

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 614**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2005 E 09014283 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2163650**

54 Título: **Marcadores de expresión génica para predecir la respuesta a la quimioterapia**

30 Prioridad:

09.04.2004 US 561035 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2015

73 Titular/es:

**GENOMIC HEALTH, INC. (50.0%)
301 Penobscot Drive
Redwood City, CA 94063, US y
FONDAZIONE IRCCS ISTITUTO NAZIONALE DEI
TUMORI (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BAKER, JOFFRE B.;
SHAK, STEVEN y
GIANNI, LUCA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 550 614 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

Marcadores de expresión génica para predecir la respuesta a la quimioterapia

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención proporciona conjuntos de genes cuya expresión es importante en el pronóstico del cáncer. En particular, la invención proporciona información de expresión génica útil para predecir si los pacientes con cáncer tienen probabilidad de presentar una respuesta de tratamiento beneficiosa a la quimioterapia.

Descripción de la técnica relacionada

15 Los oncólogos tienen varias opciones de tratamiento disponibles, incluyendo diferentes combinaciones de fármacos quimioterapéuticos que están caracterizadas como el "estándar de atención" y varios fármacos que no llevan en la etiqueta una indicación para un cáncer particular, pero que han demostrado ser eficaces en ese cáncer. La mayor probabilidad de obtener un buen resultado del tratamiento requiere que los pacientes se asignen al tratamiento óptimo disponible para el cáncer en cuestión, y que esta asignación se haga tan rápido como sea posible después del diagnóstico. En particular, es importante determinar la probabilidad de la respuesta del paciente a la quimioterapia del "estándar de atención" porque ciertos fármacos quimioterapéuticos tales como las antraciclinas y los taxanos tienen una eficacia limitada y son tóxicos. De esta forma, la identificación de pacientes con más o menos probabilidad de respuesta podría aumentar el efecto beneficioso neto que ofrecen estos fármacos, y reducir la morbilidad neta y la toxicidad, mediante una selección más inteligente de los pacientes.

25 Actualmente, las pruebas de diagnóstico utilizadas en la práctica clínica son de un solo análisis, y por lo tanto no capturan el valor potencial de las relaciones conocidas entre docenas de marcadores diferentes. Además, las pruebas de diagnóstico con frecuencia no son cuantitativas al estar basadas en inmunohistoquímica. Este método con frecuencia produce diferentes resultados en diferentes laboratorios, en parte porque los reactivos no están estandarizados y en parte porque las interpretaciones son subjetivas y no pueden cuantificarse fácilmente. A menudo no se han usado pruebas basadas en el ARN debido a los problemas de la degradación del ARN a lo largo del tiempo y al hecho de que es difícil obtener muestras recientes de tejido de los pacientes para el análisis. El tejido incluido en bloques de parafina y fijado es más fácil de obtener y se han establecido métodos para detectar el ARN en tejido fijado. Sin embargo, estos métodos típicamente no permiten el estudio de grandes cantidades de genes (ADN o ARN) a partir de pequeñas cantidades de material. De esta manera, tradicionalmente rara vez se ha usado el tejido fijado para otra cosa que no sea la detección inmunohistoquímica de proteínas.

30 En los últimos años, varios grupos han publicado estudios relacionados con la clasificación de diversos tipos de cáncer mediante el análisis de la expresión génica en micromatrices (véase, por ejemplo, Golub *et al.*, *Science* 286: 531-537 (1999); Bhattacharjee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 98: 13790-13795 (2001); Chen-Hsiang *et al.*, *Bioinformatics* 17 (Supl. 1): S316-S322 (2001); Ramaswamy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 98: 15149-15154 (2001)). También se han presentado ciertas clasificaciones de cánceres de mama humanos basadas en patrones de expresión génica (Martin *et al.*, *Cancer Res.* 60: 2232-2238 (2000); West *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 98: 11462-11467 (2001); Sorlie *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 98: 10869-10874 (2001); Yan *et al.*, *Cancer Res.* 61: 8375-8380 (2001)). Sin embargo, estos estudios principalmente se centran en mejorar y refinar la clasificación ya establecida de diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, y generalmente no proporcionan nuevas perspectivas a las relaciones de los genes expresados de forma diferencial, y no asocian los hallazgos a las estrategias de tratamiento para mejorar los resultados clínicos de la terapia para el cáncer.

40 Aunque la biología molecular moderna y la bioquímica han revelado cientos de genes cuyas actividades influyen en el comportamiento de las células tumorales, su estado de diferenciación y su sensibilidad o resistencia a ciertos fármacos terapéuticos, con pocas excepciones, el estado de estos genes no se ha explotado para la toma rutinaria de decisiones clínicas sobre los tratamientos con fármacos. Una excepción importante es el uso de la expresión de la proteína del receptor de estrógenos (ER) en carcinomas de mama para seleccionar pacientes para el tratamiento con fármacos antiestrogénicos, tales como el tamoxifeno. Otro ejemplo excepcional es el uso de la expresión de la proteína ErbB2 (Her2) en carcinomas de mama para seleccionar pacientes con el fármaco antagonista de Her2 Herceptin[®] (Genentech, Inc., South San Francisco, CA).

50 A pesar de los recientes avances, el desafío del tratamiento del cáncer sigue siendo dirigir los regímenes de tratamiento específicos a tipos de tumores patológicamente distintos, y finalmente personalizar el tratamiento del tumor para maximizar el resultado. Por lo tanto, existe la necesidad de pruebas que proporcionen simultáneamente una información predictiva sobre las respuestas de los pacientes a la diversidad de opciones de tratamiento. Esto ocurre particularmente en el caso del cáncer de mama, cuya biología se entiende poco. Es evidente que la clasificación del cáncer de mama en algunos subgrupos, tales como el subgrupo positivo para ErbB2, y subgrupos caracterizados por una expresión génica baja o ausente del receptor de estrógenos (ER) y unos pocos factores de transcripción adicionales (Perou *et al.*, *Nature* 406: 747-752 (2000)), no refleja la heterogeneidad celular y molecular

del cáncer de mama y no permite el diseño de estrategias de tratamiento que maximicen la respuesta de los pacientes.

5 El cáncer de mama es el tipo más común de cáncer entre las mujeres en los Estados Unidos y es la causa principal de muertes por cáncer entre las mujeres de 40 a 59 años de edad. Por lo tanto, existe una necesidad particularmente grande de una prueba de cáncer de mama validada clínicamente que sea predictiva de la respuesta de la paciente a la quimioterapia.

10 Ding *et al.* (2000) Proceedings of the American Association for Cancer Research 41, 404, proponen que la resistencia multifármaco en células cervicales humanas está asociada con una mayor expresión de las proteínas antiapoptóticas BAG-1 y BCL-X_L y una actividad reducida de la caspasa 3.

15 Kitada *et al.* (1998) Blood 91, 3379-89 desvelan la expresión de proteínas que regulan la apoptosis en la leucemia linfocítica crónica y correlaciones con quimiorrespuestas *in vitro* e *in vivo*.

El documento WO 2004/111603 desvela marcadores de expresión génica para predecir la respuesta a la quimioterapia.

20 Muss *et al.* (1994) desvela la expresión de *c-erbB-2* y la respuesta a una terapia adyuvante en mujeres con cáncer de mama incipiente positivo para ganglios (Muss *et al.* (1994) N. Eng. J. Med. 330, 1260-6).

Sjöström *et al.* (2002) desvela un estudio del valor predictivo de *bc1-2*, *bax*, *bc1-xL*, *bag-1*, *fas*, y *fasL* para la respuesta a la quimioterapia en el cáncer de mama avanzado (Sjöström *et al.* (2002) Clin. Cancer Res. 8, 811-6).

25 Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar si un nivel de transcrito de ARN está asociado con una respuesta beneficiosa a un tratamiento de quimioterapia que comprende una antraciclina y un taxano como se especifica en la reivindicación 1.

30 El cáncer de mama puede ser, por ejemplo, un cáncer de mama invasivo o un cáncer de mama en estadio II o estadio III.

35 En una realización particular, la quimioterapia es una quimioterapia adyuvante.

En otra realización, la quimioterapia es una quimioterapia neoadyuvante.

La quimioterapia puede comprender, por ejemplo, la administración de docetaxel y/o paclitaxel y/o doxorubicina.

40 La muestra biológica puede ser, por ejemplo, una muestra de tejido que comprende células cancerosas, donde el tejido puede estar fijado, incluido en parafina, estar fresco o estar congelado.

45 El nivel de expresión de dicho transcrito o transcritos de ARN de pronóstico puede determinarse, por ejemplo, por RT-PCR o cualquier otro método basado en PCR, inmunohistoquímica, técnicas de proteómica o cualquier otro método conocido en la técnica o su combinación.

Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 muestra la relación entre la puntuación de recurrencia (RS) y la probabilidad de respuesta de los pacientes a la quimioterapia, basándose en los resultados de un ensayo clínico con la respuesta patológica completa como criterio de valoración.

55 La Tabla 1 muestra una lista de genes cuya expresión se correlaciona, de forma positiva o negativa, con la respuesta del cáncer de mama a adriamicina y taxano como quimioterapia neoadyuvante. Los resultados proceden de un ensayo clínico con la respuesta patológica completa como criterio de valoración. El análisis estadístico utilizó modelos lineales generalizados univariantes con una función de enlace probit.

La Tabla 2 presenta una lista de genes cuya expresión predice la respuesta del cáncer de mama a la quimioterapia. Los resultados proceden de un ensayo clínico retrospectivo. La tabla incluye los números de registro de los genes, las secuencias de los cebadores directos e inversos (indicados como "f" y "r" respectivamente) y las sondas (indicadas como "p") usadas para la amplificación por PCR.

60 La Tabla 3 muestra las secuencias de amplicones usadas en la amplificación por PCR de los genes indicados.

Descripción detallada

65 A. Definiciones

A menos que se definan de otra manera, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención. Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4^a ed., John Wiley & Sons (Nueva York, NY 1992) proporcionan a un experto en la materia una guía general para muchos de los términos usados en la presente solicitud.

Un experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que podrían usarse en la puesta en práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no está limitada de forma alguna a los métodos y materiales descritos. Para los fines de la presente invención, a continuación se definen los siguientes términos.

El término "micromatriz" se refiere a una disposición ordenada de elementos de matriz hibridables, preferentemente sondas polinucleotídicas, sobre un sustrato.

El término "polinucleótido", se use en singular o en plural, se refiere en general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. De esta manera, por ejemplo, los polinucleótidos como se definen en el presente documento incluyen, sin limitación, ADN mono- y bicatenario, ADN que incluye regiones mono- y bicatenarias, ARN mono- y bicatenario y ARN que incluye regiones mono- y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias o incluyen regiones mono- y bicatenarias. Además, el término "polinucleótido" como se usa en el presente documento se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Las cadenas en dichas regiones pueden proceder de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir una o más de las moléculas, pero lo más típico es que incluyan solo una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región triple helicoidal con frecuencia es un oligonucleótido. El término "polinucleótido" incluye específicamente ADNc. El término incluye ADN (incluyendo ADNc) y ARN que contienen una o más bases modificadas. De esta manera, los ADN o ARN con cadenas principales modificadas por razones de estabilidad o por otras razones son "polinucleótidos" como se entiende dicho término en el presente documento. Además, dentro del término "polinucleótidos" como se define en el presente documento se incluyen ADN o ARN que comprenden bases poco habituales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritriadas. En general, el término "polinucleótido" incluye todas las formas modificadas química, enzimática y/o metabólicamente de polinucleótidos no modificados, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo células sencillas y complejas.

El término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido relativamente corto, incluyendo, sin limitación, desoxirribonucleótidos monocatenarios, ribonucleótidos mono- o bicatenarios, híbridos de ARN:ADN y ADN bicatenarios. Los oligonucleótidos, tales como los oligonucleótidos que son sondas de ADN monocatenarias, con frecuencia se sintetizan por métodos químicos, por ejemplo, usando sintetizadores de oligonucleótidos automáticos que están disponibles en el mercado. Sin embargo, los oligonucleótidos pueden obtenerse por una diversidad de métodos distintos, que incluyen técnicas mediadas por ADN recombinante *in vitro* y por expresión de ADN en células y organismos.

Las expresiones "gen expresado de forma diferencial", "expresión génica diferencial" y sus sinónimos, que se usan indistintamente, se refieren a un gen cuya expresión está activada a un mayor o menor nivel en un sujeto que padece una enfermedad, específicamente cáncer, tal como cáncer de mama, con respecto a su expresión en un sujeto normal o de control. Los términos también incluyen genes cuya expresión está activada a un mayor o menor nivel en diferentes estadios de la misma enfermedad. También se entiende que un gen expresado de forma diferencial puede activarse o inhibirse a nivel del ácido nucleico o a nivel de la proteína, o puede someterse a un corte y empalme alternativo para dar como resultado un producto polipeptídico diferente. Dichas diferencias pueden demostrarse, por ejemplo, por un cambio en los niveles de ARNm, expresión en la superficie, secreción u otra división de un polipéptido. La expresión génica diferencial puede incluir una comparación de expresión entre dos o más genes o sus productos génicos, o una comparación de las relaciones de la expresión entre dos o más genes o sus productos génicos, o incluso una comparación de dos productos procesados de forma diferente del mismo gen, que difieren entre sujetos normales y sujetos que padecen una enfermedad, específicamente cáncer, o entre diversos estadios de la misma enfermedad. La expresión diferencial incluye tanto diferencias cuantitativas como diferencias cualitativas en el patrón de expresión temporal o celular en un gen o sus productos de expresión entre, por ejemplo, células normales y enfermas, o entre células que han experimentado diferentes acontecimientos de enfermedad o estadios de enfermedad. Para los fines de esta invención, se considera que está presente una "expresión génica diferencial" cuando hay al menos una diferencia de aproximadamente dos veces, preferentemente de al menos aproximadamente cuatro veces, más preferentemente de al menos aproximadamente seis veces, y aún más preferentemente de al menos aproximadamente diez veces entre la expresión de un gen dado en sujetos normales y enfermos, o en diversos estadios de desarrollo de la enfermedad en un sujeto enfermo.

El término "normalizado", con respecto a un transcrito de un gen o un producto de expresión génica, se refiere al nivel del transcrito o producto de expresión génica con respecto a los niveles medios de transcritos/productos de una serie de genes de referencia, donde los genes de referencia se seleccionan basándose en su variación mínima entre

los pacientes, tejidos o tratamientos (“genes constitutivos”), o los genes de referencia son la totalidad de genes ensayados. En este último caso, que se denomina comúnmente “normalización global”, es importante que el número total de genes ensayados sea relativamente grande, preferentemente mayor de 50. Específicamente, el término “normalizado” con respecto a un transcrito de ARN se refiere al nivel de transcrito con respecto a la media de niveles de transcrito de una serie de genes de referencia. Más específicamente, el nivel medio de un transcrito de ARN medido por RT-PCR TaqMan® se refiere al valor de Ct menos los valores medios de Ct de una serie de transcritos de genes de referencia.

Las expresiones “umbral de expresión” y “umbral de expresión definida” se usan indistintamente y se refieren al nivel de un gen o producto génico en cuestión por encima del cual el gen o producto génico sirve como un marcador predictivo de la respuesta del paciente o la resistencia a un fármaco. El umbral típicamente se define de forma experimental a partir de estudios clínicos. El umbral de expresión puede seleccionarse para una sensibilidad máxima (por ejemplo, para detectar todos los respondedores a un fármaco) o para una selectividad máxima (por ejemplo, para detectar solo respondedores a un fármaco) o para un error mínimo.

La frase “amplificación génica” se refiere a un proceso mediante el cual se forman múltiples copias de un gen o fragmento génico en una célula o línea celular particular. La región duplicada (un tramo de ADN amplificado) con frecuencia se denomina “amplición”. A menudo, la cantidad del ARN mensajero (ARNm) producido, es decir, el nivel de expresión génica, también aumenta en proporción al número de copias realizadas del gen particular.

El término “pronóstico” se usa en el presente documento para hacer referencia a la predicción de la probabilidad de muerte o progresión atribuible a un cáncer, incluyendo la recurrencia, la extensión metastásica y la resistencia a fármacos de una enfermedad neoplásica, tal como un cáncer de mama. El término “predicción” se usa en el presente documento para hacer referencia a la probabilidad de que un paciente responda de forma favorable o desfavorable a un fármaco o serie de fármacos, y también el grado de esas respuestas, o de que un paciente sobreviva después de la eliminación quirúrgica del tumor primario y/o quimioterapia durante un cierto periodo de tiempo sin recurrencia del cáncer. Los métodos predictivos de la presente invención pueden usarse clínicamente para tomar decisiones de tratamiento mediante la elección de las modalidades de tratamiento más apropiadas para cualquier paciente particular. Los métodos predictivos de la presente invención son herramientas valiosas para predecir si es probable que un paciente responda favorablemente a un régimen de tratamiento, tal como una intervención quirúrgica, quimioterapia con un fármaco dado o combinación de fármacos y/o radioterapia, o si es probable la supervivencia a largo plazo del paciente después de la cirugía y/o terminación de la quimioterapia y otras modalidades de tratamiento.

La expresión supervivencia “a largo plazo” se usa en el presente documento para hacer referencia a la supervivencia durante al menos 3 años, más preferentemente durante al menos 8 años y aún más preferentemente durante al menos 10 años después de la cirugía u otro tratamiento.

El término “tumor”, como se usa en el presente documento, se refiere al crecimiento y la proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma y cáncer cerebral.

La “patología” del cáncer incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, un crecimiento celular anómalo o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de células vecinas, liberación de citocinas u otros productos secretores a niveles anómalos, supresión o agravamiento de una respuesta inflamatoria o inmunológica, neoplasia, premalignidad, malignidad, invasión de tejidos u órganos circundantes o distantes, tales como ganglios linfáticos, etc.

La “respuesta de los pacientes” puede evaluarse usando cualquier criterio de valoración que indique un efecto beneficioso para el paciente, incluyendo, sin limitación (1) inhibición, en alguna medida, del crecimiento tumoral, incluyendo la ralentización y la detención completa del crecimiento; (2) reducción del número de células tumorales; (3) reducción del tamaño del tumor; (4) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la infiltración de células tumorales en órganos y/o tejidos periféricos adyacentes; (5) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de metástasis; (6) potenciación de una respuesta inmunitaria antitumoral, que puede dar como resultado, pero no necesariamente, la regresión o rechazo del tumor; (7) alivio, en alguna medida, de uno o más síntomas asociados con el tumor; (8) aumento de la duración de la supervivencia después del tratamiento; y/o (9) reducción de la mortalidad en un punto dado de tiempo después del tratamiento.

“Terapia neoadyuvante” es una terapia adyuvante o complementaria proporcionada antes de la terapia primaria (principal). La terapia neoadyuvante incluye, por ejemplo, quimioterapia, radioterapia y terapia hormonal. De esta

manera, la quimioterapia puede administrarse antes de una cirugía para reducir el tamaño del tumor, de forma que la cirugía pueda ser más eficaz o, como en el caso de tumores no operables previamente, posible.

La "rigurosidad" de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto habitual en la materia y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración de sal. En general, las sondas de mayor tamaño requieren mayores temperaturas para una hibridación apropiada, mientras que las sondas más cortas necesitan menores temperaturas. La hibridación generalmente depende de la capacidad del ADN desnaturalizado de volverse a hibridar cuando están presentes cadenas complementarias en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor es la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se deduce que las mayores temperaturas relativas tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que las temperaturas inferiores harían lo contrario. Si se desean más detalles y una explicación adicional de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience Publishers, (1995).

Las "condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", como se definen en el presente documento, típicamente: (1) emplean una baja fuerza iónica y una alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1 % a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente de desnaturalización, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42 °C; o (3) emplean formamida al 50 %, SSC 5 x (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1 %, solución de Denhardt 5 x, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1 % SDS, y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en SSC 0,2 x (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50 % a 55 °C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en EDTA que contiene SSC 0,1 x a 55 °C.

Las "condiciones moderadamente rigurosas" pueden identificarse como se describe por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y porcentaje de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es incubación durante una noche a 37 °C en una solución que comprende: formamida al 20 %, SSC 5 x (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5 x, sulfato de dextrano al 10 % y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado, seguido del lavado de los filtros en SSC 1 x a aproximadamente 37-50 °C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., cuando sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

En el contexto de la presente invención, la referencia a "al menos uno", "al menos dos", "al menos cinco", etc. de los genes indicados en cualquier conjunto de genes particular significa una cualquiera o todas y cada una de las combinaciones de los genes indicados.

B. Descripción detallada

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular y bioquímica, que están dentro de la experiencia en este campo. Dichas técnicas se explican con detalle en la biografía, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición (Sambrook *et al.*, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology", 4ª edición (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987); y "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis *et al.*, eds., 1994).

1. Perfilado de expresión génica

Los métodos de perfilado de expresión génica incluyen métodos basados en análisis de hibridación de polinucleótidos, métodos basados en secuenciación de polinucleótidos y métodos basados en proteómica. Los métodos usados más comúnmente conocidos en la técnica para la cuantificación de la expresión del ARNm en una muestra incluyen transferencia de northern e hibridación *in situ* (Parker & Barnes, Methods in Molecular Biology 106:247-283 (1999)); ensayos de protección de RNasa (Hod, Biotechniques 13: 852-854 (1992)); y métodos basados en PCR, tales como reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) (Weis *et al.*, Trends in Genetics 8: 263-264 (1992)). Como alternativa, pueden emplearse anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los métodos representativos para el análisis de la expresión génica basada en la secuenciación incluyen Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) y análisis de la expresión génica por secuenciación masiva paralela (MPSS, massively parallel signature sequencing).

2. Métodos de perfilado de expresión génica basados en PCR

a. PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR)

5 Uno de los métodos de perfilado de expresión génica basados en PCR cuantitativa más sensible y más flexible es la RT-PCR, que puede usarse para comparar los niveles de ARNm en diferentes poblaciones de muestra, en tejidos normales y tumorales, con o sin tratamiento con fármacos, para caracterizar patrones de expresión génica, para discriminar entre ARNm muy relacionados y para analizar la estructura del ARN.

10 La primera etapa es el aislamiento del ARNm a partir de una muestra diana. El material de partida típicamente es ARN total aislado de tumores o líneas de células tumorales humanas, y tejidos o células y lineales normales correspondientes, respectivamente. De esta manera, el ARN puede aislarse de una diversidad de tumores primarios, incluyendo tumores o líneas celulares de mama, pulmón, colon, próstata, cerebro, hígado, riñón, páncreas, bazo, timo, testículos, ovario, útero, etc., con ADN reunido de donantes sanos. Si la fuente de ARNm es un tumor primario, el ARNm puede extraerse, por ejemplo, partir de muestras de tejido incluidas en parafina y fijadas (por ejemplo, 15 fijadas en formalina) congeladas o archivadas.

En la técnica son bien conocidos métodos generales para la extracción del ARNm y se desvelan en libros de texto convencionales de biología molecular, incluyendo Ausubel *et al.*, Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons (1997). Se desvelan métodos para la extracción de ARN a partir de tejidos incluidos en parafina, por ejemplo, en Rupp y Locker, Lab Invest. 56: A67 (1987), y De Andress *et al.*, BioTechniques 18:4 2044 (1995). En particular, el aislamiento del ARN puede realizarse usando un kit de purificación, un conjunto tampón y proteasa procedente de fabricantes comerciales, tales como Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, el ARN total de células en cultivo puede aislarse usando mini-columnas RNeasy de Qiagen. Otros kits de aislamiento de ARN disponibles en el mercado incluyen el kit purificación de ADN y ARN completo MasterPure™ (EPICENTRE®, Madison, WI), y el Kit de Aislamiento de ARN en Bloque de Parafina (Ambion, Inc.). El ARN total 25 procedente de muestras de tejido puede aislarse usando RNA Stat-60 (Tel-Test). El ARN preparado a partir del tumor puede aislarse, por ejemplo, por centrifugación en gradiente de densidad con cloruro de cesio.

30 Como el ARN no puede servir como plantilla para la PCR, la primera etapa en el perfilado de la expresión génica por RT-PCR es la transcripción inversa de la plantilla de ARN en ADNc, seguido de su amplificación exponencial en una reacción de PCR. Las dos transcriptasas inversas usadas más comúnmente son la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT) y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). La etapa de transcripción inversa típicamente se inicia usando cebadores específicos, hexámeros aleatorios o cebadores de oligo-dT, dependiendo de las circunstancias y del objetivo del perfilado de la expresión. Por ejemplo, 35 el ARN extraído puede someterse a transcripción inversa usando un kit de PCR de ARN GeneAmp (Perkin Elmer, CA, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido después puede usarse como plantilla en la siguiente reacción de PCR.

Aunque la etapa de PCR puede usar una diversidad de ADN polimerasas dependientes de ADN termoestables, típicamente emplea la ADN polimerasa de Taq, que tiene actividad nucleasa 5'-3' pero carece de actividad endonucleasa correctora 3'-5'. De esta manera, la PCR de TaqMan® típicamente utiliza la actividad nucleasa 5' de la polimerasa de Taq o Tth para hidrolizar una sonda de hibridación unida a su amplicón diana, pero puede usarse cualquier enzima con una actividad nucleasa 5' equivalente. Se usan dos cebadores oligonucleotídicos para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Se diseña un tercer oligonucleótido, o sonda, para detectar la secuencia de nucleótidos localizada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no se puede extender por la enzima ADN polimerasa de Taq, y está marcada con un colorante fluorescente indicador y un colorante fluorescente inactivador. Cualquier emisión inducida por láser procedente del colorante indicador se inactiva por el colorante inactivador cuando los dos colorantes están situados cerca cuando están sobre la sonda. Durante la reacción de amplificación, la enzima ADN polimerasa de Taq escinde la sonda de una manera dependiente de la plantilla. Los fragmentos de sonda resultantes se disocian en solución, y la señal del colorante indicador liberado carece del efecto de inactivación del segundo fluoróforo. Por cada nueva molécula sintetizada se libera una molécula de colorante indicador, y la detección del colorante indicador no inactivado proporciona la base de una interpretación cuantitativa de los datos. 50

55 La RT-PCR de TaqMan® puede realizarse usando un equipo disponible en el mercado, tal como, por ejemplo, Sequence Detection System™ de ABI PRISM 7700™ (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), o Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). En una realización preferida, el procedimiento de la nucleasa 5' se realiza en un dispositivo de PCR cuantitativa en tiempo real tal como Sequence Detection System™ de ABI PRISM 7700™. El sistema consiste en un aparato de ciclos térmicos, láser, dispositivo de carga acoplada (CCD), cámara y ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de 96 pocillos en un aparato de ciclos térmicos. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por láser se recoge en tiempo real a través de cables de fibra óptica para los 96 pocillos, y se detecta en el CCD. El sistema incluye un software para hacer funcionar el instrumento y para analizar los datos. 60

65 Los datos de ensayo de la nucleasa 5' inicialmente se expresan como Ct, o el ciclo umbral. Como se ha analizado anteriormente, los valores de fluorescencia se registran durante todos los ciclos y representan la cantidad de

producto amplificado hasta ese punto en la reacción de amplificación. El punto en el que primero se registra la señal fluorescente como estadísticamente significativa es el ciclo umbral (C_t).

5 Para minimizar los errores y el efecto de la variación de una muestra a otra, la RT-PCR normalmente se realiza usando un ARN de referencia que idealmente se expresa a un nivel constante entre diferentes tejidos, y no se ve afectado por el tratamiento experimental. Los ARN usados con más frecuencia para normalizar los patrones de expresión génica son ARNm para los genes constitutivos gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPD) y β -actina (ACTB).

10 Una variación más reciente de la técnica de RT-PCR es la PCR cuantitativa en tiempo real, que mide la acumulación del producto de PCR a través de una sonda fluorogénica marcada doblemente (es decir, sonda TaqMan®). La PCR en tiempo real es compatible tanto con la PCR competitiva cuantitativa, en la que se usa un competidor interno para cada secuencia diana para la normalización, como con la PCR comparativa cuantitativa que usa un gen de normalización contenido dentro de la muestra, o un gen constitutivo para la RT-PCR. Si se desean más detalles, véase, por ejemplo, Held *et al.*, Genome Research 6: 986-994 (1996).

b. Sistema MassARRAY

20 En el método de perfilado de la expresión génica basado en MassARRAY, desarrollado por Sequenom, Inc. (San Diego, CA) después del aislamiento del ARN y la transcripción inversa, al ADNc obtenido se le añade una molécula de ADN sintética (competidor), que corresponde a la región de ADNc diana en todas las posiciones excepto una sola base, y sirve como patrón interno. La mezcla de ADNc/competidor se amplifica por PCR y se somete a un tratamiento con enzima fosfatasa alcalina de gamba después de la PCR (SAP), que da como resultado la desfosforilación de los nucleótidos restantes. Después de la inactivación de la fosfatasa alcalina, los productos de PCR del competidor y el ADNc se someten a una extensión de cebadores, que genera distintas señales de masa para los productos de PCR derivados del competidor y del ADNc. Después de la purificación, estos productos se distribuyen en una matriz de chips, que está precargada con componentes necesarios para el análisis con espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo y desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS). El ADNc presente en la reacción después se cuantifica analizando las relaciones de las áreas de los picos en el espectro de masas generado. Si se desean más detalles, véase, por ejemplo, Ding y Cantor, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 100: 3059-3064 (2003).

c. Otros métodos basados en PCR

35 Otras técnicas basadas en PCR incluyen, por ejemplo, presentación diferencial (Liang y Pardee, Science 257: 967-971 (1992)); polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (iAFLP) (Kawamoto *et al.*, Genome Res. 12: 1305-1312 (1999)); tecnología BeadArray™ (Illumina, San Diego, CA; Oliphant *et al.*, Discovery of Markers for Disease (Supplement to Biotechniques), junio 2002; Ferguson *et al.*, Analytical Chemistry 72: 5618 (2000)); BeadsArray para la detección de la expresión génica (BADGE), usando el sistema LabMAP de Luminex¹⁰⁰ disponible en el mercado y múltiples microesferas codificadas por colores (Luminex Corp., Austin, TX) en un ensayo rápido para la expresión génica (Yang *et al.*, Genome Res. 11: 1888-1898 (2001)); y análisis del perfilado de expresión de alta cobertura (HiCEP) (Fukumura *et al.*, Nucl. Acids. Res. 31(16) e94 (2003)).

3. Micromatrices

45 La expresión génica diferencial también puede identificarse o confirmarse usando la técnica de micromatrices. De esta manera, el perfil de expresión de genes asociados al cáncer de mama puede medirse en tejido tumoral fresco o incluido en parafina, usando la tecnología de micromatrices. En este método, se cultivan en placas o se disponen en serie sobre un sustrato de microchip las secuencias polinucleotídicas de interés (incluyendo ADNc y oligonucleótidos). Las secuencias dispuestas en serie después se hibridan con sondas de ADN específicas de las células o tejidos de interés. Como ocurre en el método de RT-PCR, la fuente de ARNm típicamente es ARN total aislado de tumores o líneas de células tumorales humanas, y tejidos o líneas celulares normales correspondientes. De esta manera, el ARN puede aislarse a partir de una diversidad de tumores o líneas de células tumorales primarias. Si la fuente de ARNm es un tumor primario, el ARNm puede extraerse, por ejemplo, a partir de muestras de tejido fijado (por ejemplo fijado con formalina) e incluido en bloques de parafina, congelado o archivado, que se preparan rutinariamente y se conservan en la práctica clínica diaria.

60 En una realización específica de la técnica de micromatriz, se aplican los insertos de los clones de ADNc amplificados por PCR en un sustrato en una matriz densa. Preferentemente, se aplican al menos 10.000 secuencias de nucleótidos en el sustrato. Los genes dispuestos en la micromatriz, inmovilizados en el microchip a 10.000 elementos cada uno, son adecuados para la hibridación en condiciones rigurosas. Pueden generarse sondas de ADNc marcadas con colorantes fluorescentes mediante la incorporación de nucleótidos fluorescentes por transcripción inversa del ARN extraído de los tejidos de interés. Las sondas de ADNc marcadas aplicadas al chip hibridan con especificidad con cada mancha de ADN en la matriz. Después de un lavado riguroso para retirar las sondas unidas de forma no específica, el chip se explora por microscopía láser confocal o por otro método de detección, tal como una cámara de CCD. La cuantificación de la hibridación de cada elemento dispuesto permite la

evaluación de la abundancia del ARNm correspondiente. Con fluorescencia de doble color, las sondas de ADNc marcadas por separado generadas a partir de dos fuentes de ARN se hibridan por parejas con la matriz. De esta manera, se determina simultáneamente la abundancia relativa de los transcritos procedentes de las dos fuentes correspondientes a cada gen especificado. La escala miniaturizada de la hibridación proporciona una evaluación conveniente y rápida del patrón de expresión para grandes cantidades de genes. Se ha demostrado que dichos métodos tienen la sensibilidad necesaria para detectar transcritos raros, que se expresan a unas pocas copias por célula, y para detectar reproduciblemente al menos diferencias de aproximadamente dos veces en los niveles de expresión (Schena *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 93(2): 106-149 (1996)). Los análisis de micromatrices pueden realizarse por un equipo disponible en el mercado, siguiendo los protocolos del fabricante, tales como mediante el uso de la tecnología Affymetrix GenChip, o la tecnología de micromatrices de Incyte.

El desarrollo de métodos de micromatrices para el análisis a gran escala de la expresión génica hace que sea posible buscar sistemáticamente marcadores moleculares de clasificación de cánceres y predecir los resultados en una diversidad de tipo tumorales.

4. Análisis en serie de la expresión génica (SAGE)

El análisis en serie de la expresión génica (SAGE) es un método que permite el análisis simultáneo y cuantitativo de un gran número de transcritos génicos, sin necesidad de proporcionar una sonda de hibridación individual para cada transcrito. En primer lugar, se genera un marcador de secuencia corta (de aproximadamente 10-14 pb) que contiene suficiente información para identificar de forma única un transcrito, siempre que el marcador se obtenga a partir de una única posición dentro de cada transcrito. Después, se unen entre sí muchos transcritos para formar moléculas seriadas largas, que pueden secuenciarse revelando la identidad de los múltiples marcadores simultáneamente. El patrón de expresión de cualquier población de transcritos puede evaluarse cuantitativamente determinando la abundancia de marcadores individuales, e identificando el gen que corresponde a cada marcador. Si se desean más detalles, véase, por ejemplo, Velculescu *et al.*, Science 270: 484-487 (1995); y Velculescu *et al.*, Cell 88: 243-51 (1997).

5. Análisis de la expresión génica por secuenciación masiva paralela (MPSS)

Este método, descrito por Brenner *et al.*, Nature Biotechnology 18: 630-634 (2000), es una estrategia de secuenciación que combina la secuenciación de firmas genéticas no basada en gel con la clonación *in vitro* de millones de plantillas en microperlas separadas de 5 µm de diámetro. En primer lugar, se construye una biblioteca de microperlas de plantillas de ADN por clonación *in vitro*. Esto se continúa por el ensamblaje de una matriz plana de las microperlas que contienen plantillas en una celda de flujo a alta densidad (típicamente mayor de 3×10^6 microperlas/cm²). Los extremos libres de las plantillas clonadas en cada microperla se analizan simultáneamente, usando un método de secuenciación de firmas genéticas basado en fluorescencia que no requiere separación de fragmentos de ADN. Se ha demostrado que este método proporciona de forma simultánea y precisa, en una sola operación, cientos de miles de secuencias de firmas genéticas a partir de una biblioteca de ADNc de levadura.

6. Inmunohistoquímica

Los métodos de inmunohistoquímica también son adecuados para detectar los niveles de expresión de los marcadores de pronóstico de la presente invención. De esta manera, se usan anticuerpos o antisuero, preferentemente antisuero policlonal, y aún más preferentemente anticuerpos monoclonales específicos para cada marcador, para detectar la expresión. Los anticuerpos pueden detectarse por marcaje directo de los propios anticuerpos, por ejemplo, con marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores haptenos tales como biotina o una enzima tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Como alternativa, se usa un anticuerpo primario no marcado junto con un anticuerpo secundario marcado, que comprende antisuero, antisuero policlonal o un anticuerpo monoclonal específico para el anticuerpo primario. Los protocolos y los kits de inmunohistoquímica son bien conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado.

7. Proteómica

El término "proteoma" se define como la totalidad de las proteínas presentes en una muestra (por ejemplo tejido, organismo o cultivo celular) en un cierto punto de tiempo. La proteómica incluye, entre otras cosas, el estudio de los cambios globales de la expresión de proteínas en una muestra (también denominada "proteómica de expresión"). La proteómica típicamente incluye las siguientes etapas: (1) separación de proteínas individuales en una muestra por electroforesis en gel 2-D (PAGE 2-D); (2) identificación de las proteínas individuales recuperadas del gel, por ejemplo, por espectrometría de masas o secuenciación N-terminal y (3) análisis de los datos usando bioinformática. Los métodos de proteómica son suplementos valiosos para otros métodos de perfilado de expresión génica, y pueden usarse solos o en combinación con otros métodos para detectar los productos de los marcadores de pronóstico de la presente invención.

8. Descripción general de aislamiento, purificación y amplificación de ARNm

En diversos artículos de revista publicados (por ejemplo T. E. Godfrey *et al.* J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 [2000]; K. Specht *et al.*, Am. J. Pathol. 158: 419-29 [2001]) se proporcionan las etapas de un protocolo representativo para perfilar la expresión génica usando tejidos incluidos en parafina y fijados como fuente de ARN, incluyendo el aislamiento de ARNm, purificación, extensión de cebadores y amplificación. En resumen, un proceso representativo empieza con el corte de secciones de aproximadamente 10 μm de espesor de muestras de tejido tumoral incluidas en parafina. Después se extrae el ARN y se retiran el ADN y las proteínas. Después del análisis de la concentración de ARN, pueden incluirse etapas de reparación y/o amplificación de ARN, si es necesario, y el ARN se somete a transcripción inversa usando promotores con especificidad de gen seguido de RT-PCR. Finalmente, los datos se analizan para identificar la mejor opción de tratamiento disponible para el paciente basándose en el patrón de expresión génica característico identificado en la muestra de tumores examinada.

9. Quimioterapia de cáncer

Los agentes quimioterapéuticos usados en el tratamiento del cáncer pueden dividirse en varios grupos, dependiendo de su mecanismo de acción. Algunos agentes quimioterapéuticos directamente dañan el ADN y el ARN. Al detener la replicación del ADN, dichos agentes quimioterapéuticos detienen completamente la replicación o dan como resultado la producción de ADN o ARN sin sentido. Esta categoría incluye, por ejemplo, el cisplatino (Platinol®), daunorrubicina (Cerubidine®), doxorubicina (Adriamycin®) y etopósido (VePesid®). Otro grupo de agentes quimioterapéuticos para el cáncer interfieren con la formación de nucleótidos o desoxirribonucleótidos, de tal forma que se bloquea la síntesis de ARN y la replicación celular. Los ejemplos de fármacos en esta clase incluyen metotrexato (Abitrexate®), mercaptopurina (Purinethol®), fluorouracilo (Acrucil®) e hidroxiaurea (Hydrea®). Una tercera clase de agentes quimioterapéuticos realiza la síntesis o ruptura de haces mitóticos y, como resultado, interrumpen la división celular. Los ejemplos de fármacos de esta clase incluyen Vinblastina (Velban®), Vincristina (Oncovin®) y taxenos tales como Paclitaxel (Taxol®) y Docetaxel (Taxotere®). El docetaxel está aprobado actualmente en los Estados Unidos para tratar a pacientes con cáncer de mama metastásico o localmente avanzado después del fallo de una quimioterapia previa, y a pacientes con cáncer de pulmón no microcítico metastásico o localmente avanzado después del fallo de una quimioterapia previa basada en platino.

Un problema común con la quimioterapia es la alta toxicidad de los agentes quimioterapéuticos, tales como antraciclinas y taxenos, que limita los efectos clínicos beneficiosos de esta estrategia de tratamiento.

La mayoría de los pacientes reciben quimioterapia inmediatamente después de la eliminación quirúrgica del tumor. Esta estrategia se denomina comúnmente terapia adyuvante. Sin embargo, la quimioterapia también puede administrarse antes de la cirugía, en lo que se denomina tratamiento neoadyuvante. Aunque el uso de la quimioterapia neoadyuvante procede del tratamiento del cáncer de mama avanzado e inoperable, también ha conseguido aceptación en el tratamiento de otros tipos de cánceres. La eficacia de la quimioterapia adyuvante se ha ensayado en varios ensayos clínicos. En el ensayo multicéntrico National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18 (NSAB B-18) (Fisher *et al.*, J. Clin. Oncology 15: 2002-2004 (1997); Fisher *et al.*, J. Clin. Oncology 16: 2672-2685 (1998)) se realizó una terapia neoadyuvante con una combinación de adriamicina y ciclofosfamida ("régimen AC"). En otro ensayo clínico, la terapia neoadyuvante se administró usando una combinación de 5 fluorouracilo, epirubicina y ciclofosfamida ("régimen FEC") (van Der Hage *et al.*, J. Clin. Oncol. 19: 4224-4237 (2001)). Los ensayos clínicos más nuevos también han usado regímenes de tratamiento neoadyuvantes que contienen taxano. Véase, por ejemplo Holmes *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 83: 1797-1805 (1991) y Moliterni *et al.*, Seminars in Oncology, 24: S17-10-S-17-14 (1999). Para más información sobre la quimioterapia neoadyuvante para el cáncer de mama, véase Cleator *et al.*, Endocrine-Related Cancer 9: 183-195 (2002).

10. Conjunto de genes de cáncer, subsecuencias de genes ensayadas y aplicación clínica de datos de expresión de genes

Un aspecto importante de la presente invención es usar la expresión medida de ciertos genes por tejido de cáncer de mama para proporcionar información de pronóstico. Para este fin es necesario corregir (normalizar) las diferencias en la cantidad de ARN ensayado y la variabilidad en la calidad del ARN usado, y otros factores tales como diferencias en máquinas y operador. Por lo tanto, el ensayo típicamente mide e incorpora el uso de ARN de referencia, incluyendo los transcritos a partir de genes constitutivos bien conocidos tales como GAPD y ACTB. En "User Bulletin N° 2" se proporciona un método preciso para la normalización de datos de expresión génica para el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM (Applied Biosystems; 1997). Como alternativa, la normalización puede basarse en la señal media o mediana (Ct) de todos los genes ensayados o en una gran subserie de los mismos (estrategia de normalización global). En el estudio descrito en el siguiente ejemplo, se usó la denominada estrategia de normalización central, que utilizó una subserie de los genes explorados, seleccionada basándose en la ausencia de correlación con resultados clínicos, para la normalización.

11. Recurrencia y respuesta a las puntuaciones de terapia y sus aplicaciones

La solicitud en trámite junto con la presente, con el N° de Serie 60/486.302, presentada el 10 de julio de 2003, describe un ensayo de pronóstico basado en algoritmos para determinar la probabilidad de recurrencia de cáncer y/o la probabilidad de que un paciente responda bien a una modalidad de tratamiento. Las características del algoritmo

que lo distinguen de otros métodos de pronóstico de cáncer incluyen: 1) un único conjunto de ARNm de ensayo (o los productos de expresión génica correspondientes) usado para determinar la probabilidad de recurrencia, 2) ciertos pesos usados para combinar los datos de expresión en una fórmula y 3) umbrales usados para dividir a los pacientes en grupos de diferentes niveles de riesgo, tales como grupos de riesgo bajo, medio y alto. El algoritmo produce una puntuación de recurrencia numérica (RS) o, si se evalúa la respuesta del paciente al tratamiento, la puntuación de respuesta a la terapia (RTS).

La prueba requiere un ensayo de laboratorio para medir los niveles de los ARNm especificados o sus productos de expresión, pero puede utilizar cantidades muy pequeñas de tejido fresco, de tejido congelado, o de especímenes de biopsias de tumor incluidos en parafina y fijados que ya se han recogido necesariamente de los pacientes y archivado. De esta manera, la prueba puede ser no invasiva. También es compatible con varios métodos diferentes de recolección de tejido tumoral, por ejemplo, mediante biopsia central o aspiración con aguja fina.

De acuerdo con el método, la puntuación de recurrencia del cáncer (RS) se determina:

- (a) sometiendo una muestra biológica que comprende células cancerosas obtenidas a partir de dicho sujeto a perfilado de expresión génica o de proteínas;
- (b) cuantificando el nivel de expresión de múltiples genes individuales [es decir, niveles de ARNm o proteínas] para determinar un valor de expresión para cada gen;
- (c) creando subseries de los valores de expresión génica, comprendiendo cada subserie valores de expresión para genes asociados por una función biológica relacionada con el cáncer y/o por coexpresión;
- (d) multiplicando el nivel de expresión de cada gen dentro de una subserie por un coeficiente que refleja su contribución relativa a la recurrencia del cáncer o respuesta a la terapia dentro de dicha subserie y añadiendo los productos de multiplicación para producir un término para dicha subserie;
- (e) multiplicando el término de cada subserie por un factor que refleja su contribución a la recurrencia de cáncer o respuesta a la terapia, y
- (f) produciendo la suma de términos para cada subserie multiplicada por dicho factor para producir una puntuación de recurrencia (RS) o una puntuación de respuesta a la terapia (RTS),

donde la contribución de cada subserie que no muestra una correlación lineal con la recurrencia del cáncer o la respuesta a la terapia se incluye solo por encima de un nivel umbral predeterminado; y donde a las subseries en las que la mayor expresión de los genes especificados reduce el riesgo de recurrencia de cáncer se les asigna un valor negativo, y a las subseries en las que la expresión de los genes especificados aumenta el riesgo de recurrencia de cáncer se les asigna un valor positivo.

En una realización particular, la RS se determina:

- (a) determinando los niveles de expresión de GRB7, HER2, EstR1, PR, Bc12, CEGP1, SURV, Ki.67, MYBL2, CCNB1, STK15, CTSL2, STMY3, CD68, GSTM1 y BAG1, o sus productos de expresión, en una muestra biológica que contiene células tumorales obtenidas a partir de dicho sujeto; y
- (b) calculando la puntuación de recurrencia (RS) mediante la siguiente ecuación: $RS = (0,23 \text{ a } 0,70) \times GRB7_{axis} - (0,17 \text{ a } 0,51) \times ER_{axis} + (0,53 \text{ a } 1,56) \times prolifer_{axis} + (0,07 \text{ a } 0,21) \times invasión_{axis} + (0,03 \text{ a } 0,15) \times CD68 - (0,04 \text{ a } 0,25) \times GSTM1 - (0,05 \text{ a } 0,22) \times BAG1$
donde

- (i) $GRB7_{axis} = (0,45 \text{ a } 1,35) \times GRB7 + (0,05 \text{ a } 0,15) \times HER2$;
- (ii) si $GRB7_{axis} < -2$, entonces $GRB7_{axis} \text{ thresh} = -2$, y si $GRB7_{axis} \geq -2$, entonces $GRB7_{axis} \text{ thresh} = GRB7_{axis}$;
- (iii) $ER_{axis} = (Est1 + PR + Bc12 + CEGP1)/4$;
- (iv) $prolifaxis = (SURV + Ki.67 + MYBL2 + CCNB1 + STK15)/5$;
- (v) si $prolifaxis < -3,5$, entonces $prolifaxis_{thresh} = -3,5$, si $prolifaxis \geq -3,5$, entonces $prolifaxis_{thresh} = proliferaxis$;
- y
- (vi) $invasión_{axis} = (CTSL2 + STMY3)/2$,

donde los términos para todos los genes individuales para los cuales no se han mostrado específicamente intervalos pueden variar entre aproximadamente 0,5 y 1,5, y donde un mayor valor de RS representa una mayor probabilidad de recurrencia del cáncer.

En el siguiente Ejemplo no limitante se describirán más detalles de la invención.

Ejemplo

A. Estudio retrospectivo de quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama invasivo: perfilado de expresión génica de tejido de biopsia central incluido en parafina

Este fue un estudio colaborativo en el que estaba implicado Genomic Health, Inc., (Redwood City California), y Institute Tumori, Milán, Italia. El objetivo principal del estudio fue explorar la correlación entre los perfiles moleculares previos al tratamiento y la respuesta patológica completa (pCR) a la quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama localmente avanzado.

5

Criterios de inclusión de pacientes:

Diagnóstico histológico de cáncer de mama invasivo (fecha de cirugía 1998-2002); diagnóstico de cáncer de mama localmente avanzado definido por infiltración de la piel y/o estado axilar N2 y/o ganglios supraclaviculares homolaterales positivos; biopsia central, quimioterapia neoadyuvante y resección quirúrgica realizada en el Instituto Nazionale Tumori, Milán; consentimiento informado por escrito de que el material biológico obtenido para el diagnóstico histológico o los procedimientos de diagnóstico se usaría para investigación; y evaluación histopatológica que indica cantidades adecuadas de tejido tumoral para la inclusión en este estudio de investigación.

Criterios de exclusión:

Metástasis distante; ningún bloque de tumor disponible de la biopsia central inicial o de la resección quirúrgica; o ningún tumor o un tumor muy pequeño (<5 %) del tejido total en el portaobjetos) en el bloque evaluado por el examen del portaobjetos con H&E por el patólogo.

20

Diseño del estudio

Se identificaron y se estudiaron ochenta y nueve pacientes evaluables (de un conjunto de 96 pacientes evaluables clínicamente). Los niveles de 384 especies de ARNm se midieron por RT-PCR, representando productos de genes relacionados con cánceres candidatos que se seleccionaron a partir de la bibliografía de investigación biomédica. Solo un gen se perdió debido a una señal inadecuada.

25

Las características de los pacientes fueron las siguientes: edad media 50 años; Grados de tumor: 24 % Bien, 55 % Moderado y 21 % Mal; Sesenta y tres % de los pacientes eran ER positivos {por inmunohistoquímica}; Setenta % de los pacientes tenían ganglios linfáticos positivos.

30

Todos los pacientes recibieron una quimioterapia neoadyuvante primaria: doxorubicina más Taxol 3 semanas/3 ciclos seguido de Taxol® (paclitaxel) 1 semana/12 ciclos. Después de finalizar la quimioterapia se realizó la eliminación quirúrgica del tumor. Se tomaron muestras de biopsias de tumor centrales antes de empezar la quimioterapia, y sirvieron como fuente de ARN para el ensayo de RT-PCR.

35

Materiales y métodos

Se obtuvo tejido tumoral incluido en parafina y fijado (FPE) de la biopsia antes y después de la quimioterapia. Se tomaron biopsias centrales antes de la quimioterapia. En ese caso, el patólogo seleccionó el bloque de tumor primario más representativo y presentó nueve secciones de 10 micrómetros para el análisis de ARN. Específicamente, se preparó un total de 9 secciones (de 10 micrómetros de espesor cada una) y se pusieron en tres Tubos de Microcentrifuga de marca Costar (Polipropileno, tubos de 1,7 ml, transparente; 3 secciones en cada tubo) y se reunieron.

45

Se extrajo ARN mensajero usando el *Kit de Purificación de ARN MasterPure™* (Epicentre Technologies) y se cuantificó por el método de fluorescencia RiboGreen® (Molecular probes). Los ensayos moleculares de la expresión génica cuantitativa se realizó por RT-PCR usando el Sequence Detection System™ de ABI PRISM 7900™ (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). ABI PRISM 7900™ consiste en un aparato de ciclos térmicos, láser, dispositivo de carga acoplada (CCD), cámara y ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de 384 pocillos en un aparato de ciclos térmicos. Durante la amplificación, se recoge la señal fluorescente inducida por láser en tiempo real para los 384 pocillos y se detecta en el CCD. El sistema incluye el software para hacer funcionar el instrumento y para analizar los datos.

50

Análisis y resultados

Se analizó el tejido tumoral de 384 genes. Los valores del ciclo umbral (C_T) para cada paciente se normalizaron basándose en la mediana de una subserie de los genes explorados para ese paciente particular, seleccionada basándose en la ausencia de correlación con resultados clínicos (estrategia de normalización central). La respuesta beneficiosa del paciente a la quimioterapia se definió como una respuesta patológica completa (PCR). En los pacientes se evaluó formalmente la respuesta al finalizar toda la quimioterapia.

60

Una respuesta clínica completa (cCR) requiere la desaparición completa de toda la enfermedad clínicamente detectable, por examen físico u obtención de imágenes de diagnóstico de mama.

Una respuesta patológica completa (pCR) requiere la ausencia de cáncer de mama residual tras el examen histológico de tejido tratado y sometido a biopsia, especímenes de lumpectomía o mastectomía después de la quimioterapia primaria. Puede estar presente un carcinoma ductal residual *in situ* (DCTS).

5 Es posible que no esté presente un cáncer residual en ganglios regionales. De los 89 pacientes evaluables, 11 (el 12 %) tuvieron una respuesta patológica completa (pCR). Siete de estos pacientes eran ER negativos.

10 Una respuesta clínica parcial se definió como una reducción ≥ 50 % en el área del tumor (suma de los productos de los mayores diámetros perpendiculares) o una reducción ≥ 50 % en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares más grandes de lesiones múltiples en la mama y la axila. Ningún área de enfermedad puede aumentar en > 25 % y no puede aparecer ninguna nueva lesión.

15 El análisis se realizó comparando la relación entre la expresión génica normalizada y los resultados binarios de pCR o no pCR. Se usaron modelos generalizados univariantes con funciones de enlace probit o logit. Véase, por ejemplo, Van K. Borooah, LOGIT y PROBIT, Ordered Multinomial Models, Sage University Paper, 2002.

20 La tabla 1 presenta correlaciones de respuestas patológicas con la expresión génica, e indica los 86 genes para los que el valor de p para las diferencias entre los grupos era $< 0,1$. La segunda columna (con el encabezado "Dirección") indica si la mayor expresión se correlaciona con una reducción o aumento de la probabilidad de respuesta a la quimioterapia. El significado estadístico del valor predictivo para cada gen se proporciona por el valor de P (columna de la derecha)

Enlace Probit				
Gen	Dirección	Intersección	Pendiente	Valor de P
TBP	Reducción	0,0575	2,4354	0,0000
ILT.2	Aumento	0,5273	-0,9489	0,0003
ABCC5	Reducción	0,9872	0,8181	0,0003
CD18	Aumento	3,4735	-1,0787	0,0007
GATA3	Reducción	0,6175	0,2975	0,0008
DICER1	Reducción	-0,9149	1,4875	0,0013
MSH3	Reducción	2,6875	0,9270	0,0013
GBP1	Aumento	1,7649	-0,5410	0,0014
IRS1	Reducción	1,3576	0,5214	0,0016
CD3z	Aumento	0,1567	-0,5162	0,0018
Fasl	Aumento	-0,6351	-0,4050	0,0019
TUBB	Reducción	1,2745	0,8267	0,0025
BAD	Reducción	0,9993	1,1325	0,0033
ERCC1	Reducción	0,0327	1,0784	0,0039
MCM6	Aumento	0,1371	-0,8008	0,0052
PR	Reducción	1,6079	0,1764	0,0054
APC	Reducción	0,7264	1,0972	0,0061
GGPS1	Reducción	1,0906	0,8124	0,0062
KRT18	Reducción	-0,8029	0,4506	0,0063
ESRRG	Reducción	2,0198	0,2262	0,0063
E2F1	Aumento	0,2188	-0,5277	0,0068
AKT2	Reducción	-1,3566	1,1902	0,0074
A.Catenina	Reducción	-0,6859	0,9279	0,0079
CEGP1	Reducción	1,3355	0,1875	0,0091
NPD009	Reducción	1,3996	0,2971	0,0092
MAPK14	Reducción	2,6253	1,6007	0,0093
RUNX1	Reducción	-0,4138	0,7214	0,0103
ID2	Aumento	1,7326	-0,7032	0,0104
G.Catenina	Reducción	-0,1221	0,5954	0,0110
FBXO5	Aumento	0,3421	-0,4935	0,0110
FHIT	Reducción	1,9966	0,4989	0,0113
MTA1	Reducción	0,3127	0,6069	0,0133

ES 2 550 614 T3

Enlace Probit				
Gen	Dirección	Intersección	Pendiente	Valor de P
ERBB4	Reducción	1,4591	0,1436	0,0135
FUS	Reducción	-0,6150	0,9415	0,0137
BBC3	Reducción	2,4796	0,6495	0,0138
IGF1R	Reducción	1,1998	0,3116	0,0147
CD9	Reducción	-0,9292	0,5747	0,0156
TP53BP1	Reducción	1,4325	0,8122	0,0169
MUC1	Reducción	0,8881	0,2140	0,0175
IGFBP5	Reducción	-0,6180	0,4880	0,0181
rhoC	Reducción	-0,1726	0,6860	0,0184
RALBP1	Reducción	0,2383	0,9509	0,0185
CDC20	Aumento	1,3204	-0,4390	0,0186
STAT3	Reducción	-0,9763	0,7023	0,0194
ERK1	Reducción	0,8577	0,6496	0,0198
HLA.DPB1	Aumento	3,6300	-0,6035	0,0202
SGCB	Reducción	0,6171	0,7823	0,0208
CGA	Aumento	0,0168	-0,1450	0,0209
DHPS	Reducción	0,2957	0,7840	0,0216
MGMT	Reducción	0,9238	0,6876	0,0226
CRIP2	Reducción	0,5524	0,4394	0,0230
MMP12	Aumento	0,4208	-0,2419	0,0231
ErbB3	Reducción	0,9438	0,2798	0,0233
RAP1GDS1	Reducción	0,2617	0,7672	0,0235
CDC25B	Aumento	1,6965	-0,5356	0,0264
IL6	Aumento	0,0592	-0,2388	0,0272
CCND1	Reducción	0,2260	0,2992	0,0272
CYBA	Aumento	2,6493	-0,5175	0,0287
PRKCD	Reducción	0,2125	0,6745	0,0291
DR4	Aumento	0,3039	-0,5321	0,0316
Hepsina	Reducción	1,9211	0,1873	0,0318
CRABP1	Aumento	1,0309	-0,1287	0,0320
AK055699	Reducción	2,0442	0,1765	0,0343
Contig.51037	Aumento	0,7857	-0,1131	0,0346
VCAM1	Aumento	1,1866	-0,3560	0,0346
FYN	Aumento	1,5502	-0,5624	0,0359
GRB7	Aumento	1,3592	-0,1646	0,0375
AKAP.2	Aumento	1,7946	-0,7008	0,0382
RASSF1	Aumento	1,1972	-0,0390	0,0384
MCP1	Aumento	1,3700	-0,3805	0,0388
ZNF38	Reducción	1,7957	0,4993	0,0395
MCM2	Aumento	1,0574	-0,4695	0,0426
GBP2	Aumento	1,4095	-0,4559	0,0439
SEMA3F	Reducción	1,2706	0,3725	0,0455
CD31	Aumento	1,9913	-0,5955	0,0459
COL1A1	Reducción	-1,9861	0,3812	0,0466
ER2	Aumento	-0,5204	-0,2617	0,0471
BAG1	Reducción	0,6731	0,5070	0,0472
AKT1	Reducción	-0,4467	0,5768	0,0480
COL1A2	Reducción	-1,0233	0,3804	0,0490
STAT1	Aumento	1,9447	-0,4062	0,0498

Enlace Probit				
Gen	Dirección	Intersección	Pendiente	Valor de P
Wnt.5a	Reducción	2,2244	0,2983	0,0518
PTPD1	Reducción	1,2950	0,4834	0,0552
RAB6C	Reducción	0,4841	0,5635	0,0717
TK1	Aumento	0,6127	-0,3625	0,0886
Bcl2	Reducción	1,1459	0,2509	0,0959

Basándose en los datos expuestos en la Tabla 1, la mayor expresión de los siguientes genes se correlaciona con una mayor probabilidad de respuesta patológica completa al tratamiento: ILT.2; CD18; GBP1; CD3z; fasI; MCM6; E2F1; ID2; FBXO5; CDC20; HLA.DPB1; CGA; MMP12; CDC25B; IL6; CYBA; DR4; CRABP1; Contig.51037; VCAM1; FYN; GRB7; AKAP.2; RASSF1; MCP1; MCM2; GBP2; CD31; ER2; STAT1; TK1; mientras que la mayor expresión de los siguientes genes se correlaciona con una menor probabilidad de respuesta patológica completa al tratamiento: TBP; ABC5; GATA3; DICER1; MSH3; IRS1; TUBB; BAD; ERCC1; PR; APC; GGPS1; KRT18; ESRRG; AKT2; A.Catenina; CEGP1; NPD009; MAPK14; RUNX1; G.Catenina; FHIT; MTA1; ErbB4; FUS; BBC3; IGF1R; CD9; TP53BP1; MUC1; IGF1R; rhoC; RALBP1; STAT3; ERK1; SGCB; DHPS; MGMT; CRISP2; ErbB3; RAP1GDS1; CCND 1; PRKCD; Hepsina, AK055699; ZNF38; SEMA3F; COL1A1; BAG1; AKT1; COL1A2; Wnt.5a; PTPD1; RAB6C; Bcl2.

También se investigó la relación entre el algoritmo de riesgo de recurrencia (descrito en la solicitud de Patente de Estados Unidos en trámite junto con la presente, con el N° de Serie 60/486.302) y pCR también. El algoritmo incorpora los niveles medidos de 21 especies de ARNm. Dieciséis ARNm (nombrados más adelante) fueron marcadores clínicos candidatos y los 5 restantes (ACTB, GAPD, GUSB, RPLPO, y TFRC) fueron genes de referencia. Las mediciones de expresión normalizadas con respecto a la referencia varían de 0 a 15, donde una unidad refleja un aumento de 2 veces en el ARN.

La Puntuación de Recurrencia (RS) se calcula a partir de la expresión cuantitativa de cuatro conjuntos de genes marcadores (un grupo de receptores de estrógenos de 4 genes - ESR1, PGR, BCL2 y SCUBE2; un conjunto de proliferación de 5 genes - MKI67, MYBL2, BIRC5, CCNB1 y STK6; un conjunto HER2 de 2 genes ERBB2 y GRB7, un grupo de invasión de 2 genes MMP11 y CTSL2) y 3 genes individuales distintos - GSTM1, BAG1 y CD68.

Aunque los genes y los factores de multiplicación usados en la ecuación pueden variar, en una realización típica, puede usarse la siguiente ecuación para calcular RS:

$$RS \text{ (intervalo, 0-100)} = + 0,47 \times \text{Puntuación de Grupo HER2} \\ - 0,34 \times \text{Puntuación de Grupo ER} \\ + 1,04 \times \text{Puntuación de Grupo de Proliferación} \\ + 0,10 \times \text{Puntuación de Grupo de Invasión} \\ + 0,005 \times \text{CD68} \\ - 0,08 \times \text{GSTM1} \\ - 0,07 \times \text{BAG1}$$

La aplicación de este algoritmo para estudiar los datos de expresión clínica y génica produce una curva continua que relaciona la RS con los valores de pCR, como se muestra en la Figura 1. El examen de estos datos muestra que pacientes con RS > 50 están en el percentil 50 superior de los pacientes en términos de probabilidad de respuesta a la quimioterapia, y que los pacientes con RS < 35 están en el percentil 50 inferior de los pacientes en términos de probabilidad de respuesta a la quimioterapia.

Aunque la invención se ha descrito dando énfasis a ciertas realizaciones específicas, será evidente para los expertos en la materia que son posibles variaciones y modificaciones en los métodos y técnicas específicas. Por consiguiente, la presente invención incluye todas las modificaciones incluidas dentro del espíritu y alcance de la invención como se define por las siguientes reivindicaciones.

		TABLA 2	
A-Catenina	NM_00190 S21381A, Cate.f2	CGTTCCGATCCTCTATACTGCAT	23
A-Catenina	NM_00190 S2139/A-Cate.r2	AGGTCCCTGTTGGCCTTATAGG	22
A-Catenina	NM_00190 S4725/A'-Cate.p2	ATGCCTACAGCACCCTGATGTGCGA	25
ABCC5	NM_00568 S5605/ABCC5.f1	TGCAGACTGTACCATGCTGA	20
ABCC5	NM_00568 S5606/ABCC5.r1	GGCCAGCACCATAATCCTAT	20
ABCC5	NM_00568 S5607/ABCC5.p1	CTGCACACGGTTCTAGGCTCCG	22
AK055699	AK055699 S2097/AK0556.f1	CTGCATGTGATTGAATAAGAAACAAGA	27
AK055699	AK055699 S2098/AK0556.r1	TGTGGACCTGATCCCTGTACAC	22
AK055699	AK055699 S5057/AK0556.p1	TGACCACACCAAAGCCTCCCTGG	23

ES 2 550 614 T3

AKAP-2	NM_00720	S13741AKAP-2.f1	ACGAATTGTCGGTGAGGTCT	20
AKAP-2	NM_00720	S1375/AKAP-2.r1	GTCCATGCTGAAATCATTGG	20
AKAP-2	NM_00720	S4934/AKAP-2.p1	CAGGATACCACAGTCCTGGAGACCC	25
AKT1	NM_00516	S0010/AKT1.f3	CGCTTCTATGGCGCTGAGAT	20
AKT1	NM_00516	S0012IAKT1.r3	TCCCGGTACACCACGTTCTT	20
AKT1	NM_00516	S4776/AKT1.p3	CAGCCCTGGACTACCTGCACCTCGG	24
AKT2	NM_00162	S0828/AKT2.f3	TCCTGCCACCCTTCAAACC	19
AKT2	NM_00162	S0829/AKT2.r3	GGCGGTA AATTCATCATCGAA	21
AKT2	NM_00162	S4727/AKT2.p3	CAGGTCACGTCCGAGGTCGACACA	24
APC	NM_00003	S00221APC.f4	GGACAGCAGGAATGTGTTTC	20
APC	NM_00003	S0024/APC.r4	ACCCACTCGATTTGTTTCTG	20
APC	NM_00003	S4888/APC.p4	CATTGGCTCCCCGTGACCTGTA	22
BAD	NM_03298	S2011/BAD.f1	GGGTCAGGTGCCTCGAGAT	19
BAD	NM_03298	S2012BAD.r1	CTGCTCACTCGGCTCAAATC	21
BAD	NM_03298	S5058/BAD.p1	TGGGCCAGAGCATGTTCCAGATC	24
BAG1	NM_00432	S1386/BAG1.f2	CGTTGTCAGCACTTGAATACAA	23
BAG1	NM_00432	S1387/BAG1.r2	GTTCAACCTCTTCTGTGGACTGT	24
BAG1	NM_00432	S4731/BAG1.p2	CCCAATTAACATGACCCGGCAACCAT	26
BBC3	NM_01441	S1584/BBC3.f2	CCTGGAGGGTCTGTACAAT	20
BBC3	NM_01441	S1585/BBC3.r2	CTAATTGGGCTCCATCTCG	19
BBC3	NM_01441	S4890/BBC3.p2	CATCATGGGACTCCTGCCCTTACC	24
Bcl2	NM_00063	S0043/Bcl2.f2	CAGATGGACCTAGTACCCACTGAGA	25
Bcl2	NM_00063	S0045/Bcl2.r2	CCTATGATTTAAGGGCATTMTTCC	24
Bcl2	NM_00063	S4732/Bcl2.p2	TTCCACGCCGAAGGACAGCGAT	22
CCND1	NM_00175	S0058/CCND1.f3	GCATGTTCTGGCCTCTAAGA	21
CCND1	NM_00175	S0060/CCND1.r3	CGGTGTAGATGCACAGCTTCTC	22
CCND1	NM_00175	S4986/CCND1.p3	AAGGAGACCATCCCCCTGACGGC	23
CD18	NM_00021	S0061/CD18.f2	CGTCAGGACCCACCATGTCT	20
CD18	NM_00021	S0063/CD18.r2	GGTTAATTGGTGACATCCTCAAGA	24
CD18	NM_00021	S4987/CD18.p2	CGCGGCCGAGACATGGCTTG	20
CD31	NM_00044	S1407/CD31.f3	TGTATTTCAAGACCTCTGTGCACTT	25
CD31	NM_00044	S1408/CD31.r3	TTAGCCTGAGGAATTGCTGTGTT	23
CD31	NM_00044	S4939/CD31.p3	TTTATGAACCTGCCCTGCTCCCACA	25
CD3z	NM_00073	S0064/CD3z.f1	AGATGAAGTGGAAGGCGCTT	20
CD3z	NM_00073	S0066/CD3z.r1	TGCCCTGTAAATCGGCAACTG	21
CD3z	NM_00073	S4988/CD3z.p1	CACCCGCGCCATCCTGCA	18
CD9	NM_00176	S0686/CD9.f1	GGGCGTGGAACAGTTTTATCT	20
CD9	NM_00176	S06871CD9.r1	CACGGTGAAGGTTTTCGAGT	19
CD9	NM_00176	S4792/CD9.p1	AGACATCTGCCCAAGAAGGACGT	24
CDC20	NM_00125	S4447/CDC20.f1	TGGATTGGAGTTCTGGGAATG	21
CDC20	NM_00125	S4448/CDC20.r1	GCTTGCACTCCACAGGTACACA	22
CDC20	NM_00125	S4449/CDC20.p1	ACTGGCCGTGGCACTGGACAACA	23
CDC25B	NM_02187	S1160/CDC25B.f1	AAACGAGCAGTTTTGCCATCAG	21
CDC25B	NM_02187	S1161/CDC25B.r1	GTTGGTGATGTTCCGAAGCA	20
CDC25B	NM_02187	S4842/CDC25B.p1	CCTCACCGGCATAGACTGGAAGCG	24
CEGP1	NM_02097	S1494/CEGP1.f2	TGACAATCAGCACACCTGCAT	21
CEGP1	NM_02097	S1495/CEGP1.r2	TGTGACTACAGCCGTGATCCTTA	23
CEGP1	NM_02097	S4735/CEGP1.p2	CAGGCCCTCTTCCGAGCGGT	20
CGA (CHG)	NM_00127	S3221/CGA (C.f3	CTGAAGGAGCTCCAAGACCT	20
CGA (CHG)	NM_00127	S3222/CGA (C.r3	CAAAACCGCTGTGTTTCTTC	20
CGA (CHG)	NM_00127	S3254/CGA (C.p3	TGCTGATGTGCCCTCTCCTTGG	22
COL1A1	NM_00008	S4531/COL1A1.f1	GTGGCCATCCAGCTGACC	18
COL1A1	NM_00008	S4532/COL1A1.r1	CAGTGGTAGGTGATGTTCTGGGA	23
COL1A1	NM_00008	S4533/COL1A1.p1	TCCTGCGCCTGATGTCCACCG	21
COL1A2	NM_00008	S4534/COL1A2.f1	CAGCCAAGA AACTGGTATAGGAGCT	24
COL1A2	NM_00008	S4535/COL1A2.r1	AAACTGGCTGCCAGCATTG	19
COL1A2	NM_00008	S4536/COL1A2.p1	TCTCCTAGCCAGACGTGTTTCTGTGCTTG	30
Cóntigo 510	XM_05894	S2070/Contig.f1	CGACAGTTGCGATGAAAGTTCTAA	24
Cóntigo 510	XM_05894	S2071/Contig.r1	GGCTGCTAGAGACCATGGACAT	22
Cóntigo 510	XM_05894	S5059/Contig.p1	CCTCCTCCTGTTGCTGCCACTAATGCT	27
CRABP1	NM_00437	S5441/CRABP1.f3	AACTTCAAGGTCGGAGAAGG	20
CRABP1	NM_00437	S5442/CRABP1.r3	TGGCTAAACTCCTGCATTG	20
CRABP1	NM_00437	S5443/CRABP1.p3	CCGTCCACGGTCTCCTCCTCA	21
CRIP2	NM_00131	S5676/CRIP2.f3	GTGCTACGCCACCCTGTT	18
CRIP2	NM_00131	S5677/CRIP2.r3	CAGGGGCTTCTCGTAGATGT	20
CRIP2	NM_00131	S5678/CRIP2.p3	CCGATGTTACGCCTTTGGGTC	22

ES 2 550 614 T3

CYBA	NM_00010	S5300/CYBA.f1	GGTGCCTACTCCATTGTGG	19
CYBA	NM_00010	S53011/CYBA.r1	GTGGAGCCCTTCTTCCTCTT	20
CYBA	NM_00010	S5302/CYBA.p1	TACTCCAGCAGGCACACAAACACG	24
DHPS	NM_01340	S4519/DHPS.f3	GGGAGAACGGGATCAATAGGAT	22
DHPS	NM_01340	S4520/DHPS.r3	GCATCAGCCAGTCCTCAAACCT	21
DHPS	NM_01340	S4521/DHPS.p3	CTCATTGGGCACCAGCAGGTTTCC	24
DICER1	NM_17743	S5294/DICER1.f2	TCCAATTCCAGCATCACTGT	20
DICER1	NM_17743	S5295/DICER1.r2	GGCAGTGAAGGCGATAAAGT	20
DICER1	NM_17743	S5296/DICER1.p2	AGAAAAGCTGTTTGTCTCCCCAGCA	25
DR4	NM_00384	S2532/DR4.f2	TGCACAGAGGGTGTGGGTAC	21
DR4	NM_00384	S2533/DR4.r2	TCTTCATCTGATTTACAAGCTGTACATG	28
DR4	NM_00384	S4981/DR4.p2	CAATGCTTCCAACAATTTGTTTGCTTGCC	29
E2F1	NM_00522	S3063/E2F1.f3	ACTCCCTCTACCCTTGAGCA	20
E2F1	NM_00522	S3064/E2F1.r3	CAGGCCTCAGTTCCTTCAGT	20
E2F1	NM_00522	S4821/E2F1.p3	CAGAAGAACAGCTCAGGGACCCCT	24
ER2	NM_00143	S0109/ER2.f2	TGGTCCATCGCCAGTTATCA	20
ER2	NM_00143	S0111/ER2.r2	TGTTCTAGCGATCTTGCTTCACA	23
ER2	NM_00143	S5001/ER2.p2	ATCTGTATGCGGAACCTCAAAGAGTCCCT	30
ErbB3	NM_00198	S0112/ErbB3.f1	CGGTTATGTCATGCCAGATACAC	23
ErbB3	NM_00198	S0114/ErbB3.r1	GAAGTACAGCCACTGAAGAAAGG	24
ErbB3	NM_00198	S5002/ErbB3.p1	CCTCAAAGGTACTCCCTCCCTCCCGG	25
ERBB4	NM_00523	S1231/ERBB4.f3	TGGCTCTTAATCAGTTTCGTTACCT	25
ERBB4	NM_00523	S1232/ERBB4.r3	CAAGGCATATCGATCCTCATAAAGT	25
ERBB4	NM_00523	S4891/ERBB4.p3	TGTCCCACGAATAATGCGTAAATTCTCCAG	30
ERCC1	NM_00198	S2437/ERCC1.f2	GTCCAGGTGGATGTGAAAGA	20
ERCC1	NM_00198	S2438/ERCC1.r2	CGGCCAGGATACACATCTTA	20
ERCC1	NM_00198	S4920/ERCC1.p2	CAGCAGGCCCTCAAGGAGCTG	21
ERK1	Z11696	S1560/ERK1.f3	ACGGATCACAGTGGAGGAAG	20
ERK1	Z11696	S1561/ERK1.r3	CTCATCCGTCGGGTCATAGT	20
ERK1	Z11696	S4882/EkK1.p3	CGCTGGCTCACCCCTACCTG	20
ESRRG	NM_00143	S6130/ESRRG.f3	CCAGCACCATTGTTGAAGAT	20
ESRRG	NM_00143	S6131/ESRRG.r3	AGTCTCTTGGGCATCGAGTT	20
ESRRG	NM_00143	S6132/ESRRG.p3	CCCCAGACCAAGTGTGAATACATGCT	26
fasl	NM_00063	S0121/fasl.f2	GCACTTTGGGATTCTTTCCATTAT	24
fasl	NM_00063	S0123/fasl.r2	GCATGTAAGAAGACCCTCTAGAA	24
fasl	NM_00063	S5004/fasl.p2	ACAACATTCTCGGTGCCTGTAAACAAAGAA	29
FBXO5	NM_01217	S52017/FBXO5.r1	GGATTGTAGACTGTCACCGAAATTC	25
FBXO5	NM_01217	S2018/FBXO5.f1	GGCTATTCTCATTTTCTCTACAAAGTG	28
FBXO5	NM_01217	S5061/FBXO5.p1	CCTCCAGGAGGCTACCTTCTTCATGTTTCiAC	30
FHIT	NM_00201	S2443/FHIT.f1	CCAGTGGAGCGCTTCCAT	18
FHIT	NM_00201	S2444/FHIT.r1	CTCTCTGGGTCTGCTGAAACAA	22
FHIT	NM_00201	S4921/FHIT.p1	TCGGCCATTCATCAGGACGCAG	23
FUS	NM_00496	S2936/FUS.f1	GGATAATTTCAGACAACAACCATCT	26
FUS	NM_00496	S2937/FUS.r1	TGAAGTAATCAGCCACAGACTCAAT	25
FUS	NM_00496	S4801/FUS.p1	TCAATTGTAACATTCTCACCCAGGCCTTG	29
FYN	NM_00203	S5695/FYN.f3	GAAGCGCAGATCATGAAGAA	20
FYN	NM_00203	S5696/FYN.r3	CTCCTCAGACACCACTGCAT	20
FYN	NM_00203	S5697/FYN.p3	CTGAAGCACGACAAGCTGGTCCAG	24
G-Catenina	NM_00223	S2153/G-Cate.f1	TCAGCAGCAAGGGCATCAT	19
G-Catenina	NM_00223	S2154/G-Cate.r1	GGTGGTTTTCTTGAGCGTGTACT	23
G-Catenina	NM_00223	S5044/G-Cate.p1	CGCCCGCAGGCCTCATCCT	19
GATA3	NM_00205	S0127/GATA3.f3	CAAAGGAGCTCACTGTGGTGTCT	23
GATA3	NM_00205	S0129/GATA3.r3	GAGTCAGAAATGGCTTATTCACAGATG	26
GATA3	NM_00205	S5005/GATA3.p3	TGTTCCAACCACTGAATCTGGACC	24
GBP1	NM_00205	S5698/GBP1.f1	TTGGGAAATATTTGGGCATT	20
GBP1	NM_00205	S5899/GBP1.r1	AGAAGCTAGGGTGGTTGTCC	20
GBP1	NM_00205	S5700/GBP1.p1	TTGGGACATTGTAGACTTGGCCAGAC	26
GBP2	NM_00412	S5707/GBP2.f2	GCATGGGAACCATCAACCA	19
GBP2	NM_00412	S5708/GBP2.r2	TGAGGAGTTTGCCTTGATTCCG	21
GBP2	NM_00412	S5709/GBP2.p2	CCATGGACCAACTTCACTATGTGACAGAGC	30
GGPS1	NM_00483	S1590/GGPS1.f1	CTCCGACGTGGCTTTCCA	18
GGPS1	NM_00483	S1591/GGPS1.r1	CGTAATTGGCAGAATTGATGACA	23
GGPS1	NM_00483	S4896/GGPS1.p1	TGGCCACAGCATCTATGGAATCCC	25
GRB7	NM_00531	S0130/GRB7.f2	CCATCTGCATCCATCTTGT	20
GRB7	NM_00531	S0132/GRB7.r2	GGCCACCAGGGTATTATCTG	20
GRB7	NM_00531	S4726/GRB7.p2	CTCCCCACCCTTGAGAAGTGCT	23

ES 2 550 614 T3

Hepsina	NM_00215 S2269/Hepsin.f1	AGGCTGCTGGAGGTCATCTC	20
Hepsina	NM_00215 S2270/Hepsin.r1	CTTCCTGCGGCCACAGTCT	19
Hepsina	NM_00215 S2271/Hepsin.p1	CCAGAGGCCGTTTCTTGGCCG	21
HLA-DPB1	NM_00212 S4573/HLA-DP.f1	TCCATGATGGTTCTGCAGGTT	21
HLA-DPB1	NM_00212 S4574/HLA-DP.r1	TGAGCAGCACCATCAGTAACG	21
HLA-DPB1	NM_00212 S4575/HLA-DP.p1	CCCCGGACAGTGGCTCTGACG	21
ID2	NM_00216 S0151/ID2.f4	AACGACTGCTACTCCAAGCTCAA	23
ID2	NM_00216 S0153/ID2.r4	GGATTTCCATCTTGCTCACCTT	22
ID2	NM_00216 S5009/ID2.p4	TGCCCAGCATCCCCCAGAACAA	22
IGF1R	NM_00087 S1249/IGF1R.f3	GCATGGTAGCCGAAGATTTCA	21
IGF1R	NM_00087 S1250/IGF1R.r3	TTTCCGGTAATAGTCTGTCTCATAGATATC	30
IGF1R	NM_00087 S4895/IGF1R.p3	CGCGTCATACCAAATCTCCGATTTTGA	28
IL6	NM_00060 S0760/IL6.f3	CCTGAACCTTCCAAAGATGG	20
IL6	NM_00060 S0761/IL6.r3	ACCAGCTAAGTCTCCTCATT	20
IL6	NM_00060 S4800/IL6.p3	CCAGATTGGAAGCATCCATCTTTTTCA	27
ILT-2	NM_00666 S1811/ILT-2.f2	AGCCATCACTCTCAGTGCAG	20
ILT-2	NM_00666S1612/ILT-2.r2	ACTGCAGAGTCAGGGTCTCC	20
ILT-2	NM_00666 S4904/ILT-2.p2	CAGGTCCTATCGTGGCCCCTGA	22
IRS1	NM_00554 S1943/IRS1.f3	CCACAGCTCACCTTCTGTCA	20
IRS1	NM_00554 S1944/IRS1.r3	CCTCAGTGCCAGTCTCTTCC	20
IRIS1	NM_00554 S5050/IRS1.p3	TCCATCCCAGCTCCAGCCAG	20
KRT18	NM_00022 S17101/KRT18.f2	AGAGATCGAGGCTCTCAAGG	20
KRT18	NM_00022 S1711/KRT18.r2	GGCCTTTTACTTCCTCTTCG	20
KRT18	NM_00022 S4762/KRT18.p2	TGGTCTTCTTTCATGAAGAGCAGCTCC	27
MAPK14	NM_13901 S5557/MAPK14.f2	TGAGTGAAAAGCCTGACCTATG	23
MAPK14	NM_13901 S5558/MAPK14.r2	GGACTCCATCTCTTCTTGGTCAA	23
MAPK14	NM_13901 S5559/MAPK14.p2	TGAAGTCATCAGCTTTGTGCCACCACC	27
MCM2	NM_00452 S1602/MCM2.f2	GACTTTTGCCCGCTACCTTTC	21
MCM2	NM_00452 S1603/MCM2.r2	GCCACTAACTGCTTCAGTATGAAGAG	26
MCM2	NM_00452 S4900/MCM2.p2	ACAGCTCATTGTTGTCACGCCGGA	24
MCM6	NM_00591 S1704/MCM6.f3	TGATGGTCTATGTGTCACATTCA	24
MCM6	NM_00591 S1705/MCM6.r3	TGGGACAGGAAACACACCAA	20
MCM6	NM_00591 S4919/MCM6.p3	CAGGTTTCATACCAACACAGGCTTCAGCAC	30
MCP1	NM_00298 S1955/MCP1.f1	CGCTCAGCCAGATGCAATC	19
MCP1	NM_00298 S1956/MCP1.r1	GCACTGAGATCTTCCTATTGGTGAA	25
MCP1	NM_00298 S5052/MCP1.p1	TGCCCCAGTCACCTGCTGTTA	21
MGMT	NM_00241 S1922/MGMT.f1	GTGAAATGAAACGCACCACA	20
MGMT	NM_00241 S1923/MGMT.r1	GACCCTGCTCACAACCAGAC	20
MGMT	NM_00241 S5045/MGMT.p1	CAGCCCTTTGGGGAAGCTGG	20
MMP12	NM_00242 S4381/MMP12.f2	CCAACGCTTGCCAAATCCT	19
MMP12	NM_00242 S4382/MMP12.r2	ACGGTAGTGACAGCATCAAACCTC	24
MMP12	NM_00242 S4383/MMP12.p2	AACCAGCTCTCTGTGACCCCAATT	24
MSH3	NM_00243 S5940/MSH3.f2	TGATTACCATCATGGCTCAGA	21
MSH3	NM_00243 S5941/MSH3.r2	CTTGTGAAAATGCCATCCAC	20
MSH3	NM_00243 S5942/MSH3.p2	TCCCAATTGTGCTTCTTCTGCAG	24
MTA1	NM_00468 S2369/MTA1.f1	CCGCCCTCACCTGAAGAGA	19
MTA1	NM_00468 S2370/MTA1.r1	GGAATAAGTTAGCCGCGCTTCT	22
MTA1	NM_00468 S4855/MTA1.p1	CCCAGTGTCCGCCAAGGAGCG	21
MUC1	NM_00245 S0782/MUC1.f2	GGCCAGGATCTGTGGTGGTA	20
MUC1	NM_00245 S0783/MUC1.r2	CTCCACGTCTGGACATTGA	20
MUC1	NM_00245 S4807/MUC1.p2	CTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACC	23
NPD009	(ANM_02068 S4474/NPD009.f3	GGCTGTGGCTGAGGCTGTAG	20
NPD009	(ANM_02068 S4475/NPD009.r3	GGAGCATTGAGGTCAAATCA	21
NPD009	(ANM_02068 S4476/NPD009.p3.	TTCCCAGAGTGTCTCACCTCCAGCAGAG	28
PR	NM_00092S1336/PR.f6	GCATCAGGCTGTCTATTATGG	20
PR	NM_00092 S1337/PR.r6	AGTAGTTGTGCTGCCCTTCC	20
PR	NM_00092 S4743/PR.p6	TGTCTTACCTGTGGGAGCTGTAAGGTC	28
PRKCD	NM_00625 S1738/PRKCD.f2	CTGACACTTGCCGCAGAGAA	20
PRKCD	NM_00625 S1739/PRKCD.r2	AGGTGGTCTTGGTCTGGAA	20
PRKCD	NM_00625 S4923/PRKCD.p2	CCCTTTCTACCCACCTCATCTGCAC	26
PTPD1	NM_00703 S3069/PTPD1.f2	CGCTTGCCTAACTCATACTTTCC	23
PTPD1	NM_00703 S3070/PTPD1.r2	CCATTCAGACTGCGCCACTT	20
PTPD1	NM_00703 S4822/PTPD1.p2	TCCACGCAGCGTGGCACTG	19
RAB6C	NM_03214 S5535/RAB6C.f1	GCGACAGCTCCTCTAGTTCCA	21
RAB6C	NM_03214 S5537/RAB6C.p1	TTCCCGAAGTCTCCGCCCG	19
RAB6C	NM_03214 S5538/RAB6C.r1	GGAACACCAGCTTGAATTTCT	22

ES 2 550 614 T3

RALBP1	NM_00678 S5853/RALBP1.f1	GGTGTCTCAGATATAAATGTGCAAATGC	26
RALBP1	NM_0067855854/RALBP1.r1	TTCGATATTGCCAGCAGCTATAAA	24
RALBP1	NM_00678 S5855/RALBP1.p1	TGCTGTCTGCTCGGTCTCAGTACGTTCA	28
RAP1GDS	NM_02115S5306/RAP1GD.f2	TGTGGATGCTGGATTGATTT	20
RAP1GDS	NM_02115 S5307/RAP1GD.r2	AAGCAGCACTTCCTGGTCTT	20
RAP1GDS	NM_02115 S5308/RAP1GD.p2	CCACTGGTGCAGCTGCTAAATAGCA	25
RASSF1	NM_00718 S2393/RASSF1.f3	AGTGGGAGACACCTGACCTT	20
RASSF1	NM_00718 S2394/RASSF1.r3	TGATCTGGGCATTGTACTCC	20
RASSF1	NM_00718 S4909/RASSF1.p3	TTGATCTTCTGCTCAATCTCAGCTTGAGA	29
rhoC	NM_00516 S2162/rhoC.f1	CCCGTTCGGTCTGAGGAA	18
rhoC	NM_00516 S2163/rhoC.r1	GAGCACTCAAGGTAGCCAAAGG	22
rhoC	NM_00516 S5042/rhoC.p1	TCCGGTTCGCCATGTCCCG	19
RUNX1	NM_00175 S4588/RUNX1.f2	AACAGAGACATTGCCAACCA	20
RUNX1	NM_00175 S4589/RUNX1.r2	GTGATTTGCCAGGAAGTTT	20
RUNX1	NM_00175 S4590/RUNX1.p2	TTGGATCTGCTTGCTGTCCAAACC	24
SEMA3F	NM_00418 S2857/SEMA3F.f3	CGCGAGCCCCTCATTATACA	20
SEMA3F	NM_00418 S2858/SEMA3F.r3	CACTCGCCGTTGACATCCT	19
SEMA3F	NM_00418 S4972/SEMA3F.p3	CTCCCCACAGCGCATCGAGGAA	22
SGCB	NM_00023 S5752/SGCB.f1	CAGTGGAGACCAGTTGGGTAGTG	23
SGCB	NM_00023 S5753/SGCB.r1	CCTTGAAGAGCGTCCCATA	20
SGCB	NM_00023 S5754/SGCB.p1	CACACATGCAGAGCTTGATCGTACCCA	28
STAT1	NM_00731 S1542/STAT1.f3	GGGCTCAGCTTTCAGAAGTG	20
STAT1	NM_00731 S1543/STAT1.r3	ACATGTTCTCAGCTGGTCCACA	20
STAT1	NM_00731 S4878/STAT1.p3	TGGCAGTTTTCTTCTGTACCAAAA	25
STAT3	NM_00315 S1545/STAT3.f1	TCACATGCCACTTTGGTGTT	20
STAT3	NM_00315 S1546/STAT3.r1	CTTGCAGGAAGCGGCTATAC	20
STAT3	NM_00315 S4881/STAT3.p1	TCCTGGGAGAGATTGACCAGCA	22
TBP	NM_00319 S0262/TBP.f1	GCCCGAAACGCCGAATATA	19
TBP	NM_00319 S0264/TBP.r1	CGTGGCTCTCTTATCCTCATGAT	23
TBP	NM_00319 S4751/TBP.p1	TACCGCAGCAAACCGCTTGGG	21
TK1	NM_00325 S0866/TK1.f2	GCCGGGAAGACCGTAATTGT	20
TK1	NM_00325 S0927/TK1.r2	CAGCGGCACCAGGTTTCAG	18
TK1	NM_00325 S4798/TK1.p2	CAAATGGCTTCTCTGGAAGTCCCA	26
TP53BP1	NM_00565 S1747/TP53BP.f2	TGCTGTTGCTGAGTCTGTTG	20
TP53BP1	NM_00565 S1748/TP53BP.r2	CTTGCCTGGCTTACAGATA	20
TP53BP1	NM_00565 S4924/TP53BP.p2	CCAGTCCCAGAAGACCATGTCTG	24
TUBB	NM_00106 S826/TUBB.f3	TGTGGTGAGGAAGGAGTCAG	20
TUBB	NM_00106 S5827/TUBB.r3	CCCAGAGAGTGGGTCAGC	18
TUBB	NM_00106 S5828/TUBB.p3	CTGTGACTGTCTCCAGGGCTTCCA	24
VCAM1	NM_00107 S3505/VCAM1.f1	TGGCTTCCAGGAGCTGAATACC	21
VCAM1	NM_00107 S3506/VCAM1.r1	TGCTGTCTGATGAGAAAATAGTG	24
VCAM1	NM_00107 S3507/VCAM1.p1	CAGGCACACACAGGTGGGACACAAAT	26
Wnt-5a	NM_00339 S6183/Wnt-5a.f1	GTATCAGGACCACATGCAGTACATC	25
Wnt-5a	NM_00339 S6184/Wnt-5a.r1	TGTCGGAATTGATACTGGCATT	22
Wnt-5a	NM_00339 S6185/Wnt-5a.p1	TTGATGCCTGTCTTCGCGCCTTCT	24
ZNF38	NM_14591 S5593/ZNF38.f3	TTTCCAAACATCAGCGAGTC	20
ZNF38	NM_14591 S5594/ZNF38.r3	AACAGGAGCGCTTGAAAGTT	20
ZNF38	NM_14591 S5595/ZNF38.p3	ACGGTGCTTCTCCCTCTCCAGTG	23

TABLA 3

		Secuencia
A-Catenina	NM_00190	CGTTCGGATCCTCTATACTGCAATCCAGGCATG CCTACAGCACCCCTGATGTCGAGCCATAAG- GCCAACAGGGACCT
ABCC5	NM_00568	TGCAGACTGTACCATGCTGACCATTGCCCATCG CCTGCACACGGTTCTAGGCTCCGATAGGAT- TATGGTGTGGCC
AK055699	AK055699	CTGCATGTGATTGAATAAGAAACAAGAAAGTGA CCACACCAAGCCTCCCTGGCTGGGTACAG- GGATCAGGTCCACA
AKAP-2	NM_00720	ACGAATTGTCGGTGAGGTTCTCAGGATACCACAG TCCTGGAGACCCATCCAATGATTTACAGCAT GGAC
AKT1	NM_00516	CGCTTCTATGGCGCTGAGATTGTTCAGCCCTG GACTACCTGCACTCGGAGAAGAACGTGGTG- TACCGGGA
AKT2	NM_00162	TCCTGCCACCCCTTCAAACCTCAGGTCACGTCCG AGGTGCACACAAGGTACTTCGATGATGAATI- TACCGCC
APC	NM_00003	GGACAGCAGGAAATGTGTTCTCCATACAGGTCA CGGGAGCCCAATGGTTCAGAAACAATCGAGT- GGGT
BAD	NM_03298	GGGTCAGGTGCTCGAGATCGGGCTTGGGCC AGAGCATGTTCCAGATCCCAGAGTTI- GAGCCGAGTGAGCAG
BAG1	NM_00432	CGTTGTCAGCACTTGGAAACAAGATGGTTGCC GGGTCATGTTAATGGGAAAAGAACAGTC- CACAGGAAGAGGTTGAAC
BBC3	NM_01441	CCTGGAGGGTCCGTACAATCTCATCATGGGAC TCCTGCCCTTACCCAGGGCCACA- GAGCCCCCGAGATGGAGCCCCAATTAG
Bcl2	NM_00063	CAGATGGACCTAGTACCCACTGAGATTTCCACG CCGAAGGACAGCGATGGGAAAAATGCCCT- TAAATCATAGG
CCND1	NM_00175	GCATGTTGTTGGCCCTAAGATGAAGGAGACCA TCCCCCTGACGGCCGAGAAAGCTGTGCATCTA CACCG
CD18	NM_00021	CGTCAGGACCCACCATGCTGCCCCCATCACGC GGCCGAGACATGGCTTGGCCACAGCTCTTGAG- GATGTCACCAATTAACC
CD31	NM_00044	TGATTTCAAGACCTCTGTGCACATTTATGAA CCTGCCCTGCTCCACAGAAACACAGCAATTC- CTCAGGGCTAA

CD3z	NM_00073	AGATGAAGTGGAAAGGCGCTTTTCCACCGGGCC
CD9	NM_00176	ATCCTGCAGGCACAGTTGCCGATTACAGAGGCA
CDC20	NM_00125	GGCGTGGAAACAGTTTATCTCAGACATCTGCC
CDC25B	NM_02187	CAAGAAAGACGTACTCGAAAGCTTCAACCGTG
CEGP1	NM_02097	TGGATTGGAGTTCTGGGAATGTACTGGCCGTG
CGA (CHG)	NM_00127	GCACTGGACAACAGTGTGTACTCTGTGGAGT-
COL1A1	NM_00008	GCAAGC
COL1A2	NM_00008	AAACGAGCAGTTTGCCATCAGACGCTTCCAGTC
Cóntigo 510	XM_05894	TATGCCGGTGAGGGTGTCT-
CRABP1	NM_00437	GGCCACAGCCCCCGTGCITCGGAACATCAC-
CRIP2	NM_00131	CAAC
CYBA	NM_00010	TGACAATCAGCACACCTGCATTCACCCGCTCGGA
DHPS	NM_01340	AGAGGGCCTGAGCTGCATGAATAAGGATCACG-
DICER1	NM_17743	GCTGTAGTCACA
DR4	NM_00384	CTGAAGGAGCTCCAAGACCTCGCTCTCCAAGG
		CGCCAAGGAGAGGGCACATCAGCAGAA-
		GAACACAGCGGGTTTTG
		GTGGCCATCCAGCTGACCTTCTCTGCGCCTGAT
		GTCCACCGAGGCCCTCCAGAACATCACCTAC-
		CACTG
		CAGCCAAGAACTGGTATAGGAGCTCCAAGGAC
		AAGAAACACGTCTGGCTAGGAGAAACTATCAAT-
		GCTGGCAGCCAGTTT
		CGACAGTTGCGATGAAA6TTCTAACTCTCTCCCT
		CCTCCTGTTGCTGCCACTAATGCTGATGTCCAT-
		GGTCTTAGCAGCC
		AAC TTC AAGGTCGGAGAAAGGCTTTGAGGAGGA
		GACCGTGGACGGACGCAAGTGCAGGAGTT-
		TAGCCA
		GTGCTACGCCACCCTGTTCCGACCCCAAAGGCG
		TGAACATCGGGGGCGGGGCTCCTACATCTAC-
		GAGAAGCCCCCTG
		GGTGCCTACTCCATTGTGGCGGGCGTGTGTTGT
		GTGCCTGCTGGAGTACCCCGGGGGGAAAGAG-
		GAAGAAGGGCTCCAC
		GGGAGAACGGGATCAATAGGATCGGAAACCTG
		CTGGTGCCCAATGAGAACTACTGCAAGTTTGAG-
		GACTGGCTGATGC
		TCCAATTCCAGCATCACTGTGGAGAAAAGCTGT
		TTGTCTCCCCCAGCATACTTTATCGCCTTCACT-
		GCC
		TGCACAGAGGGTGTGGTTACACCAATGCTTCC
		AACAATTTGTTTGTCTGCCCTCCCATGTA-
		CAGCTTGTAAATCAGATGAAGA

E2F1	NM_00522	ACTCCCTCTACCCTTGTAGCAAGGGCAGGGGTC CCTGAGCTGTTCTTCTGCCCCATACTGAAG- GAACTGAGGCCTG
ER2	NM_00143	TGGTCCATGCCAGTTATCACATCTGTATGOGG AACCTCAAAGAGTCCCCTGGTGAAGCAA- GATCGCTAGAACA
ErbB3	NM_00198	CGGTTATGTCATGCCAGATACACACCTCAAAGG TACTCCCTCCTCCGGGAAGGCACCCCTTCT- TCAGTGGTCTCAGTTC
ERBB4	NM_00523	TGGCTCTTAATCAGTTTGGTTACCTGCCCTCTGG AGAAATTAACGCATTATTCGTGGACAAAACCTT- TATGAGGATCGATATGCCCTTG
ERCC1	NM_00198	GTCCAGGTGGATGAAAGATCCCCAGCAGGC CCTCAAGGAGCTGGCTAAGATGTGTATCCT- GGCCG
ERK1	Z11696	ACGGATCACAGTGGAGGAAGCGCTGGCTCACC CCTACCTGGAGCAGTACTATGACCCGACGGAT GAG
ESRRG	NM_00143	CCAGCACCATTTGTTGAAGATCCCCAGACCAAGT GTGAATACATGCTCAACTCGATGCCCAAGA- GACT
fasl	NM_00063	GCACTTTGGGATCTTCCATTATGATCTTTTGT TACAGGCACCGAGAATGTTGATTCAGTGA- GGTCTTCTTACATGC
FBXO5	NM_01217	GGCTATCTCTCATTTTCTCTACAAAAGTGGCCTCA GTGAACATGAAGAGGTAGCCTCCTGGA- GGAGAATTOGGTGACAGTCTACAAATCC
FHIT	NM_00201	CCAGTGGAGCGCTTCCATGACCTGCGTCCCTGAT GAAGTGGCCGATTTGTTTTCAGACGACCCAGA- GAG
FUS	NM_00496	GGATAATTCAGACAACACACCATCTTTGTGCA AGGCCTGGGTGAGAAATGTTACAATTGAGTCT- GTGGCTGATTACTTCA
FYN	NM_00203	GAAGCGAGATCATGAAGAAGCTGAAGCACGA CAAGCTGGTCCAGCTCTATGCAGTGGTGTCT GAGGAG
G-Catenina	MM_00223	TCAGCAGCAAGGGCATCATGGAGGAGGATGAG GCCTGCGGGCGCCAGTACACCGCTCAAGAAAAC- CACC
GATA3	NM_00205	CAAAGGAGCTCACTGTGGTGTCTGTGTTCCAAC CACTGAATCTGGACCCCATCTGT GAATAAGCCATTCTGACTC
GBP1	NM_00205	TTGGGAAATTTTGGGCAATTGGTCTGGCCAAGT CTACAATGTCCCAATATCAAGGACAAACCCAC-

GBP2	NIM_00412	CCTAGCTTCT GCATGGAAACCATCAACCAGCAGGCCATGGAC CAACTTCACTATGTGACAGAGCTGACAGATC- GAATCAAGGCCAAACTCCTCA CTCCGACGTGGCTTCCAGTGGCCCCACAGCAT CTATGGAATCCCATCTGTCATCAATTTCT- GCCAATTACG CCATCTGCATCCATCTTGTGGCTCCCCCACC CTTGAGAAAGTGCCTCAGATAATAACCCCTGGT- GGCC AGGCTGCTGGAGGTCACTCCGTGTGTGATTGC CCCAGAGGCCGTTTTCTTGGCCGCCATCT- GCCAAGACTGTGGCCGAGGAAG TCCATGATGGTCTGACAGGTTCTGCGGCCCC CGGACAGTGGCTCTGACGGCGTTACTGATGGT- GCTGCTCA AACGACTGCTACTCCAAGCTCAAGGAGCTGGTG CCCAGCATCCCCAGAACAAAGAGGTGAGCAA- GATGGAATCC GCATGGTAGCCGGAAGATTTACAGTCAAAATCG GAGATTTGGTATGACCGGAGATATCTATGA GACAGACTATTACCGGAAA CCTGAACCTTCCAAAGATGGCTGAAAAGATGGA TGCTTCCAATCTGGATTCAATGAGGAGACTT- GCCTGGT AGCCATCACTCTCAGTGCAGCCAGGTCCATCG TGGCCCTGAGGAGACCCCTGACTCTGCAGT CCACAGCTCACCTTCTGTCAAGGTGCCATCCCA GCTCCAGCCAGCTCCCAGAGAGGAAGAGACT- GGCACTGAGG AGAGATCGAGGCTCTCAAGGAGGAGCTGCTCT TCATGAAGAAGAACCCAGGAGGGAAG- TAAAAGGCC TGAGTGGAAAAGCCTGACCTATGATGAAGTCAT CAGCTTTGTGCCACCACCCCTTGACCAAGAA- GAGATGGAGTCC GACTTTGCCCGTACCCTTTCATTCCGGCGTGA CAACAATGAGCTGTGCTCTCATACTGAAG- CAGTTAGTGGC TGATGGTCCATGTGTCACATTCACAGGTTT CATACCAACACAGGCTTCAGCACTTCCCTTTGGT- GTGTTCCCTGTCCCA CGCTCAGCCAGATGCAATCAATGCCCCAGTCAC CTGCTGTTAACTTACCACCAATAGGAAGATCT- CAGTOC
	NIM_00483	
GRB7	NIM_00531	
Hepsina	NM_00215	
HLA-DPB1	NM_00212	
ID2	NM_00216	
IGF1R	NM_00087	
IL6	NM_00060	
ILT-2	MM_00666	
IRS1	NM_00554	
KRT18	NM_00022	
MAPK14	NM_13901	
MCM2	NM_00452	
MCM6	NM_00591	
MCP1	NM_00298	

MGMT	NM_00241	GTAAATGAACGCACACACTGGACAGCCCTT TGGGAAGCTGGAGCTGTCTGGTTGTGAGCAG GGTC
MMP12	NM_00242	CCAACGCTTGCCAAATCCTGACAAATCAGAACC AGCTCTCTGTGACCCCAATTTGAGTTTTGAT- GCTGTCACATACCGT
MSH3	NM_00243	TGATTACCATCATGGCTCAGATTGGCTCCTATG TTCTGCAGAAGAAGCGACAAATGGGATTGT GGATGGCAATTTACAAG
MTA1	NM_00468	CCGCCCTCACCTGAAGAGAAACGGCTCCTTG GGGACACTGGGGAGGAGAGGAA- GAAGCGGGCTAACTTATCC
MUC1	NM_00245	GGCCAGGATCTGGTGGTACAATGACTCTGG CCTCCGAGAAGGTACCATCAATGTCCAC- GACGTGGAG
NPD009	(ANIM_02068	GGCTGTGGCTGAGGCTGTAGCATCTCTGCTGG AGGTGAGACACTCTGGAACTGATTTGACCTC- GAATGCTCC
PR	NM_00092	GCATCAGGCTGCATTATGGTGTCCTTACCTGT GGGAGCTGTAAAGTCTTCTTTAAGAGGGCAAT- GGAAAGGCGACACAACACT
PRKCD	NM_00625	CTGACACTTGCCGAGAGAAATCCCTTTCTCACC CACCTCATCTGCACCTTCCAGACCAAGGAC- CACCT
PTPD1	NM_00703	CGCTTGCCTAACATACATTTCCCGTTGACACTT GATCCACGCAGCGTGGCACTGGGACGTAAGT- GGCGAGTCTGAAITGG
RAB6C	NM_03214	GGCACAGCTCCTCTAGTCCACCATGTCCGGCG GGCGGAGACTTCGGGAATCCCGCTGAGGAAAT- TCAAGCTGGTGTCC
RALBP1	NM_00678	GGTGCAGATATAAATGTGCAAAATGCCTTCTTG CTGTCCCTGTGGTCTCAGTACGTTTCACTTTAT- AGCTGCTGGCAATATCGAA
RAP1GDS	NM_02115	TGTGGATGCTGGATTGATTTACCCACTGGTGCA GCTGCTAAATAGCAAAGACCCAGGAAGTGTCT- GCTT
RASSF1	NM_00718	AGTGGGAGACACTGACCTTTCTCAAGCTGAGA TTGAGCAGAAGATCAAGGAGTACAATGCCCA- GATCA
rhoC	NM_00516	CCCGTTCGGTCTGAGGAAGCCCGGACATGGC GAACCGGATCAGTCCCTTTGGCTACCTTGAGT- GCTC
RUNX1.	NM_00175	AACAGAGACATTGCCAACCATATTGGATCTGCT TGCTGTCCAAACCAGCAAACCTTCCCTGGGCAAT- CAC

SEMA3F	NM_00418	CGGAGCCCCTCATTATACACTGGGCGAGCCTC CCCACAGCGCATCGAGGAATCGTGTCTCAG- GCAAGGATGTCAACGGCGAGTG CAGTGGAGACCAGTTGGGTAGTGGTGA CTGGG TACGCTACAAGCTCTGCATGTGTGCTGAT- GGGACGCTCTTCAAGG GGGCTCAGCTTTTCAAGAGTGCTGAGTTGGCAGT TTTTCTGTCAACCAAAAGAGGTCTCAATGT- GGACCAGCTGAACATGT TCACATGCCACTTTGGTGTTCATAATCTCCTGG GAGAGATTGACCAGCAGTATAGCCGCTTCCT- GCAAG GCCGAAAAGCCGGAATATATCCCAAGCGGTTT GCTCGGTAAATCATGAGGATAAGAGAGCCACG GCCGGGAAGACCGTAATTGTGGCTGCACTGGA TGGACCTCCAGAGGAAGCCATTT GGGCCATCCTGAACCTGGTGCCGCTG TGCTGTTGCTGAGTCTGTTGCCAGTCCCAGAA GACCATGTCTGTGTGAGCTGTATCTGT- GAAGCCAGGCAAG TGTGGTGAGGAAGGAGTCAGAGAGCTGTGACT GTCTCCAGGGCTTCCAGCTGACCCACTCTCT- GGG TGGCTTCAGGAGCTGAATACCCCTCCAGGCACA CACAGGTGGACACAAAATAGGGTTTTGGAA- CACTATTTTCTCATCACGACAGCA GTATCAGGACCACATGCAGTACATCGGAGAAG GCGGAAGACAGGCATCAAAGAATGCCAGTAT CAATTCCGACA TTTTCCAAACATCAGCGAGTCCACACTGGAGAGG GAGAAGCACCGTAACTTTCAAGCGCTCCTGTT
SGCB	NM_00023	
STAT1	NM_00731	
STAT3	NM_00315	
TBP	NM_00319	
TK1	NM_00325	
TP53BP1	NM_00565	
TUBB	NM_00106	
VCAM1	NM_00107	
Wnt-5a	NM_00339	
ZNF38	NM_14591	

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> GENOMIC HEALTH, INC.
BAKER, JOFFRE B.
SHAK, STEVEN
GIANNI, LUCA

10 <120> MARCADORES DE EXPRESIÓN DE GENES PARA PREDECIR LA RESPUESTA A LA
QUIMIOTERAPIA

<130> H64514PCEPT1

15 <140> Divisional de 05735478.9
<141> 07-04-2005

<160> 340

<170> FastSEQ para windows versión 4.0

20 <210> 1
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador directo oligonucleotídico sintético

30 <400> 1
cgtccgatc ctctatactg cat 23

<210> 2
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético

40 <400> 2
aggtcctgt tggcctata gg 22

<210> 3
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda oligonucleotídica sintética

50 <400> 3
atgcctacag caccctgatg tcgca 25

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Cebador directo oligonucleotídico sintético

60 <400> 4
tgcagactgt accatgctga 20

65 <210> 5
<211> 20
<212> ADN

ES 2 550 614 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético

5

<400> 5
ggccagcacc ataacctat 20

<210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sonda oligonucleotídica sintética

15

<400> 6
ctgcacacgg ttctaggctc cg 22

20

<210> 7
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Cebador directo oligonucleotídico sintético

30

<400> 7
ctgcatgtga ttgaataaga aacaaga 27

35

<210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético

45

<400> 8
tgtggacctg atccctgtac ac 22

50

<210> 9
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Sonda oligonucleotídica sintética

60

<400> 9
tgaccacacc aaagcctccc tgg 23

65

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

70

<220>
<223> Cebador directo oligonucleotídico sintético

75

<400> 10
acgaattgtc ggtgaggtct 20

80

<210> 11
<211> 20
<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 11
 gtccatgctg aaatcattgg 20
 <210> 12
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 12
 caggatacca cagtcctgga gacctt 25
 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 13
 cgcttctatg gcgctgagat 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 14
 tcccggatca ccacgttctt 20
 <210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 15
 cagccctgga ctacctgcac tcgg 24
 <210> 16
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 16
 tcctgccacc cttcaaacc 19
 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 17
 ggcggtaaattcatcatcga a 21
 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 18
 caggtcacgtccgaggtcga caca 24
 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 19
 ggacagcagg aatgtgttc 20
 30
 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 <400> 20
 acccactcga tttgttctg 20
 40
 <210> 21
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 50
 <400> 21
 cattggctcc cctgacctg ta 22
 <210> 22
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 60
 <400> 22
 gggtcaggtg cctcgagat 19
 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 23
 ctgctcactc ggctcaaact c 21
 <210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 24
 tgggccaga gcatgttcca gatc 24
 <210> 25
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 25
 cgtgtcagc acttgaata caa 23
 <210> 26
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 26
 gtcaacctc ttctgtgga ctgt 24
 <210> 27
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 27
 cccaattaac atgaccggc aacct 26
 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 28
 cctggagggt cctgtacaat 20
 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 29
 ctaattgggc tccatctcg 19
 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 30
 catcatggga ctctgcct tacc 24
 20
 <210> 31
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 31
 cagatggacc tagtaccac tgaga 25
 30
 <210> 32
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 <400> 32
 cctatgatt aaggcatt tcc 24
 40
 <210> 33
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 50
 <400> 33
 ttccagccg aaggacagcg at 22
 <210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 60
 <400> 34
 gcatgttcgt ggcctctaag a 21
 <210> 35
 <211> 22
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 35
 cggtagat gcacagcttc tc 22
 <210> 36
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 36
 aaggagacca tcccctgac ggc 23
 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 37
 cgtcaggacc caccatgtct 20
 <210> 38
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 38
 ggttaattgg tgacatcctc aaga 24
 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 39
 cgcggccgag acatggcttg 20
 <210> 40
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 40
 tgtatttcaa gacctctgtg cactt 25
 <210> 41
 <211> 23
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 41
 ttagcctgag gaattgctgt gtt 23
 <210> 42
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 42
 ttatgaacc tgcctgctc ccaca 25
 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 43
 agatgaagtg gaaggcgctt 20
 <210> 44
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 44
 tgcctctgta atcggcaact g 21
 <210> 45
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 45
 caccgcgcc atcctgca 18
 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 46
 gggcgtggaa cagtttatct 20
 <210> 47
 <211> 19
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 47
 cacggtgaag gtttcgagt 19
 <210> 48
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 48
 agacatctgc cccaagaagg acgt 24
 <210> 49
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 49
 tggattggag ttctgggaat g 21
 <210> 50
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 50
 gctgcactc cacaggtaca ca 22
 <210> 51
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 51
 actggcogtg gcactggaca aca 23
 <210> 52
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 52
 aaacgagcag ttgcatca g 21
 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 53
 gttggtgatg ttccaagca 20
 <210> 54
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 54
 cctcaccggc atagactgga agcg 24
 20
 <210> 55
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 55
 tgacaatcag cacacctgca t 21
 30
 <210> 56
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 <400> 56
 tgtgactaca gccgtgatcc tta 23
 40
 <210> 57
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 50
 <400> 57
 caggccctct tccgagcgg 20
 <210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 60
 <400> 58
 ctgaaggagc tccaagacct 20
 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 59
 caaaaccgct gtgtttctc 20
 <210> 60
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 60
 tgctgatg tgccctcctt gg 22
 <210> 61
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 61
 gtggccatcc agctgacc 18
 <210> 62
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 62
 cagtggtagg tgatgtctg gga 23
 <210> 63
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 63
 tcctgcgct gatgtccacc g 21
 <210> 64
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 64
 cagccaagaa ctggtatagg agct 24
 <210> 65
 <211> 19
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 65
 aaactggctg ccagcattg 19
 <210> 66
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 66
 tctcctagcc agacgtgtt cttgccttg 30
 <210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 67
 cgacagtgc gatgaaagt ctaa 24
 <210> 68
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 68
 ggctgctaga gaccatggac at 22
 <210> 69
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 69
 cctcctcctg ttgctccac taatgct 27
 <210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 70
 aactcaagg tcggagaagg 20
 <210> 71
 <211> 20
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 71
 tggctaaact cctgcacttg 20
 <210> 72
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 72
 ccgtccacgg tctcctctc a 21
 20
 <210> 73
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 73
 gtgctacgcc accctggt 18
 30
 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 <400> 74
 caggggcttc tcgtagatgt 20
 40
 <210> 75
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 50
 <400> 75
 ccgatgttca cgccttggg tc 22
 <210> 76
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 60
 <400> 76
 ggtgcctact ccattgtgg 19
 <210> 77
 <211> 20
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 77
 gtggagccct tcttctctt 20
 <210> 78
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 78
 tactccagca ggcacacaaa cacg 24
 <210> 79
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 79
 gggagaacgg gatcaatagg at 22
 <210> 80
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 80
 gcatcagcca gtcctcaaac t 21
 <210> 81
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 81
 ctattgggc accagcaggt ttcc 24
 <210> 82
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 82
 tccaattcca gcatcactgt 20
 <210> 83
 <211> 20
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 83
 ggcaaggaag gcgataaagt 20
 <210> 84
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 84
 agaaaagctg ttgtctccc cagca 25
 <210> 85
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 85
 tgcacagagg ggtgggta c 21
 <210> 86
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 86
 tttcatctg attacaagc tgtacatg 28
 <210> 87
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 87
 caatgctcc aacaattgt ttgcttgcc 29
 <210> 88
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 88
 actccctcta cccttgagca 20
 <210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 89
 caggcctcag ttccttcagt 20
 <210> 90
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 90
 cagaagaaca gctcagggac ccct 24
 <210> 91
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 91
 tggccatcg ccagttatca 20
 <210> 92
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 92
 tgttctagcg atcttgcttc aca 23
 <210> 93
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 93
 atctgtatgc ggaacctcaa aagagtcct 30
 <210> 94
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 94
 cggttatgtc atgccagata cac 23
 <210> 95
 <211> 24
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 95
 gaactgagac cactgaaga aagg 24
 <210> 96
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 96
 cctcaaaggt actccctct cccgg 25
 <210> 97
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 97
 tggctcttaa tcagttcgt tacct 25
 <210> 98
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 98
 caaggcatat cgatcctcat aaagt 25
 <210> 99
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 99
 tgcccacga ataatgcgta aattctccag 30
 <210> 100
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 100
 gtccagtg atgtgaaaga 20
 <210> 101
 <211> 20
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 101
 cggccaggat acacatctta 20
 <210> 102
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 <400> 102
 cagcaggccc tcaaggagct g 21
 20 <210> 103
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 103
 30 acggatcaca gtggaggaag 20
 <210> 104
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 <400> 104
 40 ctcatccgtc gggcatagt 20
 <210> 105
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 <400> 105
 50 cgctggctca cccctacctg 20
 <210> 106
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 60 <400> 106
 ccagcacat tgttgaagat 20
 <210> 107
 65 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 107
 agtctcttgg gcatcgagtt 20
 <210> 108
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 108
 cccagacca agtgtgaata catgct 26
 <210> 109
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 109
 gcacttggg attcttcca ttat 24
 <210> 110
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 110
 gcatgtaaga agaccctcac tga 24
 <210> 111
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 111
 acaacattct cgggcctgt aacaagaa 29
 <210> 112
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 112
 ggattgtaga ctgtcaccga aattc 25
 <210> 113
 <211> 28
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 113
 ggctattcct cattttctct acaaagtg 28
 <210> 114
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 114
 cctccaggag gctaccttct tcatgttcac 30
 <210> 115
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 115
 ccagtggagc gcttccat 18
 <210> 116
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 116
 ctctctgggt cgtctgaaac aa 22
 <210> 117
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 117
 tcggccactt catcaggacg cag 23
 <210> 118
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 118
 ggataattca gacaacaaca ccatct 26
 <210> 119
 <211> 25
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 119
 tgaagtaatc agccacagac tcaat 25
 <210> 120
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 120
 tcaattgtaa cattctcacc caggcctg 29
 <210> 121
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 121
 gaagcgaga tcatgaagaa 20
 <210> 122
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 122
 ctctcagac accactgcat 20
 <210> 123
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 123
 ctgaagcacg acaagctggt ccag 24
 <210> 124
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 124
 tcagcagcaa gggcatcat 19
 <210> 125
 <211> 23
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 125
 ggtggtttc ttgagcgtgt act 23
 <210> 126
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 126
 cgcccgcagg cctcatct 19
 <210> 127
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 127
 caaaggagct cactgtggtg tct 23
 <210> 128
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 128
 gagtcaaat ggctattca cagatg 26
 <210> 129
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 129
 tgtccaacc actgaatctg gacc 24
 <210> 130
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 130
 ttggaaata ttgggcatt 20
 <210> 131
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 131
 agaagctagg gtggtgtcc 20
 <210> 132
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 132
 tgggacatt gtagacttg ccagac 26
 <210> 133
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 133
 gcatgggaac catcaacca 19
 <210> 134
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 134
 tgaggagttt gccttgattc g 21
 <210> 135
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 135
 ccatggacca acttcactat gtgacagagc 30
 <210> 136
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 136
 ctccgacgtg gctttcca 18
 <210> 137
 <211> 23
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 137
 cgtaattggc agaattgatg aca 23
 <210> 138
 10 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 <400> 138
 tggccacag catctatgga atccc 25
 20 <210> 139
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 139
 30 ccatctgcat ccatcttgtt 20
 <210> 140
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 <400> 140
 40 ggcaccagg gtattatctg 20
 <210> 141
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 50 <400> 141
 ctcccaccc ttgagaagtg cct 23
 <210> 142
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 142
 aggctgctgg aggtcatctc 20
 <210> 143
 65 <211> 19
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 143
 cttcctgagg ccacagtct 19
 <210> 144
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 144
 ccagaggccg tttcttgcc g 21
 <210> 145
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 145
 tccatgatgg ttctgcaggt t 21
 <210> 146
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 146
 tgagcagcac catcagtaac g 21
 <210> 147
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 147
 ccccgacag tggctctgac g 21
 <210> 148
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 148
 aacgactgct actccaagct caa 23
 <210> 149
 <211> 22
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 149
 ggatttccat cttgctcacc tt 22
 <210> 150
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 150
 tgcccagcat cccccagaac aa 22
 <210> 151
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 151
 gcatgtagc cgaagattc a 21
 <210> 152
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 152
 ttccggtaa tagtctgtct catagatatc 30
 <210> 153
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 153
 cgcgcatcac caaaatctcc gatttga 28
 <210> 154
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 154
 cctgaacctt ccaaagatgg 20
 <210> 155
 <211> 20
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 155
 accaggcaag tctcctcatt 20
 <210> 156
 10 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 <400> 156
 ccagattgga agcatccatc ttttca 27
 20 <210> 157
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 157
 30 agccatcact ctcagtgag 20
 <210> 158
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 <400> 158
 40 actgcagagt cagggtctcc 20
 <210> 159
 <211> 22
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 50 <400> 159
 caggtcctat cgtggcccct ga 22
 <210> 160
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 60 <400> 160
 ccacagctca ccttctgtca 20
 <210> 161
 65 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 161
 cctcagtgcc agtctcttcc 20
 <210> 162
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 162
 tccatcccag ctccagccag 20
 <210> 163
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 163
 agagatcgag gctctcaagg 20
 <210> 164
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 164
 ggcttttac ttctcttcg 20
 <210> 165
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 165
 tggttcttct tcatgaagag cagctcc 27
 <210> 166
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 166
 tgagtggaaa agcctgacct atg 23
 <210> 167
 <211> 23
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 167
 ggactccatc tcttcttggc caa 23
 <210> 168
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 168
 tgaagtcac agctttgtgc caccacc 27
 <210> 169
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 169
 gactttgcc cgctacctt c 21
 <210> 170
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 170
 gccactaac gcttcagtat gaagag 26
 <210> 171
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 171
 acagctcatt gttgtcacgc cgga 24
 <210> 172
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 172
 tgatggtcct atgtgtcaca ttca 24
 <210> 173
 <211> 20
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 173
 tgggacagga aacacaccaa 20
 <210> 174
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 174
 caggttcat accaacacag gcttcagcac 30
 <210> 175
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 175
 cgctcagcca gatgcaatc 19
 <210> 176
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 176
 gactgagat ctctattg gtgaa 25
 <210> 177
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 177
 tgccccagtc acctgctgtt a 21
 <210> 178
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 178
 gtgaaatgaa acgcaccaca 20
 <210> 179
 <211> 20
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 179
 gaccctgctc acaaccagac 20
 <210> 180
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 180
 cagcccttg ggaagctgg 20
 <210> 181
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 181
 ccaacgctg ccaatcct 19
 <210> 182
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 182
 acgtagtga cagcatcaaa actc 24
 <210> 183
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 183
 aaccagctct ctgtgacccc aatt 24
 <210> 184
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 184
 tgattacat catggctcag a 21
 <210> 185
 <211> 20
 <212> ADN
 60
 65

ES 2 550 614 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético

5

<400> 185
ctgtgaaaa tgccatccac 20

<210> 186
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sonda oligonucleotídica sintética

15

<400> 186
tccaattgt cgcttcttct gcag 24

20

<210> 187
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Secuencia directa oligonucleotídica sintética

30

<400> 187
ccgccctcac ctgaagaga 19

<210> 188
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Secuencia inversa oligonucleotídica sintética

40

<400> 188
ggaataagtt agccgcgctt ct 22

<210> 189
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Sonda oligonucleotídica sintética

50

<400> 189
ccaagtgtcc gccaaaggagc g 21

<210> 190
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Cebador directo oligonucleotídico sintético

60

<400> 190
ggccaggatc tgtgttgta 20

<210> 191
<211> 20
<212> ADN

65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 191
 ctccacgtcg tggacattga 20
 <210> 192
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 192
 ctctggcctt ccgagaaggt acc 23
 20
 <210> 193
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 193
 ggctgtggct gaggctgtag 20
 30
 <210> 194
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 <400> 194
 ggagcattcg aggtcaaac a 21
 40
 <210> 195
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 <400> 195
 ttccagagt gtctcacctc cagcagag 28
 50
 <210> 196
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 60
 <400> 196
 gcatcaggct gtcattatg 20
 <210> 197
 <211> 20
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 197
 agtagttgtg ctgcccttc 20
 <210> 198
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 198
 tgccttacc tggggagct gtaagtc
 20
 <210> 199
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 199
 ctgacactg ccgagagaa 20
 30
 <210> 200
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 <400> 200
 aggtgtcct tggctggaa 20
 40
 <210> 201
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 <400> 201
 cccttctca cccacctcat ctgcac 26
 50
 <210> 202
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 202
 cgcttgcta actcactt tcc 23
 60
 <210> 203
 <211> 20
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 203
 ccattcagac tgcgccactt 20
 <210> 204
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 204
 tccacgcagc gtggcactg 19
 <210> 205
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 205
 gcgacagctc ctctagtcc a 21
 <210> 206
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 35
 <400> 206
 ttcccgaagt ctccgcccg 19
 <210> 207
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 45
 <400> 207
 ggaacaccag cttgaatttc ct 22
 <210> 208
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 208
 ggtgtcagat ataaatgtgc aaatgc 26
 <210> 209
 <211> 24
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 209
 ttcgatattg ccagcagcta taaa 24
 <210> 210
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 210
 tgtgtcctg tcggtctcag tacgttca 28
 <210> 211
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 211
 tgtggatgct ggattgatt 20
 <210> 212
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 212
 aagcagcact tctctgttct 20
 <210> 213
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 213
 ccactggtgc agctgctaaa tagca 25
 <210> 214
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 214
 agtgggagac acctgacct 20
 <210> 215
 <211> 20
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 215
 tgatctgggc attgtactcc 20
 <210> 216
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 216
 ttgatcttct gctcaatctc agcttgaga 29
 <210> 217
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 25
 <400> 217
 cccggtcggc ctgaggaa 18
 <210> 218
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 35
 <400> 218
 gagcactcaa ggtagccaaa gg 22
 <210> 219
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 45
 <400> 219
 tccggtcgc catgtcccg 19
 <210> 220
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 55
 <400> 220
 aacagagaca ttgccaacca 20
 <210> 221
 <211> 20
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 221
 gtgattgcc caggaagtt 20
 <210> 222
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 15
 <400> 222
 ttgatctgc ttgctgcc aacc 24
 20
 <210> 223
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 223
 cgcgagcccc tcattataca 20
 30
 <210> 224
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 <400> 224
 cactcgcctg tgacatcct 19
 40
 <210> 225
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 <400> 225
 ctccccacag cgcatcgagg aa 22
 50
 <210> 226
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 226
 cagtgagac cagttgggta gtg 23
 60
 <210> 227
 <211> 20
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 227
 ccttgaagag cgtcccatca 20
 <210> 228
 10 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 <400> 228
 cacacatgca gagctttag cgtaccca 28
 20 <210> 229
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 229
 30 gggctcagct tcagaagtg 20
 <210> 230
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 <400> 230
 40 acatgttcag ctggtccaca 20
 <210> 231
 <211> 25
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 50 <400> 231
 tggcagttt cttctgtcac caaaa 25
 <210> 232
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 232
 tcacatgcca ctttgtgtt 20
 <210> 233
 65 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 233
 cttgcaggaa gcggtatac 20
 <210> 234
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 <400> 234
 tctctggaga gattgaccag ca 22
 20 <210> 235
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 235
 30 gcccgaaacg ccgaatata 19
 <210> 236
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 <400> 236
 40 cgtggctctc ttactctcat gat 23
 <210> 237
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 50 <400> 237
 taccgcagca aaccgcttgg g 21
 <210> 238
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 238
 gccgggaaga ccgtaattgt 20
 <210> 239
 65 <211> 18
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 239
 cagcggcacc aggttcag 18
 <210> 240
 10 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 <400> 240
 caaatggctt cctctggaag gtccca 26
 20 <210> 241
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 241
 30 tgctgtgct gactctgtg 20
 <210> 242
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 <400> 242
 40 ctgcctggc tcacagata 20
 <210> 243
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 <400> 243
 50 ccagtcccca gaagaccatg tctg 24
 <210> 244
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 244
 60 tgtgtgagg aaggagtcag 20
 <210> 245
 <211> 18
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 5
 <400> 245
 cccagagagt gggtcagc 18
 <210> 246
 10 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 <400> 246
 ctgtgactgt ctccagggt tcca 24
 20 <210> 247
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 247
 30 tggcttcagg agctgaatac c 21
 <210> 248
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético
 <400> 248
 40 tgctgtcgtg atgagaaaat atg 24
 <210> 249
 <211> 26
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 50 <400> 249
 caggcacaca caggtgggac acaaat 26
 <210> 250
 <211> 25
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Cebador directo oligonucleotídico sintético
 <400> 250
 gtatcaggac cacatgcagt acatc 25
 <210> 251
 65 <211> 22
 <212> ADN

ES 2 550 614 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético

5

<400> 251
tgtcgaatt gatactggca tt 22

10

<210> 252
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Sonda oligonucleotídica sintética

<400> 252
ttgatgcctg tcttcgccc ttct 24

20

<210> 253
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Cebador directo oligonucleotídico sintético

<400> 253
ttccaaca tcagcgagtc 20

30

<210> 254
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Cebador inverso oligonucleotídico sintético

<400> 254
aacaggagcg cttgaaagt 20

40

<210> 255
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Sonda oligonucleotídica sintética

50

<400> 255
acggtgcttc tcctctcca gtg 23

55

<210> 256
<211> 78
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60

<220>
<223> Amplicón

<400> 256

cgttccgatac ctctatactg catcccaggc atgcctacag caccctgatg tcgcagccta 60
taaggccaac agggacct 78

65

<210> 257

ES 2 550 614 T3

<211> 76
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Ampliçón

<400> 257

10 **tgcagactgt accatgctga ccattgccca tcgcctgcac acggttctag gctccgatag 60**
 gattatgggtg ctggcc 76

<210> 258
<211> 78
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Ampliçón

20 <400> 258

ctgcatgtga ttgaataaga aacaagaaag tgaccacacc aaagcctccc tggctgggtg 60
 acagggatca ggtccaca 78

<210> 259
<211> 68
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Ampliçón

30 <400> 259

acgaattgtc ggtgaggctc caggatacca cagtcctgga gaccctatcc aatgatttca 60
 gcatggac 68

<210> 260
<211> 71
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Ampliçón

40 <400> 260

45 **cgcttctatg gcgctgagat tgtgtcagcc ctggactacc tgcactcgga gaagaacgtg 60**
 gtgtaccggg a 71

<210> 261
<211> 71
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Ampliçón

55 <400> 261

tcctgccacc cttcaaacct caggtcacgt ccgaggtcga cacaaggtac ttcgatgatg 60
 aatttaccgc c 71

60 <210> 262
<211> 69

ES 2 550 614 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Amplicón

<400> 262

ggacagcagg aatgtgtttc tccatacagg tcacggggag ccaatggttc agaaacaaat 60
cgagtgggt 69

10 <210> 263
<211> 73
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Amplicón

<400> 263

20 **gggtcaggtg cctcgagatc gggcttgggc ccagagcatg ttccagatcc cagagtttga 60**
gccgagtgag cag 73

25 <210> 264
<211> 81
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Amplicón

<400> 264

cgttgtcagc acttgggaata caagatgggt gccgggtcat gtttaattggg aaaaagaaca 60
gtccacagga agaggttga c 81

35 <210> 265
<211> 83
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Amplicón

<400> 265

45 **cctggagggt cctgtacaat ctcacatcatgg gactcctgcc cttacccagg ggccacagag 60**
cccccgagat ggagcccaat tag 83

50 <210> 266
<211> 73
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicón

55 <400> 266

cagatggacc tagtaccac tgagatttcc acgccgaagg acagcgatgg gaaaaatgcc 60
cttaaatcat agg 73

60 <210> 267
<211> 69
<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón
 5
 <400> 267
gcatgttcgt ggcctctaag atgaaggaga ccatccccct gacggccgag aagctgtgca 60
tctacaccg 69
 10
 <210> 268
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Amplicón
 <400> 268
cgtcaggacc caccatgtct gcccctcac gcggccgaga catggcttgg ccacagctct 60
 20
tgaggatgtc accaattaac c 81
 <210> 269
 <211> 75
 <212> ADN
 25
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón
 30
 <400> 269
tgtatttcaa gacctctgtg cacttattta tgaacctgcc ctgctccac agaacacagc 60
aattcctcag gctaa 75
 35
 <210> 270
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Amplicón
 <400> 270
agatgaagtg gaaggcgctt ttcaccgagg ccatcctgca ggcacagttg ccgattacag 60
aggca 65
 45
 <210> 271
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Amplicón
 <400> 271
 55
gggctgtggaa cagtttatct cagacatctg cccaagaag gacgtactcg aaaccttcac 60
cgtg 64
 <210> 272

ES 2 550 614 T3

<211> 68
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Ampliación

<400> 272

10 **tggattggag ttctgggaat gtactggccg tggcactgga caacagtgtg tacctgtgga 60**
gtgcaagc 68

<210> 273
<211> 85
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ampliación

20 <400> 273

aaacgagcag tttgccatca gacgcttcca gtctatgccg gtgaggctgc tgggccacag 60
ccccgtgctt cggaacatca ccaac 85

<210> 274
25 <211> 77
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Ampliación

<400> 274

35 **tgacaatcag cacacctgca ttcaccgctc ggaagagggc ctgagctgca tgaataagga 60**
tcacggctgt agtcaca 77

<210> 275
<211> 76
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ampliación

45 <400> 275

ctgaaggagc tccaagacct cgctctccaa ggcgccaagg agagggcaca tcagcagaag 60
aaacacagcg gttttg 76

<210> 276
<211> 68
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ampliación

55 <400> 276

gtggccatcc agctgacctt cctgcgctg atgtccaccg aggcctccca gaacatcacc 60
taccctg 68

60 <210> 277
<211> 80

ES 2 550 614 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Ampliçón

<400> 277

cagccaagaa ctggtatagg agctccaagg acaagaaaca cgtctggcta ggagaaacta 60
tcaatgctgg cagccagttt 80

10 <210> 278
<211> 81
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Ampliçón

<400> 278

20 **cgacagtgc gatgaaagtt ctaatctctt cctcctcct gttgctgcca ctaatgctga 60**
tgtccatggt ctctagcagc c 81

25 <210> 279
<211> 67
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Ampliçón

<400> 279

aacttcaagg tcggagaagg ctttgaggag gagaccgtgg acggacgcaa gtgcaggagt 60
ttagcca 67

35 <210> 280
<211> 76
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Ampliçón

<400> 280

45 **gtgctacgcc accctgttcg gacccaaagg cgtgaacatc gggggcgcg gctcctacat 60**
ctacgagaag ccctg 76

50 <210> 281
<211> 77
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Ampliçón

<400> 281

ggtgcctact ccattgtggc gggcgtgttt gtgtgcctgc tggagtaccc ccgggggaag 60
aggaagaagg gctccac 77

60 <210> 282
<211> 78
<212> ADN

ES 2 550 614 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicón

5

<400> 282

gggagaacgg gatcaatagg atcggaaacc tgctggtgcc caatgagaat tactgcaagt 60
ttgaggactg gctgatgc 78

10

<210> 283
<211> 68
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Amplicón

<400> 283

tccaattcca gcatcactgt ggagaaaagc tgtttgtctc cccagcatac tttatcgctt 60
tcactgcc 68

20

<210> 284
<211> 83
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Amplicón

30

<400> 284

tgcacagagg gtgtggggtta caccaatgct tccaacaatt tgtttgcttg cctcccatgt 60
acagcttgta aatcagatga aga 83

35

<210> 285
<211> 75
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Amplicón

<400> 285

actccctcta cccttgagca agggcagggg tccttgagct gttcttctgc cccatactga 60
aggaactgag gcctg 75

45

<210> 286
<211> 76
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> Amplicón

55

<400> 286

tggtccatcg ccagttatca catctgatg cggaacctca aaagagtccc tggtgtgaag 60
caagatcgct agaaca 76

60

<210> 287
<211> 81
<212> ADN

ES 2 550 614 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicón

5

<400> 287

cggttatgtc atgccagata cacacctcaa aggtactccc tcctcceggg aaggcacctt 60
ttcttcagtg ggtctcagtt c 81

10

<210> 288
<211> 86
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Amplicón

<400> 288

tggtctcttaa tcagtttcgt tacctgcctc tggagaattt acgcattatt cgtgggacaa 60
aactttatga ggatcgatat gccttg 86

20

<210> 289
<211> 67
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Amplicón

30

<400> 289

gtccaggtgg atgtgaaaga tccccagcag gccctcaagg agctggctaa gatgtgtatc 60
ctggccg 67

35

<210> 290
<211> 67
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Amplicón

<400> 290

acggatcaca gtggaggaag cgctggctca cccctacctg gagcagtact atgacccgac 60
ggatgag 67

45

<210> 291
<211> 67
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> Amplicón

<400> 291

55

ccagcaccat tgttgaagat ccccagacca agtgtgaata catgctcaac tcgatgccca 60
agagact 67

60

<210> 292
<211> 80
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 550 614 T3

<220>
<223> Amplicón

<400> 292

5
gcactttggg attctttcca ttatgattct ttgttacagg caccgagaat gttgtattca 60
gtgaggtct tcttacatgc 80

<210> 293
<211> 90
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicón

15 <400> 293

ggctattcct cattttctct acaaagtggc ctcagtgaac atgaagaagg tagcctcctg 60
gaggagaatt tcggtgacag tctacaatcc 90

<210> 294
<211> 67
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicón

25 <400> 294

ccagtggagc gcttccatga cctgcgtcct gatgaagtgg ccgatttggt tcagacgacc 60
cagagag 67

<210> 295
<211> 80
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicón

40 <400> 295

ggataattca gacaacaaca ccatctttgt gcaaggcctg ggtgagaatg ttacaattga 60
gtctgtggct gattacttca 80

<210> 296
<211> 69
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicón

50 <400> 296

gaagcgcaga tcatgaagaa gctgaagcac gacaagctgg tccagctcta tgcagtgggtg 60
tctgaggag 80

<210> 297
<211> 68
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

60

ES 2 550 614 T3

<223> Amplicón

<400> 302

ccatctgcat ccatcttgtt tgggctcccc acccttgaga agtgcctcag ataataccct 60

5 **ggtggcc** 67

<210> 303

<211> 84

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicón

15 <400> 303

aggctgctgg aggtcatctc cgtgtgtgat tgccccagag gccgtttctt ggccgccatc 60
tgccaagact gtggccgcag gaag 84

<210> 304

20 <211> 73

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Amplicón

<400> 304

tccatgatgg tictgcaggt ttctgcggcc ccccggacag tggctctgac ggcgttactg 60
atggtgctgc tca 73

30 <210> 305

<211> 76

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Amplicón

<400> 305

40 **aacgactgct actccaagct caaggagctg gtgcccagca tccccagaa caagaaggctg 60**
agcaagatgg aaatcc 76

<210> 306

45 <211> 83

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Amplicón

<400> 306

gcatggtagc cgaagatttc acagtcaaaa tcggagattt tggtatgacg cgagatatct 60
atgagacaga ctattaccgg aaa 83

55 <210> 307

<211> 72

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicón

 <400> 307
 5
 cctgaacctt ccaaagatgg ctgaaaaaga tggatgcttc caatctggat tcaatgagga 60
 gacttgctg gt 72

 <210> 308
 <211> 63
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Amplicón
 15
 <400> 308

 agccatcact ctcagtgcag ccaggctccta tcgtggcccc tgaggagacc ctgactctgc 60
 agt 63
 20
 <210> 309
 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Amplicón

 <400> 309

 ccacagctca ctttctgtca ggtgtccatc ccagctccag ccagctccca gagaggaaga 60
 gactggcact gagg 74
 30

 <210> 310
 <211> 68
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Amplicón
 40
 <400> 310

 agagatcgag gctctcaagg aggagctgct cttcatgaag aagaaccacg aagaggaagt 60
 aaaaggcc 68
 45
 <210> 311
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Amplicón
 50
 <400> 311

 tgagtggaaa agcctgacct atgatgaagt catcagcttt gtgccaccac cccttgacca 60
 agaagagatg gagtcc 76
 55

 <210> 312
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>

ES 2 550 614 T3

<223> Ampliación
<400> 312

5 **gacttttgcc cgctaccttt cattccggcg tgacaacaat gagctggtgc tcttcatact 60**
 gaagcagtta gtggc 75

<210> 313
<211> 82
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ampliación

15 <400> 313

tgatggctct atgtgtcaca ttcatacag gtttcatacc aacacaggct tcagcacttc 60
 ctttgggtg tttcctgtcc ca 82

<210> 314
<211> 71
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Ampliación

<400> 314

cgctcagcca gatgcaatca atgccccagt cacctgctgt tataacttca ccaataggaa 60
 gatctcagtg c 71

30 <210> 315
<211> 69
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ampliación

<400> 315

40 **gtgaaatgaa acgcaccaca ctggacagcc ctttggggaa gctggagctg tctggttgtg 60**
 agcagggtc 69

<210> 316
<211> 78
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ampliación

50 <400> 316

ccaacgcttg ccaaatcctg acaattcaga accagctctc tgtgacccca atttgagttt 60
 tgatgctgtc actaccgt 78

55 <210> 317
<211> 82
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ampliçón
 <400> 317

5 **tgattaccat catggctcag attggctcct atgttctgc agaagaagcg acaattggga 60**
 ttgtggatgg cattttcaca ag 82

<210> 318
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Ampliçón

15 <400> 318

ccgccctcac ctgaagagaa acgcgctcct tggcggacac tgggggagga gaggaagaag 60
 cgcggtaac ttattcc 77

<210> 319
 <211> 71
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Ampliçón

25 <400> 319

ggccaggatc tgtggtgga caattgactc tggccttccg agaaggtacc atcaatgtcc 60

acgacgtgga g 71

30

<210> 320
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Ampliçón

40 <400> 320

ggctgtggct gaggctgtag catctctgct ggaggtgaga cactctggga actgatttga 60
 cctcgaatgc tcc 73

<210> 321
 <211> 85
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Ampliçón

50 <400> 321

gcatcaggct gtcattatgg tgtccttacc tgtgggagct gtaaggtctt ctttaagagg 60
 gcaatggaag ggcagcacaå ctact 85

55

<210> 322
 <211> 68
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón
 5
 <400> 322
ctgacacttg ccgcagagaa tccctttctc acccáctca tctgcacctt ccagaccaag 60
gaccacct 68
 10
 <210> 323
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Amplicón
 <400> 323
 20
cgcttgccctá actcatactt tcccgttgac acttgatcca cgcagcgtgg cactgggacg 60
taagtggcgc agtctgaatg g 81
 <210> 324
 <211> 78
 <212> ADN
 25
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón
 30
 <400> 324
gcgacagctc ctctagttcc accatgtccg cgggcggaga cttcgggaat ccgctgagga 60
aattcaagct ggtgttcc 78
 35
 <210> 325
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Amplicón
 <400> 325
 45
ggtgtcagat ataaatgtgc aaatgccttc ttgctgtcct gtcggtctca gtacgttcac 60
tttatagctg ctggcaatat cgaa 84
 <210> 326
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Amplicón
 <400> 326
 55
tgtggatgct ggattgattt caccactggt gcagctgcta aatagcaaag accaggaagt 60
gctgctt 67
 <210> 327
 <211> 69
 <212> ADN
 60

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón
 5
 <400> 327
agtgggagac acctgacctt tctcaagctg agattgagca gaagatcaag gagtacaatg 60
cccagatca 69
 10
 <210> 328
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Amplicón
 <400> 328
cccgttcggt ctgaggaagg ccgggacatg gcgaaccgga tcagtgacctt tggctacctt 60
gagtgctc 68
 20
 <210> 329
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Amplicón
 <400> 329
aacagagaca ttgccaacca tattggatct gcttgctgtc caaaccagca aacttcctgg 60
gcaaatcac 69
 30
 <210> 330
 <211> 86
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Amplicón
 <400> 330
cgcgagcccc tcattataca ctgggcagcc tccccacagc gcatcgagga atgcgtgctc 60
tcaggcaagg atgtcaacgg cgagtg 86
 40
 <210> 331
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Amplicón
 <400> 331
cagtggagac cagttgggta gtggtgactg ggtacgctac aagctctgca tgtgtgctga 60
tgggacgctc ttcaagg 77
 50
 <210> 332
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <210> 332
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60

<220>
 <223> Amplicón

 <400> 332
 5
gggctcagct ttcagaagtg ctgagttggc agttttcttc tgtcaccaaa agaggtctca 60
atgtggacca gctgaacatg t 81

 <210> 333
 <211> 70
 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Amplicón
 15
 <400> 333

tcacatgccca ctttggtggt tcataatctc ctgggagaga ttgaccagca gtatagccgc 60
ttcctgcaag 70

 <210> 334
 <211> 65
 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Amplicón
 25
 <400> 334

gcccgaaacg ccgaatataa tcccaagcgg ttgctgcgg taatcatgag gataagagag 60
ccacg 65

 <210> 335
 <211> 84
 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Amplicón
 40
 <400> 335

gccgggaaga ccgtaattgt ggctgcaact gatgggacct tccagaggaa gccatttggg 60
gccatcctga acctggtgcc gctg 84

 <210> 336
 <211> 74
 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Amplicón
 50
 <400> 336

tgctgttgct gagtctgttg ccagtcccca gaagaccatg tctgtgttga gctgtatctg 60

tgaagccagg caag 74
 55
 <210> 337
 <211> 66
 <212> ADN

ES 2 550 614 T3

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Amplicón
5
<400> 337
tggtggtgagg aaggagtcag agagctgtga ctgtctccag ggcttccagc tgacccactc 60
tctggg 66

<210> 338
<211> 89
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10
<220>
<223> Amplicón
15
<400> 338
tggcttcagg agctgaatac cctcccaggc acacacaggt gggacacaaa taagggtttt 60
ggaaccacta ttttctcatc acgacagca 89

<210> 339
<211> 75
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20
<220>
<223> Amplicón
25
<400> 339
gtatcaggac cacatgcagt acatcggaga aggcgcgaag acaggcatca aagaatgcca 60
gtatcaattc cgaca 75

<210> 340
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
30
<220>
<223> Amplicón
35
<400> 340
tttccaaaca tcagcgagtc cacactggag agggagaagc accgtaactt tcaagcgctc 60
ctgtt 65

40
45

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si un nivel de un transcrito de ARN está asociado con una respuesta beneficiosa a un tratamiento de quimioterapia que comprende una antraciclina y un taxano, comprendiendo el método:
- 5 determinar el nivel de un transcrito de ARN en una muestra biológica que comprende células de cáncer de mama obtenidas antes de la quimioterapia de un sujeto humano al que se le ha diagnosticado cáncer de mama, donde el transcrito de ARN es el transcrito de ARN de BAG1;
- 10 normalizar el nivel del transcrito de ARN de BAG1 frente a un nivel de al menos un ARN de referencia para obtener un nivel de expresión normalizado de BAG1;
- 15 comparar el nivel de expresión normalizado de BAG1 del sujeto con un nivel de expresión normalizado de BAG1 en muestras de pacientes con cáncer de mama de referencia obtenidas antes de la quimioterapia a partir de pacientes con cáncer de mama tratados con quimioterapia que comprende una antraciclina y un taxano; y
- 20 determinar que el nivel de expresión normalizado de BAG1 del sujeto está asociado con una menor probabilidad de respuesta beneficiosa al tratamiento de quimioterapia que comprende una antraciclina y un taxano si el nivel de expresión normalizado de BAG1 del sujeto está aumentado en comparación con el nivel de expresión normalizado de BAG1 en las muestras de pacientes con cáncer de mama de referencia obtenidas a partir de pacientes que presentaron una respuesta beneficiosa al tratamiento de quimioterapia que comprende una antraciclina y un taxano.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha quimioterapia es quimioterapia adyuvante o quimioterapia neoadyuvante.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho taxano es docetaxel o paclitaxel.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha antraciclina es doxorubicina.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho cáncer de mama es un cáncer de mama invasivo.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho cáncer de mama es un cáncer de mama en estadio II o en estadio III.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha quimioterapia comprende además la administración de un agente anticanceroso adicional.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho agente anticanceroso adicional es un inhibidor de la topoisomerasa.
9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicha muestra biológica está fijada, incluida en parafina, o es reciente o congelada.
10. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho ARN se aísla a partir de un espécimen de tejido de cáncer de mama incluido en parafina y fijado de dicho sujeto.
11. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la respuesta beneficiosa es una respuesta clínica completa.
12. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la respuesta beneficiosa es una respuesta patológica completa.
13. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el nivel de expresión de dicho transcrito de ARN se determina por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).
14. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende además determinar el nivel de un transcrito de ARN de GRB7, HER2, EstR1, PR, Bcl2, CEGP1, SURV, Ki67, MYBL2, CCNB1, STK15, CTSL2, STMY3, CD68, GSTM1, y BAG1, o sus productos de expresión.

FIGURA 1

