

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 090**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2010 E 10251223 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2272989**

54 Título: **Métodos y reactivos para la detección temprana del melanoma**

30 Prioridad:

08.07.2009 US 223894 P

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

15.06.2017

73 Titular/es:

**JANSSEN DIAGNOSTICS, LLC (100.0%)
700 US Highway 202
Raritan, NJ 08869, US**

72 Inventor/es:

**TALANTOV, DMITRI;
PALMA, JOHN F.;
JATKOE, TIM;
VENER, TATIANA;
WANG, YIXIN y
WANG, HAIYING**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 617 090 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).

Métodos y reactivos para la detección temprana del melanoma**Descripción**5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0001] El melanoma cutáneo maligno es un problema severo de la atención de la salud con al menos 62,000 nuevos casos de melanoma invasivo diagnosticados en personas esperados en 2008 en Estados Unidos, de los cuales 8,200 morirán por esta enfermedad. La incidencia de melanoma continúa aumentando más rápido que las otras neoplasias. También es una de las neoplasias más comunes en adultos jóvenes, y así es el tipo de cáncer número dos en términos de años promedio de vida perdidos.

[0002] Se ha demostrado que ciertas proteínas están asociadas con el melanoma y sus metástasis. Estas proteínas o sus actividades se han usado en histoquímica para identificar las metástasis e incluyen L1CAM (Thies et al. (2002); Fogel et al. (2003)); y S-100 (Diego et al. (2003)). Se han aplicado microdisposiciones de alta densidad para monitorizar simultáneamente la expresión de miles de genes en muestras biológicas. Los estudios han resultado en la identificación de genes que se expresan de forma diferente en las lesiones benignas y malignas, así como genes que podrían tener valor pronóstico. Luo et al. (2001); y Wang et al. (2004). El perfil de expresión genética del melanoma maligno se realizó con una microdisposición que contiene sondas que monitorizan la expresión de 8,150 transcritos de mRNA. Bittner et al. (2000). Estos investigadores identificaron varios genes que podrían asociarse con una conducta agresiva del tumor. En un trabajo reciente, la comparación de los perfiles de expresión genética de líneas de melanoma y melanocitos normales condujo a la identificación de genes que se expresan de forma diferencial y vías moduladas en el melanoma. Takeuchi et al. (2004). Adicionalmente, el factor de diferenciación prostática GDF15, la molécula de adherencia L1CAM y la kinesina semejante 5, osteopontina, catepsina B, cadherina 3 y presenilina 2 se identificaron como marcadores prometedores para la detección del melanoma. (Talanta et al. (2005); Wang et al. (2007)). Kauffman et al. (2009) discutieron cinco marcadores para diferenciar el melanoma de los nevus, o dos marcadores para diferenciar el melanoma de los nevus atípicos. Arenberger et al. (2005) consideran la RT-PCR para la detección de células de melanoma, usando seis marcadores. McMasters et al. (2004) revisan los datos del ensayo de melanoma Sunbelt. Rothberg et al. (2008) muestran la expresión de gp100 nuclear a no nuclear como discriminador entre las lesiones benignas y melanocíticas malignas. Adema et al. (1994) caracterizaron al antígeno gp100* específico del linaje melanocítico. WO-2006-002433 muestra un método para identificar un melanoma midiendo los niveles de PLAB, L1CAM y NTRK3. Wagner et al. (1997) discuten el análisis de la expresión de gp100 en muestras de tejido humano primario, y sus implicaciones para la inmuno y geneterapia del melanoma. Alexan- drescu et al. (2010) discuten la expresión de marcadores específicos del melanoma en tejidos de biopsia de piel como herramienta para facilitar el diagnóstico del melanoma.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0003] La invención proporciona un método para identificar un melanoma en una muestra de tejido comprendiendo los pasos de (a) medir los niveles de expresión en la muestra de genes que codifican el mRNA correspondiente a SILV; (b) medir el nivel de expresión de un gen que codifica la tirosinasa; y (c) medir el nivel de expresión de SILV en relación con la tirosinasa; donde los niveles de expresión de SILV en relación con la tirosinasa son indicativos de la presencia de un melanoma.

[0004] La invención también proporciona el uso de un kit en el método de la invención, donde el kit comprenden reactivos de amplificación y detección de ácidos nucleicos.

RESUMEN DE LA DECLARACION

[0005] La presente invención proporciona un método para identificar un melanoma en una muestra de tejido, comprendiendo evaluar y medir los niveles de expresión en la muestra de genes que codifican el mRNA correspondiente a SILV (me20m), y tirosinasa (TYR), como se define en las afirmaciones. TYR se usó como control de normalización que confirma la presencia de melanocitos en la muestra evaluada. También se muestra aquí un método de identificar un melanoma obteniendo una muestra de tejido; y evaluar y medir los niveles de expresión en la muestra de genes que codifican el mRNA correspondiente a GDF15 o L1CAM y reconocido por los juegos de cebador/sonda SEQ. ID NOs.: 5-7 y 8-10, respectivamente, donde la expresión genética está por encima de un punto de corte predeterminado es indicativo de la presencia de un melanoma.

[0006] También se muestra aquí un método de distinguir un melanocitos maligno de un melanocito benigno obteniendo una muestra de tejido, y evaluando y midiendo los niveles de expresión en la muestra de genes que codifican SILV donde los niveles de expresión genética por encima del punto de corte predeterminado son indicativos de la presencia de un melanoma en la muestra.

[0007] También se muestra aquí un método para distinguir un melanocito maligno de un melanocito benigno obteniendo una muestra de tejido; y evaluando y midiendo los niveles de expresión en la muestra para genes que codifican GDF15 y L1CAM y reconocidos por los juegos de cebadores/sondas SEQ/ ID NO.: 5-7 y 8-10. Los niveles

de expresión genética por encima del punto de corte predeterminado son indicativos de la presencia de un melanoma en la muestra.

5 **[0008]** También se muestra aquí un método para determinar el protocolo del tratamiento del paciente obteniendo una muestra de tejido del paciente; y evaluando y midiendo los niveles de expresión en la muestra de genes que codifican SILV donde los niveles de expresión genética por encima del punto de corte predeterminado son indicativos de la presencia de un melanoma en la muestra.

10 **[0009]** También se muestra aquí un método para determinar el protocolo de tratamiento del paciente obteniendo una muestra de tejido del paciente; y evaluando y midiendo los niveles de expresión en la muestra de genes que codifican GDF15 y L1CAM reconocidos por los juegos de cebadores/sondas SEQ. ID NOs.: 5-7 y 8-10 donde los niveles de expresión genética por encima de niveles de corte predeterminados son indicativos de la presencia de un melanoma en la muestra.

15 **[0010]** El Marcador final es SILV y se define aquí como el gen que codifica cualquier variante, alelo, etc. SILV también se describe como PROTEÍNA MELANOCÍTICA 17; PMEL 17; PROTEÍNA PREMELANOSOMAL; PMEL; GP 100; ME20; SI; SIL; D12S53E y está representado por el Consentimiento No. NM_006928.3. La invención proporciona el uso de un kit para conducir una prueba para determinar la presencia del melanoma en una muestra celular que comprende: reactivos de amplificación y detección de ácido nucleico.

20 **[0011]** La invención proporciona juegos de cebadores/sondas para la amplificación y detección de los productos de PCR obtenidos en los métodos de la invención. Estos juegos incluyen los siguientes:

25 SEQ. ID NO: 1, SILV, Cebador hacia delante, AGCTTATCATGCCTGGTCAA
 SEQ. ID NO: 2, SILV, Cebador en reversa, AGCTTATCATGCCTGGTCAA
 SEQ. ID NO: 3, SILV, Sonda, FAM-AGGTTCCGCTATCGTGGGCAT-BHQ1
 SEQ. ID NO: 4, ABI AoD*, Hs00165976_ml

30 **[0012]** También se muestran aquí juegos de cebadores/sondas para la amplificación y detección de los productos de PCR obtenidos en los métodos declarados. Estos juegos incluyen los siguientes:

35 SEQ. ID NO: 5, GDF15, Cebador hacia delante, CGCCAGAAGTGCGGCT
 SEQ. ID NO: 6, GDF15, Cebador en reversa, CGCCAGAAGTGCGGCT
 SEQ. ID NO: 7, GDF15, Sonda MGB, FAM-ATCCGGCGGCCAC
 SEQ. ID NO: 8, L1CAM, Cebador hacia delante, ACTATGGCCTTGTCTGGGATCTC
 SEQ. ID NO: 9, L1CAM, cebador en reversa, AGATATGGAACCTGAAGTTGCACTG
 SEQ. ID NO: 10, L1CAM, Sonda MGB, FAM-CACCATCTCAGCCACAGC

40 **[0013]** También se muestran amplicones obtenidos por métodos de PCR utilizados en los métodos de la invención. Estos amplicones incluyen los siguientes:

SEQ. ID NO: 11, GDF15 PCR amplicon:

45 CGCCAGAAGTGCGGCTGGGATCCGGCGGCCACCTGCACCTGCGTATC
 TCTCGGGCCG

SEQ. ID NO: 12 L1CAM PCR amplicon:

50 ACTATGGCCTTGTCTGGGATCTCAGATTTTGGCAACATCTCAGCCACA
 GCGGGTGAAACTACAGTGTCGTCTCCTGGGTCCCCAAGGA

55 SEQ. ID NO: 13 SILV PCR amplicon:

60 AGCTTATCATGCCTGGTCAAGAAGCAGGCCTTGGGCAGGTTCCGCTGA
 TCGTGGGCATCTTGTGGTGTGATGGCTGTGGTCCTTGCATTATGAA
 GCAAGACTTCTCCGTACCCCTCTGATATATAGGCGCAGACT

SEQ. ID NO: 14 TYR PCR amplicon:

65

TCTGCTGGTATTTTTCTGTAAAGACCATTTGCAAAATTGTAACCTAAT
 ACAAAGTGTAGCCTTCTTCCAA

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0014]

Figura 1 es un gráfico que muestra el desempeño de SILV, GDF15 y L1CAM distinguiendo las lesiones benignas y malignas de piel.
 Figura 2 es un gráfico de la sensibilidad versus especificidad de SILV, GDF15 y L1CAM distinguiendo melanomas inequívocos y nevos benignos.
 Figura 3 es un gráfico del desempeño de SILV distinguiendo entre melanomas y nevos atípicos.
 Figura 4 es un gráfico de la sensibilidad versus especificidad de SILV distinguiendo melanomas inequívocos y nevos benignos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0015] La presente invención proporciona métodos para identificar cualitativa y cuantitativamente un melanoma, como se define en las afirmaciones. También se descubren aquí los métodos para distinguir un melanocito maligno de un melanocito benigno; diagnosticar lesiones melanocíticas con rasgos patológicos inciertos; y determinar un protocolo de tratamiento para el paciente con melanoma. Los métodos proporcionan ayudas en pronóstico del paciente, monitorización del paciente y desarrollo de medicamentos. Los métodos se basan en evaluar y medir los niveles de expresión de SILV (me20m) como un marcador final para los ensayos de biopsia del melanoma donde cierto nivel de expresión genética, en relación con el control de la normalización de TYR, es indicativo de la presencia de un melanocito maligno en la muestra evaluada.

[0016] La presente invención se enfoca en la utilidad de marcadores identificados de expresión genética para diagnosticar el melanoma maligno entre varias lesiones de piel, incluyendo lesiones con rasgos morfológicos inciertos o lesiones melanocíticas primarias sospechosas denominadas casos equívocos usado tejidos embebidos en parafina ("FFPE"). Esta situación es donde ocurren discrepancias entre las opiniones de los dermatopatólogos. Así, la utilidad de esta invención es identificar marcadores de expresión genética que diferencian lesiones de piel melanocítica benigna de melanomas primarios en pruebas de expresión genética, basadas en RT-PCR, para el diagnóstico de melanoma en lesiones sospechosas.

[0017] Se aisló el RNA total de 47 melanomas primarios, 48 nevos de piel benignos y 98 nevos atípicos/sospechosos incluyendo 48 nevos atípicos y se analizaron 50 muestras de tejido de melanomas (asignados por dermatopatólogos) usando RT-PCR. La expresión genética diferencial de tres genes específicos de melanoma, SILV, GDF15, y L1CAM, se evaluó con una prueba de RT-PCR cuantitativa de un paso en melanomas, nevos benignos y muestras de piel atípicas/sospechosas. Los resultados demostraron la capacidad de usar SILV como un marcador final para diferenciar muestras de tejido clínicamente relevantes que contienen melanocitos benignos o malignos.

[0018] Microdisposiciones de cADN y oligonucleótidos de alta densidad permiten la monitorización simultánea de la expresión de miles de genes. La tecnología de microdisposición proporciona una medición cuantitativa de abundancia de mRNA y ha ganado aceptación como herramienta para el descubrimiento de marcadores basada en la expresión genética. En el contexto de la investigación en cáncer, el análisis de microdisposición ha identificado que se expresan diferencialmente en lesiones benignas y malignas para diferentes tipos de cáncer o que tienen significado pronóstico. Luo et al. (2001); Su et al. (2001); Henshall et al. (2003); and Wang et al. (2004). El primer perfil de expresión genética de melanoma maligno usó una microdisposición conteniendo sondas para 8,150 transcritos de mADN e identificaron genes que podrían estar asociados con una conducta agresiva del tumor. Bittner et al. (2000). Debido a que las muestras analizadas en su estudio no incluyeron tejidos que contenían melanocitos normales o benignos, los genes expresados de forma diferencial en melanoma maligno no se identificaron. En contraste con la piel normal, el contenido de melanocitos en los nevos benignos es cercano al del melanoma.

[0019] En otro estudio, se hibridizaron dos muestras agrupadas derivadas de melanomas o tejidos de nevos benignos a una disposición de cADN y se encontraron genes preferencialmente expresados en muestras derivadas de melanoma o nevos. Seykora et al. (2003). Otros investigadores usaron la hibridización sustractiva o análisis de bibliotecas SAGE generadas en líneas celulares de melanoma, para monitorizar la expresión genética en el melanoma. Hipfel et al. (2000); y Weeraratna (2004). Recientemente, la comparación de los perfiles de expresión genética de algunas líneas celulares de melanoma y células melanocíticas condujo a la identificación de genes expresados de forma diferencial y vías moduladas en el melanoma. Hoek et al. (2004). Aunque estos estudios proporcionan una base sólida para la genómica del melanoma, no hay un marcador que pueda diferenciar claramente

al melanoma del tejido benigno. Varios marcadores actualmente usados tales como tirosinasa, HMB-45, mart-a/Melanin-a y MITF no han probado tener valor pronóstico para la identificación del tumor melanocítico Phsie etal. (2008) En consecuencia, estos marcadores han encontrado un uso clínico limitado.

5 **[0020]** Como se muestra en la Patente de Estados Unidos Publicación No. 20070154889, se demostró que la PCR tiene suficiente especificidad y sensibilidad para detectar las metástasis del melanoma. En la presente invención, se proporciona un método con mejor desempeño diagnóstico diferenciando el melanoma de lesiones no melanomatosas de biopsias primarias de piel. El ensayo de la invención es útil diagnosticando lesiones claras, o inequívocas, de las sospechosas o equívocas. Así, la invención instantánea puede encontrar utilidad particular evaluando muestras tisulares en etapa temprana. Preferiblemente, una medición de probabilidad distinguirá los tejidos que tienen melanoma en relación con los melanocitos benignos o el tejido normal.

15 **[0021]** Los métodos de la invención emplean una técnica rápida para extraer ácidos nucleicos de muestras de tejidos FFPE y un método para amplificar y detectar fragmentos de ácidos nucleicos indicativos de melanoma en lesiones primarias de piel. Los fragmentos de ácidos nucleicos miden cualitativa y cuantitativamente el mRNA codificado por el gen marcador. Las muestras tisulares incluyen lesiones de piel derivadas de biopsias por punción, aguja, escisionales o por hojilla. Los métodos proporcionados aquí permiten la detección del melanoma en muestras primarias de biopsias de piel permitiendo que un médico determine si debe implementar inmediatamente un protocolo de tratamiento apropiado para la enfermedad en etapa temprana. En los métodos de la invención, es importante tomar una muestra adecuada del tejido usado para conducir el estudio. Esto incluye la escisión y procesamiento apropiados de la muestra tisular, así como la extracción del RNA. Una vez obtenidas, es importante procesar las muestras tisulares apropiadamente de forma que se detecte cualquier célula cancerosa presente.

25 **[0022]** En un método de la invención, se aísla RNA de un bloque de muestra tisular FFPE. Puede usarse un kit comercial idóneo de parafina, como High Pure RNA Paraffin Kit de Roche (Cat. #3270289). Preferiblemente, las muestras FFPE se seccionan de acuerdo con el tamaño del tumor embebido como sigue: ≤ 2 a 5 mm seccionado a 9 x 10 mm; ≥ 6 a 8 mm seccionado a 6 x 10 mm. Las secciones son deparafinadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el RNA aislado puede almacenarse en agua libre de RNase a -80° C.

30 **[0023]** En el caso de medir los niveles de mRNA para determinar la expresión genética, los ensayos pueden ser por cualquier método conocido por los expertos en la materia e incluyen métodos tales como la Amplificación en Círculo Rodante (RCA), Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR), Amplificación por Desplazamiento de la Hebra (SDA), Amplificación Basada en la Secuencia de Ácido Nucleico (NASBA), y otros. El diagnóstico molecular rápido involucrado es más preferiblemente métodos cuantitativos por PCR, incluyendo QRT-PCR. La detección puede ser por cualquier método conocido por expertos en la materia incluyendo microdisposiciones, chips genéticos y fluorescencia.

40 **[0024]** Una PCR típica incluye múltiples pasos de amplificación, o ciclos que amplifican selectivamente especies albo de ácido nucleico. Una PCR típica incluye tres pasos: un paso denaturalizante en el cual un ácido nucleico se denaturaliza; un paso de recocido en el cual un grupo de cebadores de PCR (cebadores hacia delante y a la inversa) se acoplan a hebras de ADN complementario; y un paso de elongación en el cual una ADN polimerasa termostable elonga los cebadores. Repitiendo este paso múltiples veces, un fragmento de ADN se amplifica para producir un amplicon, correspondiente a la secuencia albo de ADN. La PCR típica incluye 20 o ciclos más de desnaturalización, recocido y elongación. A menudo, los pasos de recocido y elongación pueden realizarse concomitante, en cuyo caso el ciclo contiene solo dos pasos.

50 **[0025]** En una representación de la invención, la reacción de amplificación de RT-PCR puede ser conducida en un tiempo de forma que las duraciones de cada uno de estos pasos pueden estar en el rango de segundos, en vez de minutos. Específicamente, con ciertos nuevos cicladores térmicos que son capaces de generar una aceleración térmica de al menos unos $5C^{\circ}$ por segundo, se usan amplificaciones de RT-PCR en 30 minutos o menos. Más preferiblemente, las amplificaciones se conducen en menos de 25 minutos. Con esto en mente, los siguientes tiempos proporcionados para cada paso del ciclo de PCR no incluyen tiempos de aceleración. El paso de denaturación puede conducirse por tiempos de 10 segundos o menos. De hecho, algunos cicladores térmicos tienen ajustes para "0 segundos" la cual puede ser la duración óptima del paso de denaturación. Es decir, es suficiente que el ciclador térmico alcance la temperatura de denaturación. Los pasos de recocido y elongación son más preferiblemente menores de 10 segundos cada uno, y cuando se conducen a la misma temperatura, la combinación del paso recocido/elongación puede ser menor de 10 segundos. Algunos métodos de detección de sonda homogénea pueden requerir un paso separado para la elongación para maximizar el desempeño de la prueba rápida. Para minimizar el tiempo de amplificación total y la formación de reacciones colaterales inespecíficas, las temperaturas de recocido están típicamente por encima de $50^{\circ}C$. Más preferiblemente las temperaturas de recocido están por encima de $55^{\circ}C$.

60 **[0026]** Una sola reacción combinada para la RT-PCR, sin intervención del experimentador, es deseable por varias razones:

65 (1) menor riesgo de error del experimentador; (2) menor riesgo de contaminación del producto albo; y (3) mayor velocidad del ensayo. La reacción puede consistir en una o dos polimerasas. En el caso de dos polimerasas, una de

estas enzimas es una ADN polimerasa basada en RNA (trascriptasa inversa) y una es una ADN polimerasa termostable basada en ADN. Para maximizar el desempeño de la prueba, es preferible emplear una forma de tecnología de "arranque en caliente" para ambas funciones enzimáticas. Las Patentes US 5,411,876 y 5,985,619 proporcionan ejemplos de diferentes abordajes de "arranque en caliente". Los métodos preferidos incluyen el uso de uno o más métodos de termoactivación que secuestran uno o más de los componentes requeridos para una polimerización eficiente del ADN. Las Patentes US 5,550,044 y 5,413,924 describen métodos para preparar reactivos para el uso en tales métodos. La Patente US 6,403,341 describe un abordaje de secuestro que implica la alteración química de uno de los componentes reactivos de la PCR. En la representación más preferida, ambas actividades polimerasas dependientes de RNA y ADN residen en una sola enzima. Otros componentes que se requieren para una amplificación eficiente incluyen trifosfatos de nucleósidos, sales divalentes y componentes amortiguadores. En algunos casos, estabilizadores no específicos de ácidos nucleicos y enzimas pueden ser beneficiosos.

[0027] En la RT-PCR preferida, las cantidades de ciertas trascriptasas inversas y los componentes de la PCR son atípicos para tomar ventaja de los tiempos de aceleración más rápidos de algunos cicladores térmicos. Específicamente, las concentraciones del cebador son muy altas.

[0028] Las concentraciones típicas del cebador específico del gen para las reacciones de la trascriptasa inversa son menores de 20 nM. Para lograr una reacción de trascriptasa inversa rápida del orden de uno a dos minutos, la concentración del cebador de trascriptasa inversa se eleva a más de 20 nM, preferiblemente al menos 50 nM, y típicamente 100 nM. Las concentraciones estándar del cebador de PCR están entre 100 nM y 300 nM. Pueden usarse concentraciones mayores en la PCR estándar para compensar las variaciones de Tm. Sin embargo, para los propósitos aquí, las concentraciones referenciadas del cebador son para circunstancias donde no se necesita compensación de Tm. Concentraciones proporcionalmente mayores de cebadores pueden determinarse empíricamente y usarse si la compensación de Tm es necesaria o deseable. Para lograr una PCR rápida, las concentraciones del cebador de PCR son mayores de 250 nM, preferiblemente mayores de 300 nM y típicamente de 500 nM.

[0029] Los diagnósticos comercialmente usados también emplean preferiblemente uno o más controles positivos internos que confirman la operación de una reacción de amplificación particular en caso de un resultado negativo. Causas potenciales de resultados falsos negativos que deben controlarse en una RT-PCR incluyen: cantidad inadecuada de RNA, degradación del RNA, inhibición de la RT o de la PCR y error del experimentador.

[0030] En el caso de medir los niveles de proteína para determinar la expresión genética, cualquier método conocido por la técnica es idóneo en tanto resulte en una especificidad y sensibilidad adecuadas. Por ejemplo, los niveles de proteína pueden medirse uniendo un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para la proteína y midiendo la cantidad de proteína unida al anticuerpo. Los anticuerpos pueden ser etiquetados con reactivos radiactivos, fluorescentes u otros detectables para facilitar la detección. Los métodos de detección incluyen, sin limitación, ensayo inmunosorbente unido a enzima (ELISA) y técnicas de inmunomancha.

[0031] La invención proporciona una especificidad y sensibilidad suficientes para identificar un melanocito maligno en una muestra de tejido. Los métodos determinan la expresión de un gen marcador particular, SILV, midiendo el mRNA codificado por el marcador. Los resultados presentados aquí muestran que SILV es un marcador importante demostrando una clara discriminación entre el melanoma y casos benignos inequívocos así como entre subgrupos de diferente atipia en muestras de grupo de tejido sospechoso. El marcador SILV se define aquí como el gen que codifica cualquier variante, alelo, etc., incluyendo la SEQ ID NO: 1-3.

[0032] En los métodos de la invención, la tirosinasa se usa como un gen control para demostrar la presencia de melanocitos en la muestra de tejido y normalizar el contenido melanocítico. La tirosinasa es descrita por Mandelcorn-Monson et al. (2003); y la Patente US No. 6,153,388 y está representada por la Adhesión No. NM_000372. La tirosinasa también es definida como el gen que codifica el mRNA reconocido por el ensayo ABI a demanda (Hs00165976_m1) con el amplicon PCR SEQ ID NO: 14.

[0033] La especificidad de cualquier diagnóstico molecular basado en amplificación se basa alta, pero no exclusivamente, en la identidad de los juegos de cebadores. Los juegos de cebadores son pares de cebadores oligonucleotídicos hacia delante y en reversa que se acoplan a una secuencia alba de ADN para permitir la amplificación de la secuencia alba, produciendo así un amplicon específico de la secuencia alba. Los cebadores deben poder amplificar los marcadores de la enfermedad de interés. En el caso de la invención de este caso, el marcador está dirigido al melanoma.

[0034] La reacción también debe contener algún medio de detección de una señal específica. Esto se logra preferiblemente a través del uso de un reactivo que detecta una región de la secuencia de ADN derivada de la polimerización de la secuencia alba de interés. Los reactivos preferidos para la detección dan un diferencial de señal medible cuando se une a una secuencia de ácido nucleico específica de interés. A menudo, estos métodos involucran sondas de ácidos nucleicos que dan una fluorescencia aumentada cuando se unen a la secuencia de interés. Típicamente, el progreso de las reacciones de los métodos de la invención se monitoriza analizando las tasas relativas de la producción de amplicon para cada juego de cebadores de PCR.

[0035] La invención además incluye el uso de juegos de cebadores/sondas en los métodos afirmados, donde las secuencias IDs son: SEQ, ID NOs.: 1-3. Monitorizar la producción del amplicon puede lograrse con algunos reactivos y métodos de detección, incluyendo sin limitación los cebadores fluorescentes y sondas fluorogénicas y tintes fluorescentes que se unen al ADN de doble hebra. También pueden usarse balizas moleculares, Scorpions y otros esquemas de detección. Un método común para monitorizar una PCR emplea una sonda de hidrólisis fluorescente. Este método explota la actividad 5' nucleasa de ciertas ADN polimerasas termostables (como Taq o Tfl ADN polimerasas) para clivar una sonda oligomérica durante el proceso de la PCR.

[0036] Se muestran aquí los amplicones obtenidos por métodos de PCR utilizados en los métodos de la invención. Estos amplicones incluyen las secuencias: SEQ. ID Nos: 11-14.

[0037] El oligómero es seleccionado para acoplarse a la secuencia albo amplificada bajo condiciones de elongación. La sonda tiene un reportero fluorescente en su extremo 5' y un apagador fluorescente del reportero en el extremo 3'. En tanto el oligómero esté intacto, la señal fluorescente del reportero está apagada. Sin embargo, cuando el oligómero es digerido durante el proceso de elongación, el reportero fluorescente ya no está en proximidad con el apagador. La acumulación relativa del reportero fluorescente libre para un amplicon dado puede compararse con la acumulación de los mismos amplicones para una muestra control o con un gen control, como, sin limitación, β -Actina o PBGD para determinar la abundancia relativa de un producto cADN de un RNA en una población de RNA. Los productos y reactivos para la sonda de hidrólisis fluorescente están comercialmente disponibles, por ejemplo en Applied Biosystems.

[0038] Los reactivos de detección más preferidos son sondas TaqMan® (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ) y se describen en las patentes US 5,210,015; 5,487,972; y 5,804,375. Esencialmente, estas sondas involucran la detección de ácidos nucleicos en virtud de la separación de una combinación fluor-apagador en una sonda a través de la actividad 5'-3' exonucleasa de la polimerasa usada en la PCR. Puede usarse cualquier fluoróforo para cualquiera de los marcadores o controles. Tales fluoróforos incluyen, sin limitación, Texas Red, Cal Red, Fam, Cy3 y Cy5. En una representación, los siguientes fluoróforos corresponden a los marcadores notados: PLAB: Fam; L1CAM: Texas Red o Cal Red, tirosinasa: C1; PBGD: Cy5. El equipo y el software también están disponibles para controlar y monitorizar la acumulación de amplicones en la PCR y QRT-PCR incluyendo el termociclador comercial Smart Cycler disponible a través de Cepheid of Sunnyvale, California, y el Sistema de Detección de Secuencia ABI Prism 7900, disponible comercialmente en Applied Biosystems.

[0039] En la comercialización de los métodos descritos para QRT-PCR ciertos kits para la detección de ácidos nucleicos específicos son particularmente útiles. En una representación, el kit incluye reactivos para amplificar y detectar marcadores. Opcionalmente, el kit incluye reactivos de preparación de muestra o artículos (p.ej., tubos) para extraer ácidos nucleicos del tejido del ganglio linfático. Los kits también pueden incluir artículos para minimizar el riesgo de contaminación de la muestra (p.ej., escarpelo desechable y campo para la disección y preparación del ganglio linfático).

[0040] En un kit preferido, se incluyen los reactivos necesarios para el proceso de QRT-PCR de un tubo descrito antes como la transcriptasa inversa, un cebador de transcriptasa inversa, un juego de cebador PCR correspondiente (preferiblemente para marcadores y controles), una ADN polimerasa termostable, tal como Taq polimerasa y un reactivo de detección idóneo, tal como, sin limitación, una sonda scorpion, una sonda para una prueba con sonda de hidrólisis fluorescente, una baliza molecular, un cebador de tinte único o un tinte fluorescente específico del ADN de doble hebra, como el bromuro de etidio. Los cebadores están preferiblemente en cantidades que rinden las altas concentraciones descritas antes. Las ADN polimerasas termostable están disponibles común y comercialmente a partir de una variedad de fabricantes. Los materiales adicionales en el kit pueden incluir; tubos idóneos de reacción o viales, una composición de barrera, típicamente un lecho de cera, incluyendo opcionalmente magnesio; mezclas de reacción (típicamente 10X) para las etapas de transcriptasa inversa y de PCR, incluyendo los amortiguadores y reactivos necesarios tales como dNTPs; agua libre de nucleasa o RNasa; inhibidor de RNasa; ácidos nucleicos control o cualquier amortiguador, compuestos, cofactores, constituyentes iónicos, proteínas y enzimas, polímeros, etc., adicionales que pueden usarse en las etapas de transcriptasa inversa o PCR de la QRT-PCR. Opcionalmente, los kits incluyen reactivos y materiales para la extracción de ácido nucleico. Las instrucciones también se incluyen preferiblemente en los kits.

Ejemplo 1

Características Clínicas y Patológicas del Paciente

[0041] Se seleccionaron 204 muestras de tejido de biopsia de piel en FFPE de pacientes con lesiones melanocíticas primarias de piel diagnosticadas en el Hospital Universitario de Georgetown. La serie de pacientes incluyeron muestras con 102 rasgos inequívocos de melanoma invasivo o nevos benignos y 102 muestras con varios grados de atipia celular. Estas muestras atípicas se clasificaron inicialmente como sospechosas/atípicas y posteriormente fueron resueltas por dermatopatólogos expertos como nevos atípicos o melanoma maligno. Dos muestras de pacientes fueron excluidas debido a una cantidad insuficiente de RNA (menos de 350 ng) luego de un paso de

preparación de la muestra. Se excluyeron nueve muestras adicionales de RNA debido a la falla del control de PCR. La muestra final elegible para el análisis consistió en 193 tejidos de biopsia (95% de la muestra original) representando 47 melanomas, 48 nevos benignos y 98 atípicos/sospechosos, incluyendo 48 nevos atípicos y 50 melanomas asignados por dermatopatólogos. Un resumen de las características clínicas y patológicas de las muestras de melanoma se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1.

Características del Paciente	Melanoma Avanzado	Melanoma	Atipia Severa	Atipia Moderada	Nevos Benignos
Promedio de Edad	59	51	42	440	42
Sexo					
Mujeres	8	35	20	8	33
Hombres	6	48	15	5	15
Estadio T (grosor)					
Tis		21			
T1 (< 1 mm)	1	62			
T2 (1.01 - 2 mm)	7				
T3 (2.01 - 4 mm)	3				
T4 (> 4 mm)	1				
M	2				

(continúa)

5	Características del Paciente	Melanoma Avanzado	Melanoma	Atipia Severa	Atipia Moderada	Nevos Benignos
	Diagnóstico					
10	Diseminación superficial melanoma	6	50			
	Melanoma nodular	5				
15	Melanoma in situ		21			
	Lentigo maligno		11			
	Melanoma otro	3	1			
20	Nevo compuesto					31
	Nevo compuesto inflamado					13
25	Nevo intradérmico					4
	Nevo atípico atipia severa			2		
30	Nevo compuesto severo atipia			29		
	Nevo compuesto moderado atipia				13	
35	Nevo severo atipia de la unión			4		
	n total por categoría	14	83	35	13	48
40						
	Melanoma inequívoco, n=47	12	35			
45	Melanoma atípico, n=50	2	48			
	Benigno inequívoco, n=48					48
50	Nevos atípicos, n=48			35	13	

[0042] Las muestras se ordenaron de los casos más benignos a los casos más malignos, según los datos clínicos proporcionados por patología. Usando un diagnóstico histológico, se crearon cinco categorías mayores: melanoma avanzado, melanoma, atipia severa, atipia moderada y nevos benignos, ajustando cada una de las 193 muestras a uno de estos grupos. El melanoma lentigo maligno, melanoma *in situ* y los melanomas invasivos superficiales se combinaron en una sola categoría de melanoma. Dos grupos de melanomas con rasgos avanzados (diseminación superficial con T2 y más y nodulares o metastásicos) se agregaron a un grupo de melanoma avanzado. Una clasificación binaria se basó en dividir los melanomas avanzados y los melanomas en malignos, y las clases restantes en benignas. Esta estratificación contenía 97 casos malignos con 47 lesiones inequívocas y 50 severamente atípicas clasificadas como melanomas, y 96 casos benignos representando 48 nevos benignos y 48 nevos atípicos. El análisis de todos los datos posteriores se presenta para los casos inequívocos clasificados en uno de los 3 grupos: melanoma avanzado, melanoma y benignos y para los casos equívocos en uno de los 4 grupos: melanoma avanzado, melanoma, atipia severa y moderada.

65

Ejemplo 2**Preparación del Tejido**

5 **[0043]** Se recolectaron doscientas cuatro muestras de individuos con diagnóstico de lesiones de piel melanocíticas primarias. Las muestras se recolectaron usando biopsia escisional, por pinchazo o por raspado dependiendo del tamaño de la lesión, profundidad y juicio del médico y se incluyeron en bloques de FFPE.

10 **[0044]** El RNA total se aisló de los bloques de FFPE usando un kit de parafina High Pure estándar de RNA Roche (catálogo # 3270289) con las siguientes modificaciones. Las muestras de tejido incluido en parafina se seccionaron de acuerdo con el tamaño de tumor incluido (2-5 mm o menos= 9 x 10 mm, 6-8 mm o más= 6 x 10 mm). Las secciones fueron deparafinadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA aislado se almacenó en agua libre de RNasa a -80° C hasta usarse.

15 **[0045]** La distribución según tipo de biopsia y producción de RNA extraído se presentan en las Tablas 2a y 2b, respectivamente. La mediana de las producciones de RNA, correspondientes a un promedio total de 10.5, 4.5 y 6 láminas fueron equivalentes entre los tres tipos de biopsias. No se observó sesgo en el desempeño de la prueba basado en las diferencias en las técnicas de biopsia.

20

Tabla 2a

Diagnóstico Patológico	Escisión	Pinchado	Raspado	Total
Melanoma	21	7	23	51
Benigno	6	4	41	51
Atípico/Sospechoso	39	22	41	102
Total	66 (32%)	33 (16%)	105 (52%)	204 (100%)

25

30

Tabla 2b

Tipo de Biopsia	Número (%)	Mediana del Tamaño	Sección #	Mediana de la Producción de RNA (ng)	Rango (ng)
Escisión	66 (32)	13x10.5x8	3-6	1360.6	496-26879
Pinchazo	33 (16)	8x7x3	6	1534.1	397-7368
Raspado	105 (52)	7x6x1.5	9-12	1400.4	318-12140

35

Ejemplo 3**Pruebas de un solo paso de qRT-PCR Usando cebadores específicos de RNA y Establecimiento del Punto de Corte**

45 **[0046]** La evaluación de la expresión de genes seleccionados se llevó a cabo con RT-PCR de un paso con RNA de tejido con melanoma, nevos benignos y atípico/sospechoso en FFPE. Las muestras incluyeron dos series: 1) casos inequívocos, o claros, de melanoma y benignos y 2.) muestras con varios grados de atipia. Se usó Tirosinasa ("TYR") como gen organizador para controlar la cantidad y calidad de la entrada de RNA en las reacciones. No se usó tratamiento con ADNsa. Más bien, se diseñaron cebadores o sondas para que ahorraran un intrón de forma que no reportarían el ADN genómico. Todos los juegos de cebador/sonda se preevaluaron en un grupo de 20 muestras de RNA aisladas de 10 tejidos con melanoma y 10 tejidos con nevos benignos en FFPE de un proveedor comercial (Oncomatrix). Se seleccionó el juego de cebador-sonda de mejor desempeño para cada uno de los cuatro marcadores. Las secuencias se enumeran en la Tabla 3 a continuación.

50

55 **[0047]** Se evaluaron los marcadores de expresión genética GDF-15, SILV, y L1CAM junto con la tirosinasa de control de normalización ("TYR") en la biopsia de melanoma usando un solo formato de reacción RT-PCR en la plataforma ABI7900. Las pruebas de un paso de qRT-PCR se corrieron de acuerdo con el siguiente protocolo. Se usaron 50 ng de RNA total para qRT-PCR. El RNA total fue sometido a transcryptasa inversa usando la mezcla de 40X Multiscribe e inhibidor de RNasa contenida en el Kit de Reactivos TAQMAN® One Step PCR Master Mix Reagents Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Luego el cADN fue sometido a la 2x Master Mix usando UNG y la amplificación de la PCR se llevó a cabo en el Sistema de Detección de Secuencia ABI 7900 HT (Applied Biosystems, Foster City, CA) en el formato de 384 platillos usando un tamaño de reacción de 10µl. Cada reacción estaba compuesta por 5.0 ml de Mezcla Maestra 2X One Step RT-PCR, 0.5 µl de mezcla cebador/sonda, 0.25 µl de enzima 40X Multiscribe, y

60

Mezcla Inhibitoria RNasa, 0.25 µl de dNTP y 4 ml de 12.5 ng/µl de RNA total. La mezcla cebador/sonda final estaba compuesta por una concentración final de 900 nM de cebadores hacia delante y en reversa, enumerados en la Tabla 3, y 250 nM de sonda fluorescente. La mezcla de dNTP contenía una concentración final de 20 mM de cada uno de dATP, dGTP, dCTP, y dTTP. La mezcla de reacción se incubó a 48° C para 30 min. para la transcripción inversa, seguida por un paso de activación Amplitaq de 95° C por 10 minutos y finalmente 40 ciclos de 95° C por 15 seg. de denaturalización y 60° C por 1 minuto de acoplamiento y extensión. Las secuencias usadas en las reacciones fueron las siguientes, cada una escrita en la dirección 5' a 3'.

Tabla 3

Símbolo	Cebador/Sonda	Secuencia	ID. No.
GDF15	Hacia delante	CGCCAGAAGTGCGGCT	5
	Inversa	CGGCCCGAGGATACGC	6
	Sonda MGB	FAM-ATCCGGCGGCCAC	7

(continúa)

Símbolo	Cebador/Sonda	Secuencia	ID. No.
L1CAM	Hacia delante	ACTATGGCCTTGTCTGGGATCTC	8
	Inversa	AGATATGGAACCTGAAGTTGCACTG	9
	Sonda MGB	FAM-CACCATCTCAGCCACAGC	10
SILV	Hacia delante	AGTTATCATGCCTGGTCAA	1
	Inversa	GGGTACGGAGAAGTCTTGCT	2
	Sonda	FAM-AGGTTCCGCTATCGTGGGCAT-BHQ1	3
TYR	ABI AoD*	Hs00165976_m1	4

[0048] Para cada muestra se calculó $\Delta Ct = Ct(\text{Gen Albo}) - Ct(\text{TYR})$. ΔCt se ha usado ampliamente en las pruebas clínicas de RT-PCR y se escogió como un método sencillo. Cronin et al. (2004).

[0049] Los valores de Ct obtenidos con los archivos de salida de ABI7900 se usaron para el análisis de datos. En la configuración de prueba de una sola reacción, se analizaron solo las muestras que generaron TYR Ct < 30. Se presentan los valores de Ct para cada uno de los marcadores como Cts crudos normalizados contra el marcador específico de melanocitos, TYR, usando la siguiente ecuación:

$$Ct(\text{normalized}) = Ct(\text{marker}) - Ct(\text{TYR})$$

El diagnóstico producido por la prueba se comparó con el examen dermatopatológico. Para estimar el desempeño de la prueba, se calcularon los valores AUC basados en el análisis de la curva ROC usando el paquete de software R versión 2.5.0. (team RDC www.r-project.org).

[0050] Para los casos claros (inequívocos), se demostró una mayor expresión en melanoma comparado con las lesiones benignas para los tres marcadores específicos de melanoma (Tabla 4, Figura 1a). Se observó una expresión diferencial significativa para SILV y GDF15 entre nevos benignos y muestras de melanoma en los casos claros (inequívocos) (2.8 y 1.2 veces con valores de p < 0.001 y 0.003, respectivamente). Sin embargo, L1CAM demostró una mucho menos diferenciación con un cambio de 0.2 veces sin significancia estadística para la diferencia (p=0.47) entre los casos benignos y malignos claros (Figura 1). Así, este marcador se excluyó del análisis posterior. SILV demostró el mejor desempeño con una respuesta lineal a través de los tres grupos de pacientes (melanoma avanzado, melanoma y casos benignos), representando cambios continuamente cambiantes del estado de enfermedad definido por la patología.

Tabla 4

Marcador Normalizado para TYR	Melanoma Avanzado	Melanoma	Nevos Benignos	Valores de p (benignos vs malignos)	AUC (clasificación como benignos o malignos)
L1CAM	6.85	7.5	7.66	0.47	0.49
SILV	1.18	2.09	4.93	<0.001	0.94
GDF15	5.02	7.17	8.34	0.003	0.67

[0051] El desempeño de SILV y GDF15 se evaluó para la diferenciación entre los melanomas inequívocos y nevos benignos usando un análisis de curva ROC univariado. Como se muestra en la Figura 2, los valores de AUC fueron 0.94 y 0.67, respectivamente. Según el análisis multivariado con un modelo de regresión lineal, la combinación de SILV y GDF15 no mejoró el desempeño de la prueba más allá del AUC de 0.94 en los casos inequívocos. Por tanto, no se procuró GDF15 para el análisis posterior de los sospechosos (casos equívocos). Finalmente, la normalización a TYR mejoró el desempeño de SILV a 0.94 comparado con 0.78 cuando se usan los valores de Ct crudos.

[0052] El desempeño de SILV se evaluó comparando los casos sospechosos con los casos benignos inequívocos. La ΔCt promedio de SILV en las muestras equívocas en cada una por histología, excluyendo el melanoma avanzado debido a que $n=2$, se comparó con la ΔCt promedio del grupo benigno inequívoco. Los valores promedio de ΔCt y valores de p para las comparaciones de las pruebas t con las muestras benignas inequívocas se enumeran en la Tabla 5 a continuación. SILV era significativamente diferente entre el grupo sospechoso de melanoma y cada grupo sospechoso de atipia: melanoma versus atipia severo con una $p=0.0077$ y melanoma vs. atipia moderada con una $p=0.0009$.

[0053] Las Figuras 1 a 4 confirman que SILV es el marcador principal y demostró una clara discriminación entre los casos de melanoma y benignos equívocos así como entre los diferentes subgrupos con atipia en el grupo sospechoso de muestras de tejido.

Tabla 5

Marcador Normalizado a TYR	Valores Normalizados de ΔCt				Valores de p		
	Melanoma	Atipia Severa	Atipia Moderada	Benignos Inequívocos	Benignos vs Moderados	Benignos vs Severos	Benignos vs Melanoma
SILV	1.7	2.49	3.15	4.93	0.002	3.35E-09	9.98E-16

[0054] Desde una perspectiva dermatopatológica, no hay un solo criterio para determinar si una lesión pigmentada es un nevo severamente atípico o ha alcanzado el umbral del melanoma. Los dermatopatólogos lidian al menos con 10 rasgos histológicos separados. Ningún marcador inmunohistoquímico puede distinguir entre las proliferaciones benignas de las malignas tampoco.

[0055] La invención aquí presenta una prueba de biopsia de melanoma con un mejor desempeño diagnóstico diferenciando el melanoma de las lesiones melanocíticas identificando y validando una firma genética específica del melanoma. Los resultados de la prueba demuestran un aumento progresivo en al menos dos genes que se expresan de forma diferente en el melanoma: SILV y GDF15. Sin embargo, según el análisis multivariado con un modelo de regresión lineal, la adición de GDF15 no mejoró el desempeño de SILV más allá del AUC de 0.94 en los casos claros. Por tanto, SILV está designado como el marcador final para la prueba de biopsia de melanoma. También se observó una diferencia significativa entre los nevos severamente atípicos y melanoma para SILV con una p de 0.0077 haciendo este marcador aplicable para el diagnóstico de los casos claros (inequívocos) y sospechosos (equívocos), siendo los últimos el reto más difícil para los patólogos expertos.

Tabla 6.

Descripciones de secuencia, Nombres y SEQ ID NOs					
SEQ ID No.	PSID Affymetrix	Símbolo de gen Nombre de secuencia,	Adhesión No.	Secuencia 5' - 3'	Nombre del gen en NCBI
1	209848_s_at	SILV Cebador hacia delante	NM_006928.3	AGCTTATCATGCCTGGTCA A	Homólogo plateado de Homo sapiens (ratón) (SILV), mRNA
2		SILV Cebador inverso		GGGTACGGAGAAGTCTTG CT	
3		Sonda SILV		FAM- AGGTTCCGCTATCGTGGG CAT-BHQ1	
4	206630_at	TYR ABI AoD*,	NM_000372.4	Hs00165976_m1	Tirosinasa de Homo sapiens (albinismo oculocutáneo)
5	221577_x_at	GDF15 Cebador hacia delante	NM_004864.1	CGCCAGAAGTGCGGCT	Factor de diferenciación del crecimiento de Homo sapiens 15 (GDF15), mRNA
6		GDF15 Cebador inverso		CGGCCCGAGAGATACGC	
7		GDF15 Sonda MGB		FAM-ATCCGGCGGCCAC	

(continúa)

Descripciones de secuencia, Nombres y SEQ ID NOs					
SEQ ID No.	PSID Affymetrix	Símbolo de gen Nombre de	Adhesión No.	Secuencia 5' - 3'	Nombre del gen en NCBI
8	204585_s_at	L1CAM Cebador hacia	NM_000425.2	ACTATGGCCTTGCTGGGA TCTC	Molécula de adherencia celular L1 de Homo sapiens, mRNA
9		L1CAM Cebador inverso		AGATATGGAACCTGAAGTT GCACTG	
10		L1CAM Sonda MGB		FAM- CACCATCTCAGCCACAGC	

Secuencias a **longitud completa** de 4 marcadores como se proporciona en la **base de datos** NCBI.

[0056]

5

>gi|113722118|ref|NM_000372.4| Tirosinasa de Homo sapiens (albinismo oculocutáneo IA) (TYR), mRNA

10

ATCACTGTAGTAGTAGCTGGAAAGAGAAATCTGTGACTCCAATTAGCCAGTTCCTGCAGACCTTGTGAGG
 ACTAGAGGAAGAATGCTCCTGGCTGTTTTGTACTGCCTGCTGTGGAGTTCCAGACCTCCGCTGGCCATT
 TCCCTAGAGCCTGTGTCTCCTCTAAGAACCTGATGGAGAAGGAATGCTGTCCACCGTGGAGCGGGGACAG
 GAGTCCCTGTGGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCTGTGTCAGAATATCCTTCTGTCCAATGCACCACTTGGG
 CCTCAATTTCCCTTCACAGGGGTGGATGACCGGGAGTCTGTGGCCTTCCGTCTTTTATAATAGGACCTGCC
 AGTGTCTGTGGCAACTTCATGGGATTCAACTGTGGAACTGCAAGTTTGGCTTTTGGGGACCAAACCTGCAC
 AGAGAGACGACTCTTGGTGAGAAGAAACATCTTCGATTTGAGTGCCCCAGAGAAGGACAAAATTTTTTGCC
 TACCTCACTTTAGCAAAGCATAACCATCAGCTCAGACTATGTCATCCCCATAGGGACCTATGGCCAAATGA
 AAAATGGATCAACACCCATGTTTTAAGCAGATCAATATTTATGACCTCTTGTCTGGATGCATTATTATGT
 GTCAATGGATGCACTGCTTGGGGGATCTGAAATCTGGAGAGACATTGATTTTGGCCATGAAGCACCAGCT
 TTTCTGCCTTGGCATAGACTCTTCTTGTGTGCGGTGGGAACAAGAAATCCAGAAGCTGACAGGAGATGAAA
 ACTTCACTATTCCATATTGGGACTGGCGGGATGCAGAAAAGTGTGACATTTGCACAGATGAGTACATGGG
 AGGTCAGCACCCCAAAATCCTAACTTACTCAGCCAGCATCATTTCTCTCTTGGCAGATTGTCTGT
 AGCCGATTGGAGGAGTACAACAGCCATCAGTCTTTATGCAATGGAACGCCCGAGGGACCTTTACGGCGTA
 ATCCTGGAACCATGACAAATCCAGAACCCCAAGGCTCCCTCTCAGCTGATGTAGAAATTTGCCTGAG
 TTTGACCAATATGAATCTGGTTCCATGGATAAAGCTGCCAATTTTCAGCTTTAGAAATCACTGGAAGGA
 TTTGCTAGTCCACTTACTGGGATAGCGGATGCCTCTCAAAGCAGCATGCACAATGCCTTGCACATCTATA
 TGAATGGAACAATGTCCAGGTACAGGGATCTGCCAACGATCCTATCTCCTTCTTCCATGCATTTGT
 TGACAGTATTTTTGAGCAGTGGCTCCGAAGGCACCGTCTCTTCAAGAAGTTTATCCAGAAGCCAATGCA
 CCCATTGGACATAACCGGGAATCCTACATGGTTCCTTTTATACCCTGTACAGAAATGGTGATTTCTTTA
 TTTTATCCAAAGATCTGGGCTATGACTATAGCTATCTACAAGATTCCAGCCAGACTCTTTTCAAGACTA
 CATTAAGTCTTATTTGGAACAAGCGAGTCGGATCTGGTTCATGGCTCCTTGGGGCGCGATGGTAGGGGCC
 GTCCTCACTGCCCTGCTGGCAGGGCTTGTGAGCTTGTGTGTCGTCACAAGAGAAAGCAGCTTCTGAAAG
 AAAAGCAGCCACTCCTCATGGAGAAAGAGGATTACCACAGCTTGTATCAGAGCCATTTATAAAAGGCTTA
 GGCAATAGAGTAGGGCCAAAAGCCTGACCTCACTCTAACTCAAAGTAATGTCCAGGTTCCAGAGAATA
 TCTGCTGGTATTTTTCTGTAAAGACCATTTGCAAAATTTGTAACCTAATACAAAGTGTAGCCTTCTTCCAA
 CTCAGGTAGAACACACCTGTCTTTGTCTTGTCTTTCCTCACTCAGCCCTTTTAAATTTTCCCCTAAGCCC
 ATATGTCTAAGGAAAGGATGCTATTTGGTAATGAGGAACTGTTATTTGTATGTGAATTAAAGTGTCTTTA
 TTTTAAAAAATTGAAATAAATTTTGTATTTTGCCTTCTGATTAATTTAAAGATCTATATATGTTTTATTGGC
 CCCTTCTTTATTTTAAATAAACAGTGAGAAATCTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA

15

20

25

30

35

40

>gi|153792494|ref|NM_004864.2| Factor 15 de diferenciación de crecimiento de Homo sapiens (GDF15), mRNA

45

AGTCCCAGCTCAGAGCCGCAACCTGCACAGCCATGCCCGGGCAAGAACTCAGGACGGTGAATGGCTCTCA
 GATGCTCCTGGTGTGTCTGGTGTCTCGTGGCTGCCGCATGGGGGCGCCCTGTCTCTGGCCGAGGCGAGC
 CGCGCAAGTTTCCCGGACCCTCAGAGTTGCACTCCGAAGACTCCAGATTCGAGAGTTGCGGAAACGCT
 ACGAGGACCTGTAAACCAGGCTGCCGGCCAACCAGAGCTGGGAAGATTCGAACACCGACCTCGTCCC
 CCCTGCAGTCCGGATACTCACGCCAGAAGTGCAGGCTGGGATCCGGCGGCCACCTGCACCTGCGTATCTCT
 CGGGCCGCCCTTCCCAGGGGCTCCCAGAGCCTCCCGCCTTACCAGGCTCTGTTCCGGCTGTCCCCGA
 CGGGCTCAAGGTCGTGGGACGTGACACGACCGCTGCCGGCTCAGCTCAGCCTTGCAAGACCCCAGGCGCC
 CGCGCTGCACCTGCGACTGTGCGCGCCGCGCTCGCAGTCGGACCAACTGCTGGCAGAATCTTTCGTCCGCA
 CGGCCCCAGCTGGAGTTGCACTTGCAGCCGCAAGCCGCCAGGGGGCGCCGAGAGCGCGTGCAGCGCAACG
 GGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGCTGTCACACGGTCCGCGCGTGTGGAAGACCT
 GGGCTGGGCGGATTTGGGTGCTGTGCGCCAGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCGTGCAGGAGC
 CAGTTCCGGGCGGCAAAATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCTGAAGCCGACACGGTGC
 CAGCGCCCTGCTGCTGCCCCGCGAGTACAATCCCATGGTGTCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTC
 GCTCCAGACCTATGATGACTTGTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGAGCAGTCCCTGGTCCCTTCCACTG
 TGCACTGCGCGGAGGACGCGACCTCAGTTGTCTGCCCTGTGGAATGGGCTCAAGGTTCTGAGACACC
 CGATTCCTGCCAAAACAGCTGTATTTATATAAGTCTGTTATTTATTAATTTATTTGGGGTGACCTTCT
 TGGGACTCGGGGCTGGTCTGATGGAAGTGTATTTATTTAAACTCTGGTGATAAAAAATAAAGCTGT
 CTGAACTGTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA

50

55

60

>gi|42542384|ref|NM_006928.3| Homólogo plateado (ratón) de Homo sapiens (SILV), mRNA

AGTGCCTTTGGTTGCTGGAGGGAAGAACAATGGATCTGGTGCATAAAAAGATGCCCTTCTTCATTTGGCT
 GTGATAGGTGCTTTGCTGGCTGTGGGGGCTACAAAAGTACCCAGAAAACCAGGACTGGCTTGGTGTCTCAA
 GGCAACTCAGAACCAAAAGCCTGGAACAGGCAGCTGTATCCAGAGTGGACAGAAGCCCAGAGACTTGACTG
 CTGGAGAGGTGGTCAAGTGTCCCTCAAGGTGAGTAAATGATGGGCTTACTGATTGGTGCAAAATGCCCTC
 5 TCTCTATTGCCCTGAACTTCCCTGGAAGCCAAAAGTATTGCCAGATGGGCAGGTTATCTGGGTCAACA
 ATACCATCATCAATGGGAGCCAGGTGTGGGGAGGACAGCCAGTGTATCCCCAGGAAACTGACGATGCCTG
 CATCTTCCCTGATGGTGGACCTTGCCCATCTGGCTCTGGTCTCAGAAGAGAAGCTTTGTTTATGTCTGG
 AAGACCTGGGGCCAACTACTGGCAAGTCTAGGGGGCCAGTGTCTGGGCTGAGCATTGGGACAGGCAGGG
 CAATGCTGGGCACACACACCATGGAAGTGAAGTGTCTACCATCGCCGGGGATCCCGGAGCTATGTGCCTCT
 10 TGCTCATTCCAGCTCAGCCTTACCATTACTGACCAGGTGCCTTTCCTCCGTGAGCGTGTCCAGTTGCGG
 GCCTTGGATGGAGGGAACAAGCATTCTGAGAAATCAGCCTCTGACCTTTGCCCTCCAGCTCCATGACC
 CCAGTGGCTATCTGGCTGAAGCTGACCTCTCCTACACCTGGGACTTTGGAGACAGTAGTGAACCCCTGAT
 CTCTCGGGCACTTGGTCACTCATACTTACCTGGAGCCTGGCCAGTCACTGCCAGGTGGTCTCTGCAG
 GCTGCCATCTCTACCTCCTGTGGCTCCTCCCCAGTTCAGGCAACCACAGATGGGCAAGGCAAGTCACTG
 15 CAGAGCCCCTAACACCACAGCTGGCCAAAGTGCCTACTACAGAAGTTGTGGGTACTACAGCTGGTCAAGC
 GCCAACTGCAGAGCCCTCTGGAACCACATCTGTGCAGGTGCCAACCCTGAAGTCATAAGCACTGCACCT
 GTGCAGATGCCAACTGCAGAGAGCACAGGTATGACACCTGAGAAGGTGCCAGTTTCAGAGGTGCATGGGTA
 CCACACTGGCAGAGATGTCAACTCCAGAGGCTACAGGTATGACACCTGCAGAGGTATCAATTGTGGTGTCT
 TTCTGGAACCACAGCTGCACAGGTAACAACACAGAGTGGGTGGAGACCACAGCTAGAGAGCTACCTATC
 20 CTTGAGCCTGAAGTCCAGATGCCAGTCAATCATGTCTACGGAAAGTATTACAGGTCCCTGGGCCCCC
 TGTGGATGGTACAGCCACCTTAAGGCTGGTGAAGAGACAAGTCCCCCTGGATTGTGTTCTGTATCGATA
 TGGTTCCTTTTCCGTACCCTGGACATTGTCCAGGGTATTGAAAGTGCAGGATCCTGCAGGCTGTGCCG
 TCCGGTGGAGGGGATGCATTTGAGCTGACTGTGTCTGCCAAGGCGGGCTGCCAAGGAAGCCTGCATGG
 AGATCTCATCGCCAGGTTGCCAGCCCTGCCAGCGCTGTGCCAGCCTGTGCTACCCAGCCAGCCTG
 25 CCAGCTGGTTCTGCACCAGATACTGAAGGGTGGCTCGGGACATACTGCCTCAATGTGTCTCTGGCTGAT
 ACCAACAGCCTGGCAGTGGTGCAGCACCAGCTTATCATGCCTGGTCAAGAAGCAGGCCTTGGGCAGGTT
 CGTGTATCGTGGGCATCTTGTGGTGTGATGGCTGTGGTCTTGCATCTCTGATATATAGGCGCAGACT
 TATGAAGCAAGACTTCTCCGTACCCAGTTGCCACATAGCAGCAGTCACTGGCTGCGTCTACCCCGCAT
 TTCTGCTCTTGTCCCATTTGGTGAAGATAGCCCCCTCCTCAGTGGGCAGCAGGTCTGAGTACTCTCATATG
 30 ATGCTGTGATTTTCTGGAGTTGACAGAAAACCTATATTTCCCCCAGTCTTCCCTGGGAGACTACTATT
 AACTGAAATAAATACTCAGAGCCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>gi|13435354|ref|NM_000425.2| Molécula de adherencia celular L1 de Homo sapiens (L1CAM), variante 1 del
 transcritto, mRNA

GCGCGGTGCCGCCGGGAAAGATGGTCTGGCGCTGCCGTACGTGTGGCCTCTCCTCCTCTGCAGCCCCCTG
 CCTGCTTATCCAGATCCCCGAGGAATATGAAGGACACCATGTGATGGAGCCACCTGTATCAGGAAACAG
 TCTCCACGGGCGCTGGTGTCTTCCCAACAGATGACATCAGCCTCAAGTGTGAGGGCCAGTGGCAAGCCCCG
 40 AAGTGCAGTTCCGCTGGACGAGGGATGGTGTCCACTTCAAACCCAAGGAAGAGCTGGGTGTGACCGTGT
 CCAGTGCAGCCACTCTGGCTCCTTACCATCACGGGCAACAACAGCAACTTTGCTCAGAGGTTCCAGGGC
 ATCTACCGCTGCTTTGCCAGCAATAAGCTGGGCACCGCCATGTCCCATGAGATCCGGCTCATGGCCGAGG
 GTGCCCCCAAGTGGCCAAAGGAGACAGTGAAGCCCTGGAGGTGGAGGAAGGGGAGTCACTGGTTCTGCC
 TTGCAACCCTCCCCAAGTGCAGAGCCTCTCCGGATCTACTGGATGAACAGCAAGATCTTGACATCAAG
 CAGGACGAGCGGGTGACGATGGGCCAGAACGGCAACCTCTACTTTGCCAATGTGCTCACCTCCGACAACC
 45 ACTCAGACTACATCTGCCACGCCACTTCCAGGCAACAGGACCATCATTCAGAAGGAACCCATTGACCT
 CCGGGTCAAAGGCCAACACAGCATGATTGACAGGAAGCCGCGCTCTTCCCCACCAACTCCAGCAGC
 CACTGGTGGCCTTGCAGGGGAGCCATTGGTCTGGAGTGCATCGCCGAGGGCTTTCCACGCCCCACCA
 TCAAATGGCTGCGCCCCAGTGGCCCCATGCCAGCCGACCGTGTACCTACCAGAACCACAACAAGACCCT
 GCAGCTGCTGAAAGTGGGCGAGGAGGATGATGGCGAGTACCGCTGCCCTGGCCGAGAACTCACTGGGCAGT
 50 GCCCCGCATGCGTACTATGTACCCGTGGAGGCTGCCCCGTAAGTGGCTGCACAAGCCCCAGAGCCATCTAT
 ATGGGCCAGGAGAGACTGCCCGCTGGACTGCCAAGTCCAGGGCAGGCCCAACCAGAGGTACCTGGGAG
 AATCAACGGGATCCCTGTGGAGGAGCTGGCCAAAGACCAGAAGTACCGGATTACGCGTGGCGCCCTGATC
 CTGAGCAACGTGCAGCCAGTGCACAAATGGTGAACCAATGTGAGGCCCCGCAACCGGCACGGGCTCTTGC
 TGGCCAATGCCTACATCTACGTTGTCCAGCTGCCAGCCAAGATCCTGACTGCGGACAATCAGACGTACAT
 55 GGCTGTCCAGGGCAGCACTGCCTACCTTCTGTGCAAGCCCTTCGGAGCGCCTGTGCCAGTGTTCAGTGG
 CTGGACGAGGATGGGACAACAGTGTTCAGGACGAACGCTTCTTCCCCATGCCAATGGGACCCTGGGCA
 TTCGAGACTCCAGGCCAATGACACCGGACGCTACTTCTGCCTGGCTGCCAATGACCAAAAACAATGTTAC
 CATCATGGCTAACCTGAAGGTTAAAGATGCAACTCAGATCACTCAGGGGCCCGCAGCACAATCGAGAAG
 AAAGGTTCCAGGGTACCTTACGTCAGGAGCCCTCTTGGACCCCTCCTTGCAGCCAGCATCACCTGGC
 60 GTGGGGACGGTGCAGACCTCCAGGAGCTTGGGGACAGTGACAAGTACTTCATAGAGGATGGGCGCCTGGT
 CATCCACAGCCTGGACTACAGCGACCAGGGCAACTACAGCTGCGTGGCCAGTACCGAAGTGGATGTGGT
 GAGAGTAGGGCACAGCTCTGGTGGTGGGGAGCCCTGGGCCGGTGCACGGCTGGTGTGTCCGACCTGC
 ACCTGCTGACGCAGAGCCAGGTGCCCGTGTCTGGAGTCTGCAGAAGACCACAATGCCCCATTGAGAA

ATATGACATTGAATTTGAGGACAAGGAAATGGCGCCTGAAAAATGGTACAGTCTGGGCAAGGTTCCAGGG
 AACCAGACCTCTACCACCCTCAAGCTGTGCCCCATGTCCACTACACCTTTAGGGTTACTGCCATAAACA
 AATATGGCCCCGGGAGCCCAGCCGGTCTCTGAGACTGTGGTCACACCTGAGGCAGCCCCAGAGAAGAA
 CCCTGTGGATGTGAAGGGGGAAGGAAATGAGACCACCAATATGGTCATCACGTGGAAGCCGCTCCGGTGG
 5 ATGGACTGGAACGCCCCCAGGTTTCAGTACCGCGTGCAGTGGCGCCCTCAGGGGACACGAGGGCCCTGGC
 AGGAGCAGATTGTGACGACCCCTTCCTGGTGGTGTCCAACACGTCCACCTTCGTGCCCTATGAGATCAA
 AGTCCAGGCCGTCAACAGCCAGGGCAAGGGACCAGAGCCCCAGGTCACTATCGGCTACTCTGGAGAGGAC
 TACCCCCAGGCAATCCCTGAGCTGGAAGGCATTGAAATCCTCAACTCAAGTGCCGTGCTGGTCAAGTGGC
 10 GGCCGGTGGACCTGGCCAGGTCAAGGGCCACCTCCGCGGATACAAATGTGACGTACTGGAGGGAGGGCAG
 TCAGAGGAAGCACAGCAAGAGACATATCCACAAAGACCATGTGGTGGTGGCCGCCAACACCACCAGTGT
 ATCCTCAGTGGCTTGCGGCCCTATAGCTCCTACCCTGGAGGTGCAGGCCTTTAACGGGCGAGGATCGG
 GGCCCGCAGCGAGTTACCTTCAGCACCCAGAGGGAGTGCCTGGCCACCCGAGGCGTTGCACCTGGA
 GTGCCAGTCGAACACCAGCCTGTGTGCGCTGGCAGCCCCACTCAGCCACAACGGCGTGTCCACCGG
 TACGTGCTCTCCTACCACCCCTGGATGAGGGGGCAAGGGGCAACTGTCTTCAACCTTCGGGACCCCG
 15 AACTTCGGACACACAACCTGACCGATCTCAGCCCCACCTGCGGTACCGCTTCCAGCTTCAGGCCACCAC
 CAAAGAGGGCCCTGGTGAAGCCATCGTACGGGAAGGAGGCACATATGGCCTTGTCTGGGATCTCAGATTT
 GGCAACATCTCAGCCACAGCGGGTGAAGAACTACAGTGTGCTCCTGGGTCCCAAGGAGGGCCAGTGC
 ACTTCAGGTTCCATATCTTGTCAAAGCCTTGGGAGAAGAGAAGGGTGGGGCTTCCCTTTCGCCACAGTA
 TGTGAGTACAACAGAGCTCCTACAGCAGTGGGACCTGCAGCCTGACACTGACTACGAGATCCACTTG
 20 TTTAAGGAGAGGATGTTCCGGCACCAAAATGGCTGTGAAGACCAATGGCACAGGCCGCGTGAGGCTCCCTC
 CTGCTGGCTTCGCCACTGAGGGCTGGTTCATCGGCTTTGTGAGTGCCATCATCCTCCTGCTCCTCGTCT
 GCTCATCCTCTGCTTCATCAAGCGCAGCAAGGGCGGCAATACTCAGTGAAGGATAAGGAGGACACCCAG
 GTGGACTCTGAGGCCGACCGATGAAAGATGAGACCTTCGGCGAGTACAGGTCCCTGGAGAGTGACAACG
 AGGAGAAGGCCCTTGGCAGCAGCCAGCCATCGCTCAACGGGGACATCAAGCCCTGGGAGTGACGACAG
 25 CCTGGCCGATTTATGGGGCAGCGTGGATGTTTCAGTTCAACGAGGATGGTTCGTTTCATGGCCAGTACAGT
 GGCAAGAAGGAGAAGGAGGCGGCAGGGGGCAATGACAGCTCAGGGGGCCACTTCCCCATCAACCCGCGG
 TGCCCTAGAATAGTGGAGTCCAGGACAGGAGATGCTGTGCCCTGGCCTGGGATCCAGGCCCTCCCT
 CTCCAGCAGGCCCATGGGAGGCTGGAGTTGGGGCAGAGGAGAACCTGCTGCCTCGGATCCCTTCCCTACC
 ACCCGGTCCCCACTTTATTGCCAAAACCCAGCTGCACCCCTTCCCTGGGCACACGCTGCTCTGCCCCAGCT
 30 TGGGCAGATCTCCACATGCCAGGGGCTTTGGGTGCTGTTTTGCCAGCCATTTGGGCAGAGAGGCTGT
 GGTTTGGGGGAGAAGAAGTAGGGGTGGCCCGAAAGGGTCTCCGAAATGCTGTCTTTCTTGCTCCCTGACT
 GGGGGCAGACATGGTGGGGTCTCCTCAGGACCAGGGTTGGCACCTTCCCCCTCCCCAGCCACTCCCCAG
 CCAGCCTGGCTGGGACTGGGAACAGAACCTCGGTGTCCCCACCATCTGCTGTCTTTTCTTGCCATCTCTG
 CTCCAACCGGGATGGGAGCCGGGCAAACCTGGCCGCGGGGAGGGGAGGCATCTGGAGAGCCAGAGTC
 35 CCCCCACTCCCAGCATCGCACTCTGGCAGCACCGCCTTCCCGCCGCCAGCCACCCCATGGCCGGCT
 TTCAGGAGCTCCATACACAGCTGCCTTCGGTACCCACCACACAACATCCAAGTGGCCTCCGTCACTACC
 TGCTGCGGGGCGGGCACACCTCCTCCCACTGCCACTGGCCGGC

LISTADO DE SECUENCIA

- 40 **[0057]**
- <110> VERIDEX, LLC
- 45 <120> MÉTODOS Y REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DEL MELANOMA
- <130> P055082EP
- <150> uS61/223,894
- 50 <151> 2009-07-08
- <160> 17
- <170> seqwin99, versión 1.02
- 55 <210> 1
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 60 <220>
- <223> Cebador
- <400> 1
- agcttatcat gcctgtcaa 20
- 65 <210> 2

ES 2 617 090 T3

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Cebador

5 <400> 2
 ggttacggag aagtcttgct 20

<210> 3
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sonda

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> N = A marcado con carboxifluoresceína

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 21
 <223> N = T marcado con 2,5-di-tert-butilhidroquinona-1

25 <400> 3
 nggttccgct atcgtgggca n 21

<210> 4
 30 <211> 2082
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

35 <400> 4

atcactgtag	tagtagctgg	aaagagaaat	ctgtgactcc	aattagccag	ttcctgcaga	60
ccttgtgagg	actagaggaa	gaatgctcct	ggctgttttg	tactgcctgc	tgtggagttt	120
ccagacctcc	gctggccatt	tccctagagc	ctgtgtctcc	tctaagaacc	tgatggagaa	180
40 ggaatgctgt	ccaccgtgga	gcggggacag	gagtccctgt	ggccagcttt	caggcagagg	240
ttcctgtcag	aatatccttc	tgtccaatgc	accacttggg	cctcaatttc	ccttcacagg	300
ggtggatgac	cgggagtcgt	ggccttccgt	ctttataat	aggacctgcc	agtgctctgg	360
caacttcatg	ggattcaact	gtggaaactg	caagtttggc	ttttggggac	caaactgcac	420

45

50

55

60

65

ES 2 617 090 T3

	agagagacga	ctcttggtga	gaagaaaacat	cttcgatttg	agtgccccag	agaaggacaa	480
	atTTTTgcc	tacctcactt	tagcaaagca	taccatcagc	tcagactatg	tcatccccat	540
	agggacctat	ggccaaatga	aaaatggatc	aacacccatg	tttaacgaca	tcaatattta	600
	tgacctcttt	gtctggatgc	attattatgt	gtcaatggat	gcactgcttg	ggggatctga	660
5	aatctggaga	gacattgatt	ttgcccatga	agcaccagct	tttctgcctt	ggcatagact	720
	cttcttggtg	cggtgggaac	aagaaatcca	gaagctgaca	ggagatgaaa	acttcactat	780
	tccatattgg	gactggcggg	atgcagaaaa	gtgtgacatt	tgcacagatg	agtacatggg	840
	aggctcagcac	cccacaaatc	ctaacttact	cagcccagca	tcattcttct	cctcttgcca	900
	gattgtctgt	agccgattgg	aggagtacaa	cagccatcag	tccttatgca	atggaacgcc	960
10	cgagggacct	ttacggcgta	atcctggaaa	ccatgacaaa	tccagaaccc	caaggctccc	1020
	ctcttcagct	gatgtagaat	tttgctgag	tttgaccaa	tatgaatctg	gttccatgga	1080
	taaagctgcc	aatttcagct	ttagaaatac	actggaagga	tttgctagtc	cacttactgg	1140
	gatagcggat	gcctctcaaa	gcagcatgca	caatgccttg	cacatctata	tgaatggaac	1200
	aatgtcccag	gtacagggat	ctgccaacga	tcctatcttc	cttcttcacc	atgcatTTgt	1260
15	tgacagtatt	tttgagcagt	ggctccgaag	gcaccgtcct	cttcaagaag	tttatccaga	1320
	agccaatgca	cccattggac	ataaccggga	atcctacatg	gttcctttta	taccactgta	1380
	cagaaatggt	gatttcttta	tttcatccaa	agatctgggc	tatgactata	gctatctaca	1440
	agattcagac	ccagactcct	ttcaagacta	cattaagtcc	tatttggaac	aagcgagtcg	1500
	gatctggcca	tggctccttg	gggcggcgat	ggtaggggcc	gtcctcactg	ccctgctggc	1560
20	agggcttggtg	agcttgctgt	gtcgtcacia	gagaaagcag	cttctgaag	aaaagcagcc	1620
	actcctcatg	gagaaagagg	attaccacag	cttgatcag	agccatttat	aaaaggctta	1680
	ggcaatagag	tagggccaaa	aagcctgacc	tcactctaac	tcaaagtaat	gtccagggtc	1740
	ccagagaata	tctgctggta	ttttctgta	aagaccattt	gcaaaattgt	aacctaatac	1800
	aaagtgtagc	cttcttccaa	ctcaggtaga	acacacctgt	ctttgtcttg	ctgttttcac	1860
25	tcagcccttt	taacattttc	ccctaagccc	atatgtctaa	ggaaaggatg	ctatttggtg	1920
	atgaggaact	gttattttgta	tgtgaattaa	agtgtcttta	ttttaaaaaa	ttgaaataat	1980
	tttgatTTTT	gccttctgat	tatttaaaga	tctatatatg	ttttattggc	cccttcttta	2040
	ttttaataaa	acagtggaaa	atctaaaaaa	aaaaaaaaaa	aa		2082

30
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35
 <220>
 <223> Cebador

40
 <400> 5
 aggttccgct atcgtgggca t 21

45
 <210> 6
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador

50
 <400> 6
 cggccccgaga gatacgc 17

55
 <210> 7
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60
 <220>
 <223> Sonda

<220>
 <221> misc_feature

65
 <222> 1
 <223> N = A marcado con carboxifluoresceína

ES 2 617 090 T3

```

<400> 7
ntccggcggc cac 13

<210> 8
5 <211> 23
  <212> ADN
  <213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Cebador

<400> 8
actatggcct tgtctgggat ctc 23

15 <210> 9
  <211> 25
  <212> ADN
  <213> Secuencia Artificial

20 <220>
  <223> Cebador

<400> 9
25 agatatggaa cctgaagttg cactg 25

  <210> 10
  <211> 18
  <212> ADN
  <213> Secuencia Artificial
30 <220>
  <223> Sonda

<220>
35 <221> misc_feature
  <222> 1
  <223> N = C marcado con carboxifluoresceína

<400> 10
40 naccatctca gccacagc 18

<210> 11
  <211> 57
  <212> ADN
45 <213> Homo Sapiens

<400> 11
cgccagaagt gcggctggga tccggcggcc acctgcacct gcgtatctct cgggccc 57

50 <210> 12
  <211> 89
  <212> ADN
  <213> Homo Sapiens

55 <400> 12
  actatggcct tgtctgggat ctcagat ttt ggcaacatct cagccacagc gggtgaaaac 60
  tacagtgtcg tctcctgggt cccaagga 89

<210> 13
60 <211> 137
  <212> ADN
  <213> Homo Sapiens

<400> 13
65

```

ES 2 617 090 T3

agcttatcat gcctgggtcaa gaagcaggcc ttgggcaggt tccgctgac gtgggcatct 60
 tgctgggtgtt gatggctgtg gtccttgcac tatgaagcaa gacttctccg taccctctctg 120
 atatataggg gcagact 137

5 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

<400> 14

10 tctgctggta tttttctgta aagaccattt gcaaaattgt aacctaatac aaagtgtagc 60
 cttcttccaa 70

15 <210> 15
 <211> 1220
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

<400> 15

20 agtcccagct cagagccgca acctgcacag ccatgcccgg gcaagaactc aggacgggtga 60
 atggctctca gatgctcctg gtgttgctgg tgctctcgtg gctgcccgc gggggcgccc 120
 tgtctctggc cgaggcgagc cgcgcaagtt tcccgggacc ctcagagttg cactccgaag 180
 actccagatt ccgagagttg cggaaacgct acgaggacct gctaaccagg ctgcccggcca 240
 accagagctg ggaagattcg aacaccgacc tcgtcccggc ccctgcagtc cggataactca 300
 25 cgccagaagt gcggctggga tccggcggcc acctgcacct gcgtatctct cgggccgccc 360
 ttcccagagg gtcccccgag gcctcccgcc ttcaccgggc tctgttccgg ctgtccccga 420
 cggcgtcaag gtcgtgggac gtgacacgac cgtgcccggc tcagctcagc cttgcaagac 480
 cccaggcgcc cgcgctgcac ctgacgactgt cgcgcccggc gtcgcagtcg gaccaactgc 540
 tggcagaatc ttcgtccgca cggccccagc tggagttgca cttgcccggc caagccgcca 600
 30 gggggcgccg cagagcgcgt gcgcgcaacg gggaccactg tccgctcggg cccgggctgtt 660
 gctgcccgtc gcacacggtc cgcgctcgc tgggaagacct gggctgggccc gattgggtgc 720
 tgtcgccacg ggaggtgcaa gtgaccatgt gcatcggcgc gtgcccgagc cagttcccggg 780
 cggcaaacat gcacgcgcag atcaagacga gcctgcaccg cctgaagccc gacacgggtgc 840
 cagcgcctcgt ctgctgtccc gccagctaca atcccatggt gctcattcaa aagaccgaca 900
 35 ccgggggtgtc gctccagacc tatgatgact tgtagccaa agactgccac tgcatatgag 960
 cagtcctggc ctttccactg tgcacctgcg cggaggacgc gacctcagtt gtcctgccct 1020
 gtggaatggg ctcaaggttc ctgagacacc cgattcctgc ccaaacagct gtatttata 1080
 aagtcctgta tttattatta atttattggg gtgaccttct tggggactcg ggggctggtc 1140
 tgatggaact gtgtatttat ttaaaactct ggtgataaaa ataaagctgt ctgaactggt 1200
 40 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1220

45 <210> 16
 <211> 2143
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

<400> 16

50

55

60

65

ES 2 617 090 T3

	agtgcctttg	gttgctggag	ggaagaacac	aatggatctg	gtgctaaaaa	gatgccttct	60
	tcatttggct	gtgataggtg	ctttgctggc	tgtgggggct	acaaaagtac	ccagaaacca	120
	ggactggcct	ggtgtctcaa	ggcaactcag	aaccaaagcc	tggaacaggg	agctgtatcc	180
	agagtggaca	gaagcccaga	gacttgactg	ctggagaggt	ggtcaagtgt	ccctcaaggt	240
5	ccctggaagc	caaaaggtat	tgccagatgg	gcaggttatc	tgggtcaaca	ataccatcat	300
	caatgggagc	caggtgtggg	gaggacagcc	agtgtatccc	caggaaactg	acgatgcctg	360
	catcttccct	gatggtggac	cttgcccac	tggctcttgg	tctcagaaga	gaagctttgt	420
	ttatgtctgg	aagacctggg	gccaatactg	gcaagttcta	gggggcccag	tgtctgggct	480
	gagcattggg	acaggcaggg	caatgctggg	cacacacacc	atggaagtga	ctgtctacca	540
10	tcgcccggga	tcccggagct	atgtgcctct	tgctcattcc	agctcagcct	tcaccattac	600
	tgaccaggtg	cctttctccg	tgagcgtgtc	ccagttgctg	gccttggatg	gagggaaacaa	660
	gcacttctctg	agaaatcagc	ctctgacctt	tgccctccag	ctccatgacc	ccagtggcta	720
	tctggctgaa	gctgacctct	cctacacctg	ggacttttga	gacagtagtg	gaaccttgat	780
	ctctcgggca	cttgtgtgca	ctcatactta	cctggagcct	ggcccagtca	ctgcccaggt	840
15	ggtcctgcag	gctgcccattc	ctctcacctc	ctgtggctcc	tccccagttc	caggcaccac	900
	agatgggcac	aggccaactg	cagagggccc	taacaccaca	gctggccaag	gctggccaag	960
	agaagttgtg	ggtactacac	ctgggtcaggc	gccaactgca	gagccctctg	gaaccacatc	1020
	tgtgcaggtg	ccaaccactg	aagtcataag	cactgcacct	gtgcagatgc	caactgcaga	1080
	gagcacaggt	atgacacctg	agaaggtgcc	agtttcagag	gtcatgggta	ccacactggc	1140
20	agagatgtca	actccagagg	ctacaggtat	gacacctgca	gaggtatcaa	ttgtgtgtgct	1200
	ttctggaacc	acagctgcac	aggtacaac	tacagagtgg	gtggagacca	cagctagaga	1260
	gctacctatc	cctgagcctg	aaggtccaga	tgccagctca	atcatgtcta	cggaaagtat	1320
	tacaggttcc	ctgggcccc	tgctggatgg	tacagccacc	ttaaggctgg	tgaagagaca	1380
	agtccccctg	gatttgtgttc	tgtatcgata	tggttccttt	tccgtcacc	tggacattgt	1440
25	ccagggatt	gaaagtgccg	agatcctgca	ggctgtgccg	tccggtgagg	gggatgcatt	1500
	tgagctgact	gtgtcctgcc	aaggcgggct	gccaaggaa	gcctgcatgg	agatctcatc	1560
	gccaggggtc	cagccccctg	cccagcggct	gtgccagcct	gtgctacca	gcccagcctg	1620
	ccagctggtt	ctgcaccaga	tactgaaggg	tggctcgggg	acatactgcc	tcaatgtgtc	1680
	tctggctgat	accaaaccagc	tggcagtggt	cagcaccag	cttatcatgc	ctgggtcaaga	1740
30	agcaggcctt	gggcaggttc	cgctgatcgt	gggcatcttg	ctgggtgttga	tggctgtggg	1800
	ccttgcattc	ctgatataata	ggcgcagact	tatgaagcaa	gacttctccg	taccccagtt	1860
	gccacatagc	agcagtcact	ggctgcgtct	acccgcctc	ttctgctctt	gtcccattgg	1920
	tgagaatagc	cccctcctca	gtgggcagca	ggtctgagta	ctctcatatg	atgctgtgat	1980
	tttctgtgag	ttgacagaaa	cacctatatt	tccccagtc	ttccctggga	gactactatt	2040
35	aactgaaata	aatactcaga	gcctgaaaaa	aaaaaaaaaa	aaa		2100
							2143

<210> 17
 <211> 4525
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 17

45

50

55

60

65

	gcgcggtgcc	gccgggaaag	atggtcgtgg	cgctgcggtg	cggtgtggcct	ctcctcctct	60
	gcagcccctg	cctgcttatc	cagatccccg	aggaatatga	aggacaccat	gtgatggagc	120
	cacctgtcat	cacggaacag	tctccacggc	gcctggttgt	cttccccaca	gatgacatca	180
	gcctcaagtg	tgaggccagt	ggcaagcccc	aagtgcagtt	ccgctggacg	agggatgggt	240
5	tccacttcaa	acccaaggaa	gagctgggtg	tgaccgtgta	ccagtcgccc	cactctggct	300
	ccttcacat	cacgggcaac	aacagcaact	ttgctcagag	gttccagggc	atctaccgct	360
	gctttgccag	caataagctg	ggcaccgcca	tgtcccatga	gatccggctc	atggcccagg	420
	gtgcccccaa	gtggccaaag	gagacagtga	agccccgtga	ggtggaggaa	ggggagtcat	480
	tggttctgcc	ttgcaaccct	cccccaagtg	cagagcctct	ccggatctac	tgatgaaca	540
10	gcaagatctt	gcacatcaag	caggacgagc	gggtgacgat	gggcccagaac	ggcaacctct	600
	actttgccaa	tgtgctcacc	tccgacaacc	actcagacta	catctgccac	gcccacttcc	660
	caggcaccag	gacctcatt	cagaaggaa	ccattgacct	ccgggtcaag	gcccactaca	720
	gcatgattga	caggaagccg	cgctgtctct	tccccaccaa	ctccagcagc	cacctgggtg	780
	ccttgcaggg	gcagccattg	gtcctggagt	gcatcgccga	gggctttccc	acgcccacca	840
15	tcaaatggct	gcgccccagt	ggccccatgc	cagccgaccg	tgctacctac	cagaaccaca	900
	acaagaccct	gcagctgctg	aaagtgggcg	aggaggatga	tgccgagtag	cgctgcctgg	960
	ccgagaacct	actgggcagt	gcccggcatg	cgtagctatg	caccgtggag	gctgccccgt	1020
	actggctgca	caagccccag	agccatctat	atgggcccag	agagactgcc	gccttgact	1080
	gccaagtcca	gggcaggccc	caaccagagg	tcacctggag	aatcaacggg	atccctgtgg	1140
20	aggagctggc	caaagaccag	aagtaccgga	ttcagcgtgg	cgccctgatc	ctgagcaacg	1200
	tgcagcccag	tgacacaatg	gtgacccaat	gtgaggcccc	caaccggcac	gggctcttgc	1260
	tgccaatgc	ctacatctac	gttgtccagc	tgccagccaa	gatcctgact	gccgacaatc	1320
	agacgtacat	ggctgtccag	ggcagcactg	ctaccttct	gtgcaaggcc	ttccgagcgc	1380
	ctgtgcccag	tgttcagtgg	ctggacgagg	atgggacaac	agtgcttcag	gacgaacgct	1440
	tcttccccta	tgccaatggg	accctgggca	ttcgagacct	ccaggccaat	gacaccggac	1500
25	gctacttctg	cctggctgcc	aatgaccaaa	acaatgttac	catcatggct	aacctgaagg	1560
	ttaaagatgc	aactcagatc	actcaggggc	cccgcagcac	aatcgagaag	aaaggtcca	1620
	gggtgacctt	cagtgccacg	gcctcctttg	accctcctt	gcagcccagc	atcacctggc	1680
	gtggggacct	tcgagacctc	caggagcttg	gggacagtga	caagtacttc	atagaggatg	1740
	ggcgccctgg	catccacagc	ctggactaca	gcgaccaggg	caactacagc	tgctgggcca	1800
30	gtaccgaact	ggatgtgggt	gagagtaggg	cacagctctt	ggtgggtggg	agccctgggc	1860
	cggtgccacg	gctgggtgctg	tccgacctgc	acctgctgac	gcagagccag	gtgctgctgt	1920
	cctggagctc	tgacagaagc	cacaatgccc	ccattgagaa	atatgacatt	gaatttgagg	1980
	acaaggaat	ggcgccctgaa	aaatggtaca	ctctgggcaa	ggttccaggg	aaccagacct	2040
	ctaccacct	caagctgtcg	ccctatgtcc	actacacctt	tagggttact	gacataaaca	2100
35	aatatggccc	cggggagccc	agccccgtct	ctgagactgt	ggtcacacct	gaggcagccc	2160
	cagagaagaa	ccctgtggat	gtgaaggggg	aaggaaatga	gaccaccaat	atggtcatca	2220
	cggtggaagc	gctccgggtg	atggactgga	acgcccccca	ggttcagtac	cgctgagcag	2280
	ggcgccctca	ggggacacga	gggccctggc	aggagcagat	tgctcagcgc	cccttccctg	2340
	tggtgtccaa	cacgtccacc	ttcgtgccct	atgagatcaa	agtccaggcc	gtcaacagcc	2400
40	agggcaagg	accagagccc	caggtcacta	tcggctactc	tgagaggac	tacccccagg	2460
	caatccctga	gctggaaggc	attgaaatcc	tcaactcaag	tgccgtgctg	gtcaagtggc	2520
	ggccgggtgga	cctggcccag	gtcaagggcc	acctccgagg	atacaatgtg	acgtactgga	2580
	gggagggcag	tcagaggaag	cacagcaaga	gacatatcca	caaagaccat	gtgggtgggtg	2640
	ccgccaacac	caccagtgtc	atcctcagtg	gcttgcggcc	ctatagctcc	taccacctgg	2700
	aggtgcagcg	ctttaacggg	cgaggatcgg	ggccccgag	cgagttcacc	ttcacagccc	2760
45	cagagggagt	gcctggccac	ccccaggcgt	tgacactgga	gtgccagtcg	aacaccagcc	2820
	tgctgctgcg	ctggcagccc	ccactcagcc	acaacggcgt	gctcaccggc	tacgtgctct	2880
	cctaccacc	cctggatgag	gggggcaagg	ggcaactgtc	cttcaacctt	cgggaccccg	2940
	aacttcggac	acacaacctg	accgatctca	gccccacct	gcggtaccgc	ttccagcttc	3000
50	aggccaccac	caaagagggc	cctggtgaag	ccatcgtacg	ggaaggaggc	actatggcct	3060
	tgctgtggat	ctcagatctt	ggcaacatct	cagccacagc	gggtgaaaac	tacagtgtcg	3120
	tctcctgggt	ccccaggag	ggccagtgca	acttcagggt	ccatatcttg	ttcaaagcct	3180
	tgggagaaga	gaagggtggg	gcttcccttt	cgccacagta	tgctcagctac	aaccagagct	3240

55

60

65

ES 2 617 090 T3

	cctacacgca	gtgggacctg	cagcctgaca	ctgactacga	gatccacttg	tttaaggaga	3300
	ggatgttccg	gcaccaaatg	gctgtgaaga	ccaatggcac	aggccgcgtg	aggctccctc	3360
	ctgctggctt	cgccactgag	ggctggttca	tcggctttgt	gagtgccatc	atcctcctgc	3420
5	tcctcgtcct	gctcatcctc	tgcttcatca	agcgcagcaa	gggcgcaaa	tactcagtga	3480
	aggataagga	ggacacccag	gtggactctg	aggcccgacc	gatgaaagat	gagaccttcg	3540
	gcgagtacag	gtccctggag	agtgacaacg	aggagaaggc	ctttggcagc	agccagccat	3600
	cgctcaacgg	ggacatcaag	cccctgggca	gtgacgacag	cctggccgat	tatgggggca	3660
10	gcggtgatgt	tcagttcaac	gaggatgggt	cgttcattgg	ccagtacagt	ggcaagaagg	3720
	agaaggaggc	ggcagggggc	aatgacagct	caggggccac	ttccccatc	aaccctgccg	3780
	tggccctaga	atagtggagt	ccaggacagg	agatgctgtg	cccctggcct	tgggatccag	3840
	gcccctccct	ctccagcagg	cccatgggag	gctggagtgg	gggagagga	gaacttgctg	3900
	cctcggatcc	ccttctctacc	acccggtccc	cactttattg	ccaaaacca	gctgcacccc	3960
	ttcctgggca	cacgctgctc	tgccccagct	tgggcagatc	tcccacatgc	caggggcctt	4020
15	tgggtgctgt	tttgccagcc	catttgggca	gagaggctgt	ggtttggggg	agaagaagta	4080
	ggggtggccc	gaaaggtct	ccgaaatgct	gtctttcttg	ctccctgact	gggggcagac	4140
	atggtggggt	ctcctcagga	ccagggttgg	caccttcccc	ctccccagc	cactccccag	4200
	ccagcctggc	tgggactggg	aacagaactc	ggtgtcccca	ccatctgctg	tcttttcttt	4260
	gccatctctg	ctccaaccgg	gatgggagcc	gggcaaactg	gccgcggggg	caggggaggc	4320
20	catctggaga	gcccagagtc	ccccactcc	cagcatcgca	ctctggcagc	accgcctctt	4380
	cccgccgcc	agcccacccc	atggccggct	ttcaggagct	ccatacacac	gctgccttcg	4440
	gtaccaccca	cacaacatcc	aagtggcctc	cgtcactacc	tggctgcggg	gcgggcacac	4500
	ctcctccac	tgcccactgg	ccggc				4525

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un método para identificar un melanoma en una muestra de tejido que comprende los pasos de

- 5 a) medir los niveles de expresión en la muestra de genes que codifican el ARNm correspondiente a SILV;
 b) medir el nivel de expresión de un gen que codifica la tirosinasa; y
 c) medir el nivel de expresión de SILV en relación con tirosinasa;

donde los niveles de expresión de SILV en relación con tirosinasa son indicativos de la presencia de un melanoma.

10

2. El método de la reivindicación 1 donde la muestra es una muestra de biopsia primaria de piel.

3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde la expresión genética se mide en una microdisposición o genechip.

15

4. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2 donde la expresión genética se determina por la amplificación de ácidos nucleicos conducida por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ARN extraído de la muestra.

20

5. El método de la reivindicación 4 donde la reacción en cadena de la polimerasa es la qRT-PCR.

6. El uso de un kit en el método de cualquiera de las afirmaciones 1 a 4, donde el kit comprende reactivos de amplificación y detección de ácidos nucleicos.

25

7. El uso de la reivindicación 6 donde los reactivos de amplificación de ácidos nucleicos comprenden cebadores con la secuencia de las SEQ ID NOs 1 y 2 y una sonda con la secuencia de la SEQ ID NO: 3.

30

35

40

45

50

55

60

65

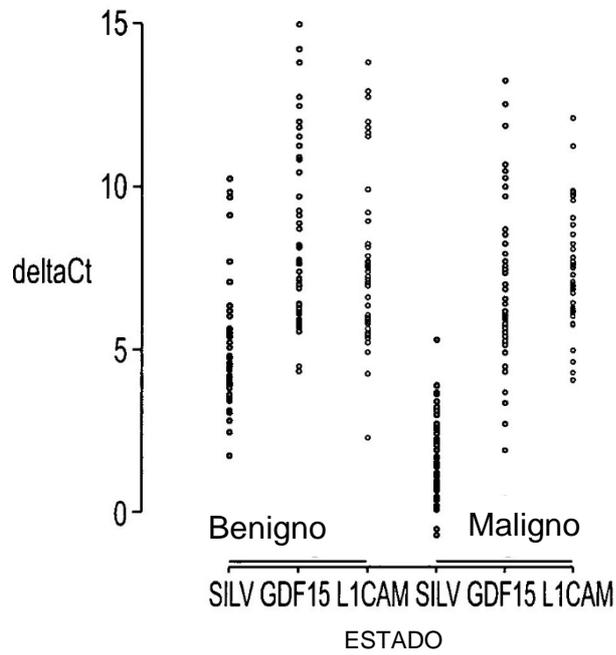


FIG. 1

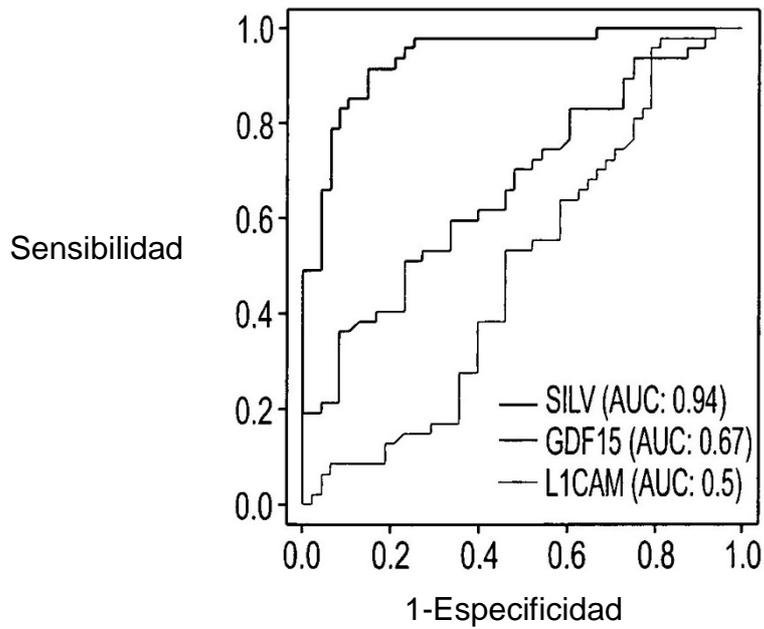


FIG. 2

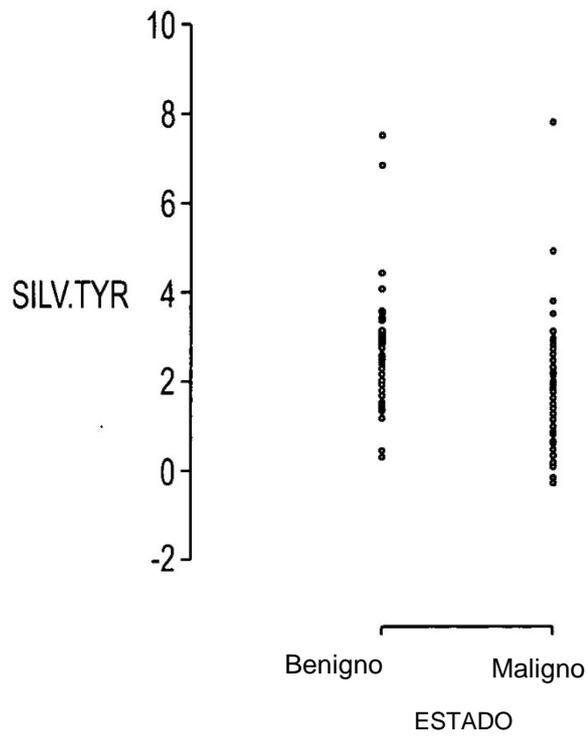


FIG. 3

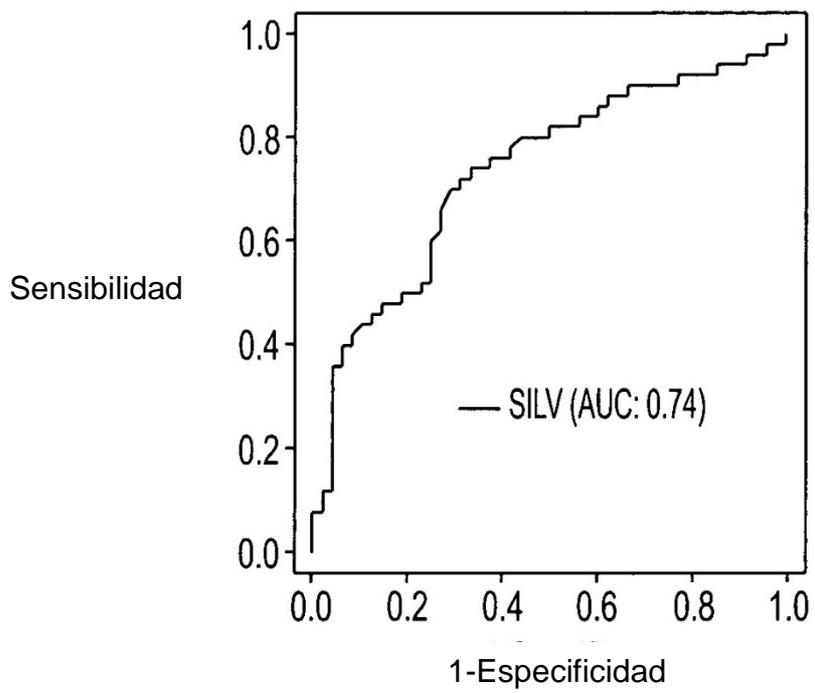


FIG. 4