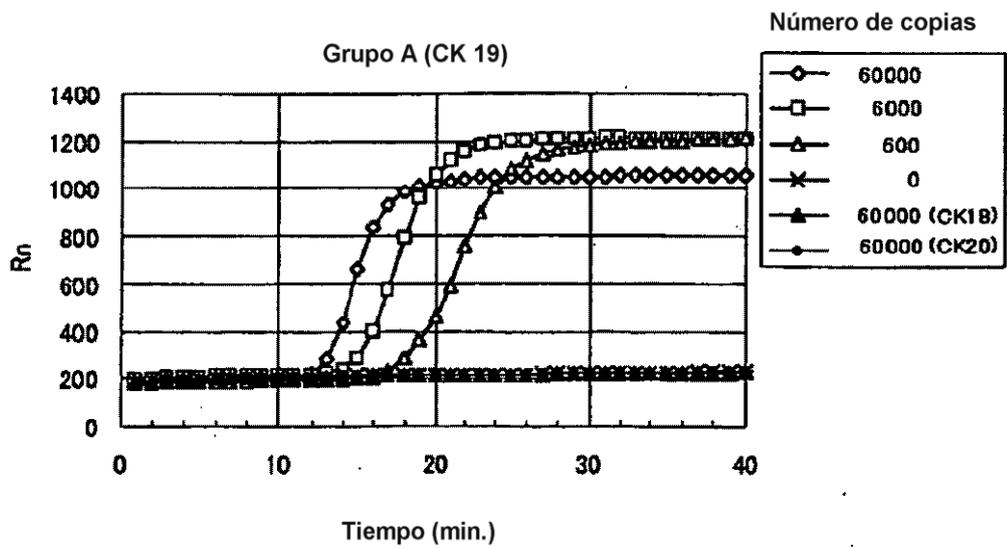


FIG. 27

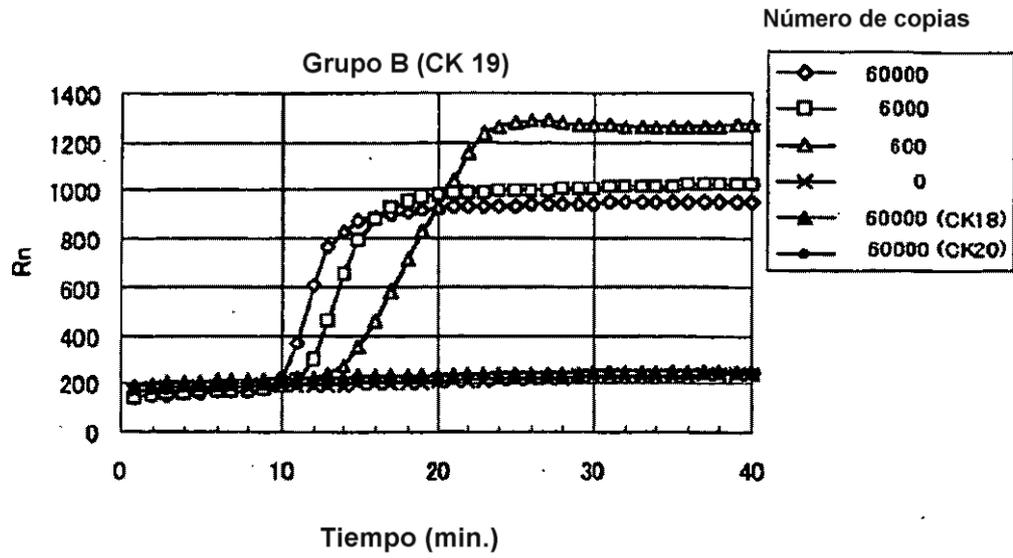


FIG. 28

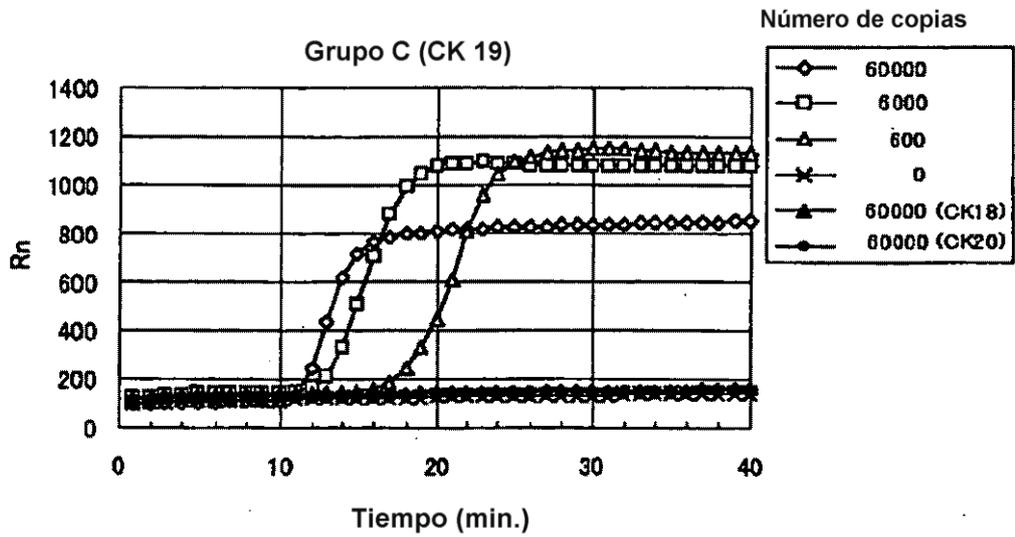


FIG. 29

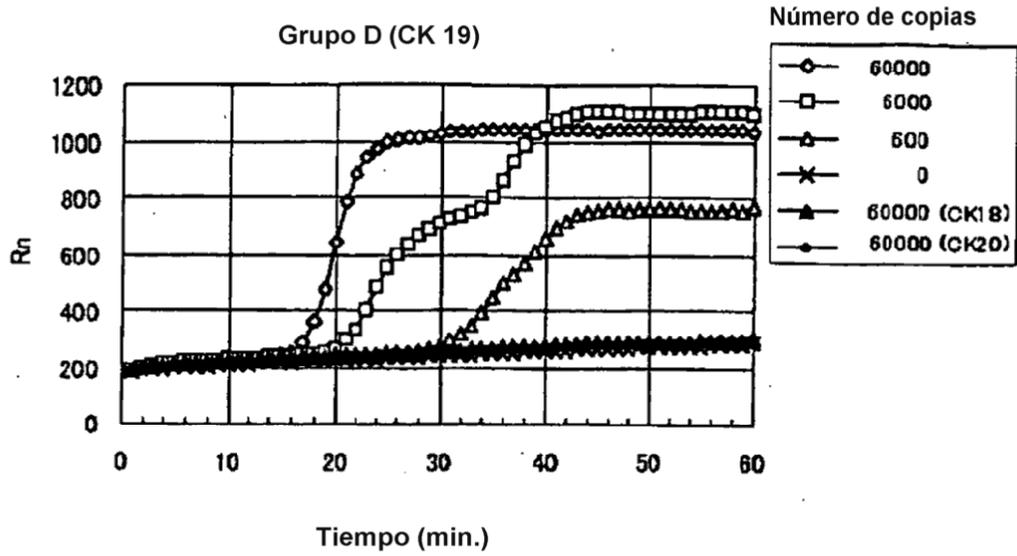


FIG. 30

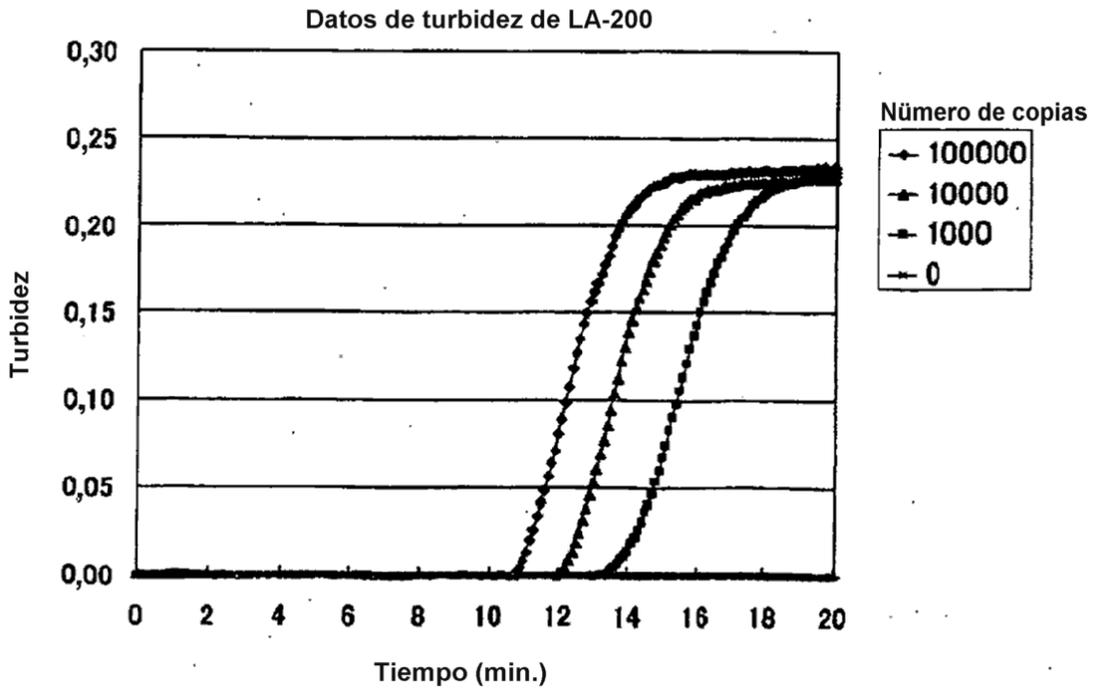


FIG. 31

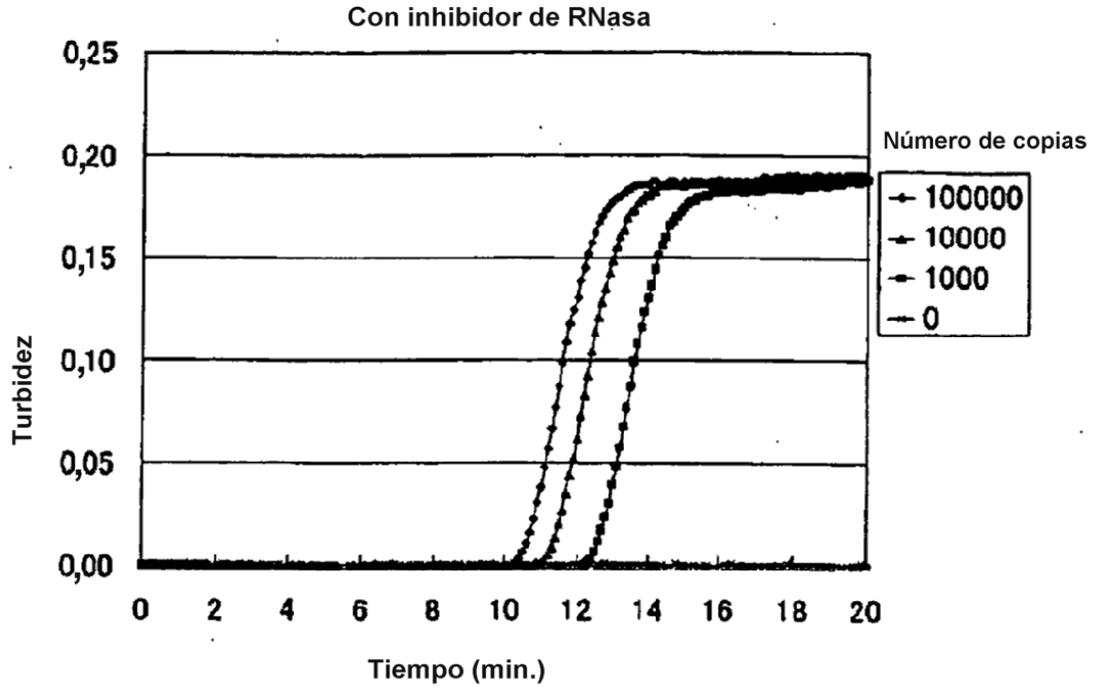


FIG. 32

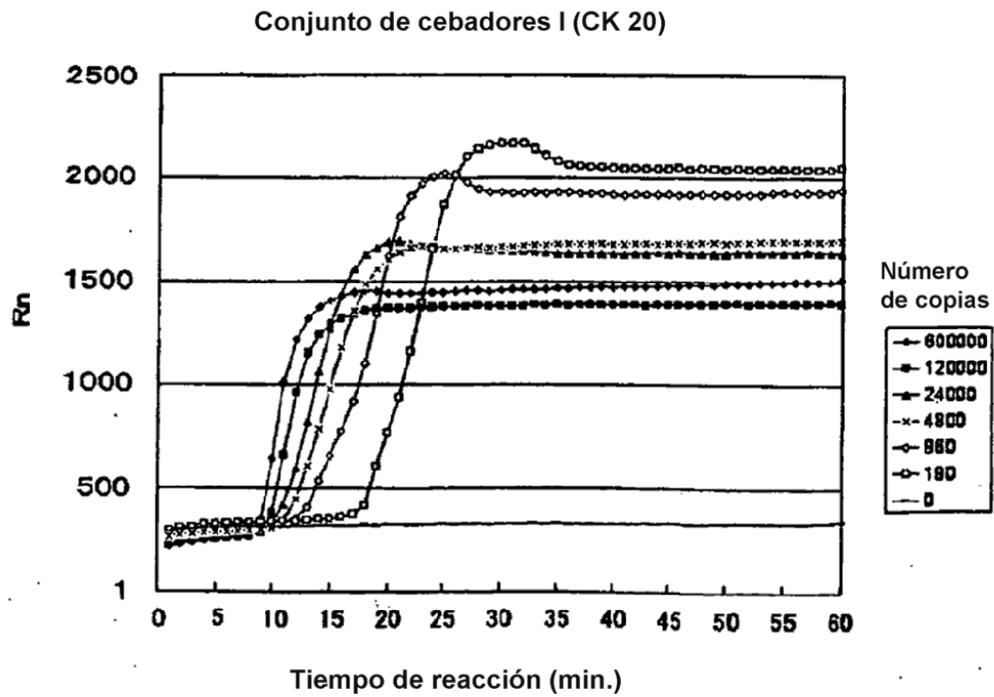


FIG. 33

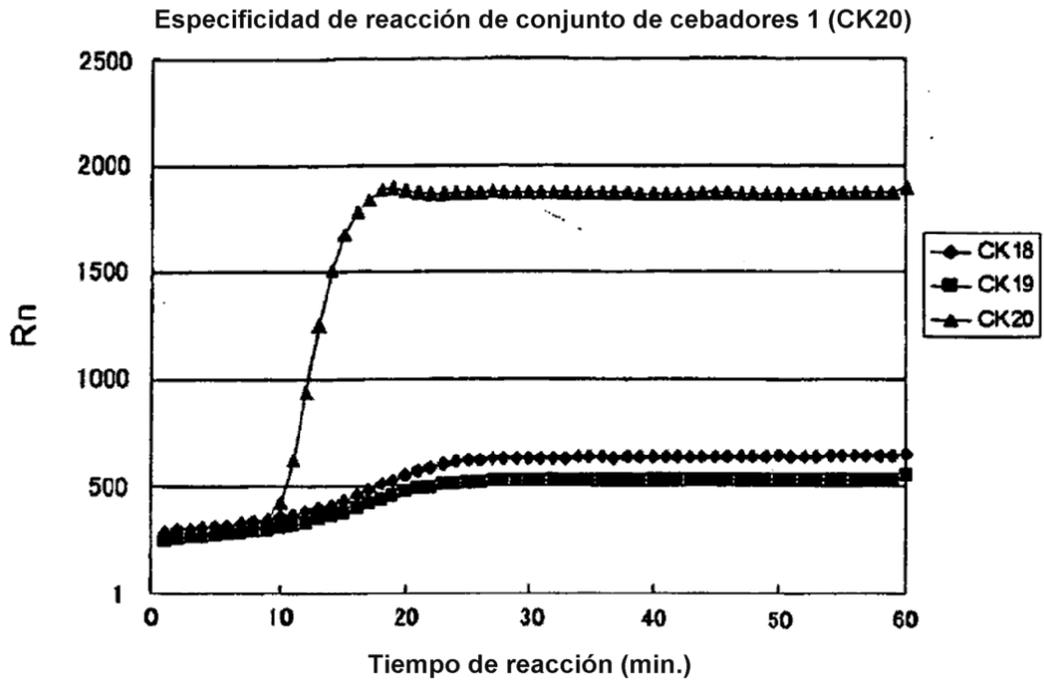


FIG. 34

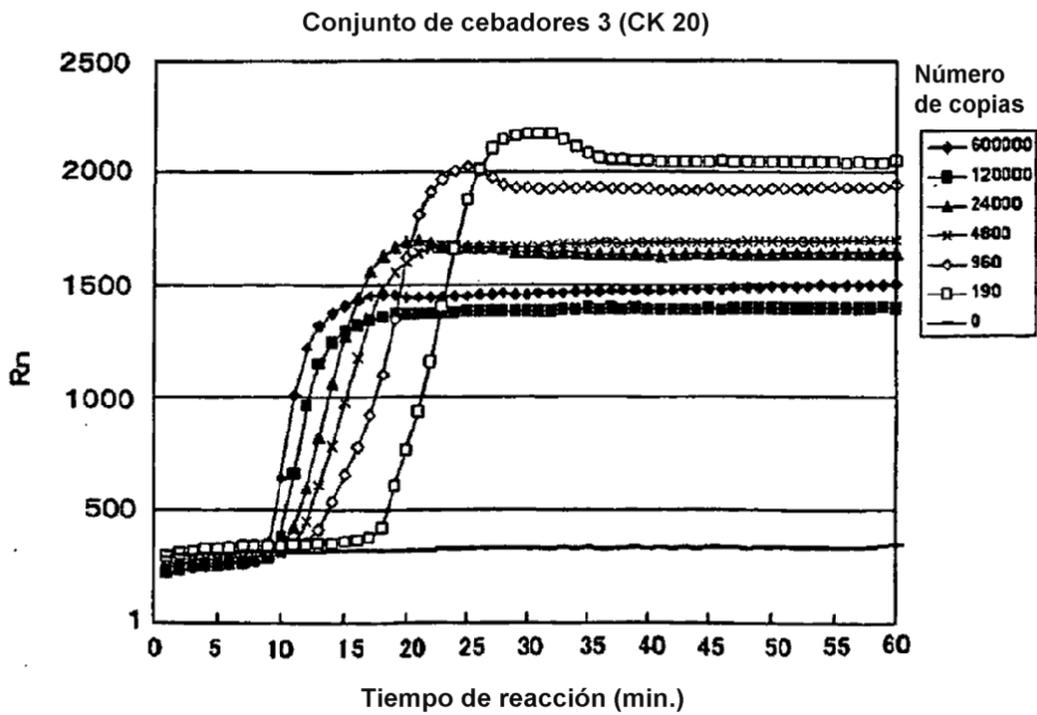


FIG. 35

