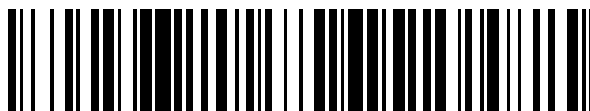


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 470**

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 15173816 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2947160**

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:

05.10.2017

73 Titular/es:

**GENOMIC HEALTH, INC. (100.0%)
301 Penobscot Drive
Redwood City, CA 94063, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 636 470 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 La presente invención proporciona conjuntos de genes cuya expresión es importante en el pronóstico del cáncer. En particular, la invención proporciona información sobre expresión génica, útil para predecir si los pacientes con cáncer tendrán probablemente una respuesta positiva al tratamiento con quimioterapia. Los oncólogos disponen de diversas opciones de tratamientos, incluyendo distintas combinaciones de fármacos quimioterapéuticos que son considerados como "protocolo de tratamiento", y diversos fármacos
- 10 no identificados para tratar un cáncer en particular, pero de los que hay evidencia de eficacia en ese cáncer. La mayor probabilidad de un buen resultado del tratamiento requiere que los pacientes sean asignados al tratamiento contra el cáncer óptimo disponible, y que esta asignación se haga lo antes posible tras el diagnóstico. En particular, es importante determinar la probabilidad de respuesta del paciente a la quimioterapia "protocolo de tratamiento", porque los fármacos quimioterapéuticos, tales como antraciclinas y taxanos, tienen una eficacia limitada y son tóxicos. La identificación de los pacientes
- 15 con la mayor o menor probabilidad de respuesta podría incrementar el beneficio neto que pueden ofrecer esos fármacos, y reducir la morbilidad y toxicidad netas, a través de una selección de pacientes más inteligente. En la actualidad, las pruebas diagnósticas utilizadas en la práctica clínica son de analito único, y por consiguiente no captan el potencial valor de conocer las relaciones entre docenas de marcadores distintos. Además, frecuentemente las pruebas diagnósticas no son cuantitativas, apoyándose en la inmunohistoquímica. A menudo este método proporciona distintos resultados en diferentes laboratorios, en parte debido a que los reactivos no están estandarizados, y en parte porque las interpretaciones son subjetivas y no se pueden cuantificar fácilmente. Las pruebas basadas en ARN no son utilizadas
- 20 frecuentemente por el problema de la degradación del ARN a lo largo del tiempo, y porque resulta difícil obtener de los pacientes muestras de tejido fresco para su análisis. El tejido embebido en parafina fijado es más fácil de obtener y se han establecido métodos para detectar ARN en tejido fijado. No obstante, en general estos métodos no permiten estudiar grandes números de genes (ADN o ARN) en pequeñas cantidades de material. Por ello, tradicionalmente el tejido fijado se ha utilizado con poca frecuencia, aparte de para la detección inmunohistoquímica de proteínas. En los últimos años, varios grupos han publicado estudios sobre la clasificación de diversos tipos de cáncer por análisis de expresión génica de microarrays (ver, ej. Golub et al, *Science* 286:531-537 (1999); Bhattacharjee et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13790-13795 (2001); Chen-Hsiang et al, *Bioinformatics* 17 (Suppl. 1):S316-S322 (2001); Ramaswamy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:15149-15154 (2001)).
- 25 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. USA* 98:11462-11467 (2001); Sorlie et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10869-10874 (2001); Yan et al, *Cancer Res.* 61:8375-8380 (2001)). No obstante, estos estudios van en su mayoría enfocados a mejorar y refinar la clasificación ya establecida de diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, y en general no aportan nuevos conocimientos sobre las relaciones de de los genes expresados diferencialmente, y no vinculan los resultados a estrategias de tratamiento para mejorar el resultado clínico de la terapia contra el cáncer. Aunque la moderna biología y bioquímica molecular ha descubierto centenares de genes cuya actividad influye en la conducta de las células tumorales, su estado de diferenciación y su sensibilidad o resistencia
- 30 a determinados fármacos terapéuticos, con algunas excepciones, el estado de esos genes no ha sido explotado con la finalidad de tomar decisiones clínicas rutinarias sobre tratamientos farmacológicos. Una notable excepción es el uso de la expresión de proteínas de receptores estrogénicos (RE) en el carcinoma de mama para seleccionar a las pacientes para ser tratadas con fármacos antiestrogénicos, como el tamoxifen. Otro ejemplo excepcional es el uso de la expresión de la proteína ErbB2 (Her2) en los carcinomas de mama para seleccionar a pacientes para el fármaco antagonista Her2 Herceptin® (Genentech, Inc., South San Francisco, CA).
- 35 A pesar de los recientes avances, el problema en el tratamiento del cáncer sigue siendo identificar regímenes de tratamiento específicos para tipos de tumores patogénicamente distintos, y por último personalizar el tratamiento del tumor para optimizar los resultados. Por tanto, se necesitan tests que proporcionen simultáneamente información predictiva sobre la respuesta del paciente a las diversas opciones de tratamiento. Esto es especialmente patente en el caso del cáncer de mama, cuya biología es poco conocida. Es evidente que la clasificación del cáncer de mama en unos cuantos subgrupos, como el subgrupo ErbB2 positivo, y subgrupos caracterizados por la baja o ausente expresión génica del receptor estrogénico (RE) y unos cuantos factores transcripcionales adicionales (Perou et al., *Nature* 406:747-752 (2000)), no refleja la heterogeneidad celular y molecular del cáncer de mama, y no permite diseñar
- 40 estrategias de tratamiento que maximicen la respuesta del paciente.

65 El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente entre las mujeres en los Estados Unidos, y es la principal causa de muertes por cáncer entre las mujeres de 40 – 59 años. En consecuencia, existe una necesidad particularmente importante de disponer de un test para el cáncer de mama clínicamente validado, predictivo de la respuesta de la paciente a la quimioterapia. La presente invención proporciona conjuntos de genes útiles para predecir la respuesta del cáncer a la

quimioterapia, por ej. pacientes con cáncer de mama. Además, la invención proporciona un test clínicamente validado para el cáncer, por ej. cáncer de mama, predictivo de la respuesta del paciente a la quimioterapia, utilizando análisis multigen de ARN. La presente invención permite el uso de material de biopsia embebido en parafina guardado para el ensayo de todos los marcadores en los conjuntos de genes pertinentes, y por tanto es compatible con el tipo de material de biopsia más ampliamente disponible.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para la predicción de la respuesta a la quimioterapia en un sujeto diagnosticado de cáncer, comprendiendo la determinación del nivel de expresión de una o más transcritos de ARN de pronóstico o sus productos de expresión en una muestra biológica conteniendo células cancerosas obtenidas de dicho sujeto, donde el transcrito de ARN predictivo es el transcrito de uno o más genes seleccionados del grupo compuesto por TBP; ILT2; ABCC5; CD18; GATA3; DICER 1; MSH3; GBP1; IRS1; CD3z; fasl; TUBB; BAD; ERCC1; MCM6; PR; APC; GGPS1; KRT18; ESRRG; E2F1; AKT2; A.Catenina; CEGP1; NPD009; MAPK14; RUNX1; ID2; G.Catenina; FBX05; FHIT; MTA1; ERBB4; FUS; BBC3; IGF1R; CD9; TP53BP1; MUC1; IGFBP5; rhoC; RALBP1; CDC20; STAT3; ERK1; HLA.DPB1; SGCB; CGA; DHPS; MGMT; CRIP2; MMP12; ErbB3; RAP1GDS1; CDC25B; IL6; CCND1; CYBA; PRKCD; DR4; Hepsina; CRABP1; AK055699; Contig.51037; VCAM1; FYN; GRB7; AKAP.2; RASSF1; MCP1; ZNF38; MCM2; GBP2; SEMA3F; CD31; COL1A1; ER2; BAG1; AKT1; COL1A2; STAT1; Wnt5a; PTPD1; RAB6C; TK1, ErbB2, CCNB1, BIRC5, STK6, MKI67, MYBL2, MMP11, CTSL2, CD68, GSTM1, BCL2, ESR1 donde

(a) por cada unidad de expresión aumentada de uno o más de ILT2; CD18;GBP1; CD3z; fasl; MCM6; E2F1; ID2; FBX05; 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; ERBB2, CCNB1, BIRC5, STK6, MKI67, MYBL2, MMP11, CTSL2 y CD68; o el correspondiente producto de expresión, se pronostica que dicho sujeto tendrá una mayor probabilidad de respuesta a la quimioterapia, y

(b) por cada unidad de expresión aumentada de uno o más de TBP; ABCC5;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; IGFBP5; rhoC; RALBP1; STAT3; ERK1; SGCB; DHPS; MGMT; CRIP2; ErbB3; RAP1GDS1; CCND1; PRKCD; Hepsina; AK055699; ZNF38; SEMA3F; COL1A1; BAG1; AKT1; COL1A2; Wnt.5a; PTPD1; RAB6C; GSTM1, BCL2,ESR1; o el correspondiente producto de expresión, se pronostica que dicho sujeto tendrá una menor probabilidad de respuesta a la quimioterapia.

En una realización particular, en el método anterior el transcrito de ARN predictivo es el transcrito de uno o más genes seleccionados del grupo compuesto por TBP; ILT.2; ABCC5; CD18; GATA3; DICER1; MSH3; GBP1; IRS1; CD3z; fasl; TUBB; BAD; ERCC1; MCM6; PR; APC; GGPS1; KRT18; ESRRG; E2F1; AKT2; A.Catenina; CEGP1; NPD009; MAPK14; RUNX1; ID2; G.Catenina; FBX05; FHIT; MTA1; ERBB4; FUS; BBC3; IGF1R; CD9; TP53BP1; MUC1; IGFBP5; rhoC; RALBP1; CDC20; STAT3; ERK1; HLA.DPB1; SGCB; CGA; DHPS; MGMT; CRIP2; MMP12; ErbB3; RAP1GDS1; CDC25B; IL6; CCND1; CYBA; PRKCD; DR4; Hepsina; CRABP1; AK055699; Contig.51037; VCAM1; FYN; GRB7; AKAP.2; RASSF1; MCP1; ZNF38; MCM2; GBP2; SEMA3F; CD31; COL1A1; ER2; BAG1; AKT1; COL1A2; STAT1; Wnt5a; PTPD1; RAB6C; y TK1.

En otra realización, la respuesta es una respuesta patológica completa.

En una realización preferente, el sujeto es un paciente humano.

El cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer, pero de preferencia es un tumor sólido, como cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de pulmón.

Si el tumor es cáncer de mama, puede ser, por ejemplo, cáncer de mama invasivo, o cáncer de mama estadio II o estadio III.

En una realización particular, la quimioterapia es quimioterapia adyuvante.

En otra realización, la quimioterapia es quimioterapia neoadyuvante.

La quimioterapia neoadyuvante puede comprender, por ejemplo, la administración de un derivado de taxano, como docetaxel y/o paclitaxel, y/u otros agentes anticancerígenos, como los que pertenecen a la clase de las antraciclinas, doxorubicina, inhibidores de la topoisomerasa, etc.

El método puede implicar la determinación de los niveles de expresión de por lo menos dos, o por lo menos cinco, o por lo menos diez, o por lo menos 15 de los transcritos de pronóstico que se enumeran más arriba, o sus productos de expresión.

La muestra biológica puede ser, ej. una muestra de tejido comprendiendo células cancerosas, donde el tejido puede ser fijado, embebido en parafina, o fresco o congelado.

En una realización particular, el tejido procede de una biopsia por aspiración con aguja fina, punción con aguja gruesa u otros tipos de biopsia.

En otra realización, la muestra de tejido se obtiene por biopsia de aspiración con aguja fina, lavado bronquial o transbronquial.

El nivel de expresión de dicho transcrito o transcritos de ARN de pronóstico puede ser determinados, por ejemplo, por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) u otro método basado en

PCR, inmunohistoquímica, técnicas proteómicas, o cualquier otro método conocido por los expertos, o su combinación.

En una realización, el ensayo para la medición de dichos transcritos de ARN de pronóstico o sus productos de expresión, se proporciona en forma de un kit o kits.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a un conjunto que comprende polinucleótidos hibridando con la mayoría de los siguientes genes: TBP; ILT.2; ABCC5; CD18; GATA3; DICER1; MSH3; GBP1; IRS1; CD3z; fasl; TUBB; BAD; ERCC1; MCM6; PR; APC; GGPS1; KRT18; ESRRG; E2F1; AKT2; A.Catenina; CEGP1; NPD009; MAPK14; RUNX1; ID2; G.Catenina; FBX05; FHIT; MTA1; ERBB4; FUS; BBC3; IGF1R; CD9; TP53BP1; MUC1; IGFBP5; rhoC; RALBP1; CDC20; STAT3; ERK1; HLA.DPB1; SGCB; CGA; DHPS; 10 MGMT; CRIP2; MMP12; ErbB3; RAP1GDS1; CDC25B; IL6; CCND1; CYBA; PRKCD; DR4; Hepsina; CRABP1; AK055699; Contig.51037; VCAM1; FYN; GRB7; AKAP.2; RASSF1; MCP1; ZNF38; MCM2; GBP2; SEMA3F; CD31; COL1A1; ER2; BAG1; AKT1; COL1A2; STAT1; Wnt.5a; PTPD1; RAB6C; TK1, ErbB2, CCNB1, BIRC5, STK6, MKI67, MYBL2, MMP11, CTSL2, CD68, GSTM1, BCL2, ESR1.

15 En una realización, la serie comprende polinucleótidos que hibridan con la mayoría de los siguientes genes: TBP; ILT.2; ABCC5; CD18; GATA3; DICER1; MSH3; GBP1; IRS1; CD3z; fasl; TUBB; BAD; ERCC1; MCM6; PR; APC; GGPS1; KRT18; ESRRG; E2F1; AKT2; A.Catenina; CEGP1; NPD009; MAPK14; RUNX1; ID2; G. Catenina; FBX05; FHIT; MTA1; ERBB4; FUS; BBC3; IGF1R; CD9; TP53BP1; MUC1; IGFBP5; rhoC; RALBP1; CDC20; STAT3; ERK1; HLA.DPB1; SGCB; CGA; DHPS; MGMT; CRIP2; 20 MMP12; ErbB3; RAP1GDS1; CDC25B; IL6; CCND1; CYBA; PRKCD; DR4; Hepsina; CRABP1; AK055699; Contig.51037; VCAM1; FYN; GRB7; AKAP.2; RASSF1; MCP1; ZNF38; MCM2; GBP2; SEMA3F; CD31; COL1A1; ER2; BAG1; AKT1; COL1A2; STAT1; Wnt.5a; PTPD1; RAB6C; TK1.

25 En otra realización, la serie comprende polinucleótidos que hibridan con la mayoría de los siguientes genes: ILT.2; CD18; GBP1; CD3z; fasl; MCM6; E2F1; ID2; FBX05; 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; ERBB2, CCNB1, BIRC5, STK6, MKI67, MYBL2, MMP11, CTSL2 y CD68.

30 Y en otra realización, la serie comprende polinucleótidos que hibridan con la mayoría de los siguientes genes: ILT.2; CD18; GBP1; CD3z; fasl; MCM6; E2F1; ID2; FBX05; 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

35 Y aún en otra realización, la serie comprende polinucleótidos que hibridan con la mayoría de los siguientes genes: TBP; ABCC5; 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; IGFBP5; rhoC; RALBP1; STAT3; ERK1; SGCB; DHPS; MGMT; CRIP2; ErbB3; RAP1GDS1; CCND1; PRKCD; Hepsina; AK055699; ZNF38; SEMA3F; COL1A1; BAG1; AKT1; COL1A2; Wnt.5a; PTPD1; RAB6C; GSTM1, BCL2, ESR1.

40 En otra realización, la serie comprende polinucleótidos que hibridan con la mayoría de los siguientes genes: TBP; ABCC5; 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; IGFBP5; rhoC; RALBP1; STAT3; ERK1; SGCB; DHPS; MGMT; CRIP2; ErbB3; RAP1GDS1; CCND1; PRKCD; Hepsina; AK055699; ZNF38; SEMA3F; COL1A1; BAG1; AKT1; COL1A2; Wnt.5a; PTPD1; RAB6C.

En varias realizaciones, el conjunto comprende como mínimo cinco, o como mínimo 10, o como mínimo 15, o como mínimo 10 de tales polinucleótidos.

45 En una realización particular, la serie comprende polinucleótidos que hibridan con todos los genes enumerados más arriba.

En otra realización particular, la serie comprende más de un polinucleótido que hibrida con el mismo gen.

En otra realización, por lo menos uno de los nucleótidos comprende una secuencia basada en intrón cuya expresión se correlaciona con la expresión de una secuencia exón correspondiente.

50 En varias realizaciones, los polinucleótidos pueden ser ADNc u oligonucleótidos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de preparación de un perfil genómico personalizado para un paciente, comprendiendo los pasos de:

- 55 (a) determinar los niveles de expresión normalizados de los transcritos de ARN, o los productos de expresión de un gen o conjunto de genes seleccionados del grupo compuesto por TBP; ILT.2; ABCC5; CD18; GATA3; DICER1; MSH3; GBP1; IRS1; CD3z; fasl; TUBB; BAD; ERCC1; MCM6; PR; APC; GGPS1; KRT18; ESRRG; E2F1; AKT2; A.Catenina; CEGP1; NPD009; MAPK14; RUNX1; ID2; G.Catenina; FBX05; FHIT; MTA1; ERBB4; FUS; BBC3; IGF1R; CD9; TP53BP1; MUC1; IGFBP5; rhoC; RALBP1; CDC20; STAT3; ERK1; HLA.DPB1; SGCB; GGA; DHPS; MGMT; CRIP2; MMP12; ErbB3; 60 RAP1GDS1; CDC25B; IL6; CCND1; CYBA; PRKCD; DR4; Hepsina; CRABP1; AK055699; Contig.51037; VCAM1; FYN; GRB7; AKAP.2; RASSF1; MCP1; ZNF38; MCM2; GBP2; SEMA3F; CD31; COL1A1; ER2; BAG1; AKT1; COL1A2; STAT1; Wnt.5a; PTPD1; RAB6C; TK1, ErbB2, CCNB1, BIRC5, STK6, MKI67, MYBL2, MMP11, GTSL2, CD68, GSTM1, BCL2, ESR1, en una célula cancerosa obtenida de dicho paciente; y
- 65 (b) crear un informe resumiendo los datos obtenidos por el análisis de expresión génica.

En una realización específica, si se determina una expresión aumentada de uno o más de ELT.2; CD18;

GBP1;CD3z; fasl; MCM6; E2F1; ID2; FBX05; 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; ERBB2, CCNB1, BIRC5, STK6, MKI67, MYBL2, MMP11, CTSL2 y CD68; o el correspondiente producto de expresión, el informe incluye la predicción de que dicho sujeto tiene una mayor probabilidad de respuesta a la quimioterapia. En este caso, en una realización particular, el método incluye el paso adicional de tratar al paciente con un agente quimioterapéutico.

En el anterior método, si se determina una expresión aumentada de uno o más de TBP; ABCC5; 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; IGFBP5; rhoC; RALBP1; STAT3; ERK1; SGCB; DHPS; MGMT; CRIP2; ErbB3; RAP1GDS1; CCND1; PRKCD; Hepsina; AK055699; ZNF38; SEMA3F; COL1A1; BAG1; AKT1; COL1A2; Wnt.5a; PTPD1; RAB6C; GSTM1, BCL2, ESR1; o el correspondiente producto de expresión, el informe incluye una predicción de que dicho sujeto tiene una menor probabilidad de respuesta a la quimioterapia.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar la probabilidad de respuesta de un paciente a la quimioterapia, comprendiendo:

(a) determinar los niveles de expresión de los transcritos de ARN de los siguientes genes, ACTB, BAG1, BCL2, CCNB1, CD68, SCUBE2, CTSL2, ESR1, GAPD, GRB7, GSTM1, GUSB, ERBB2, MKI67, MYBL2, PGR, RPLPO, STK6, MMP11, BIRC5, TFRC, o sus productos de expresión, y

(b) calcular la puntuación de recurrencia (Recurrence Score, RS).

En una realización, los pacientes con una RS > 50 están en el percentil 50 superior de los pacientes con probable respuesta a la quimioterapia.

En otra realización, los pacientes con una RS < 35 están en el percentil 50 inferior de los pacientes con probable respuesta a la quimioterapia.

En aún otra realización, se determina la RS creando los siguientes subconjuntos de genes:

(I) subconjunto de factor del crecimiento: GRB7 y HER2;

(II) subconjunto de receptor estrogénico: ER, PR, Bc12, y CEGP1;

(III) subconjunto de proliferación: SURV, Ki.67, MYBL2, CCNB1, y STK15; y

(IV) subconjunto de invasión: CTSL2, y STMY3;

donde un gen en cualquiera de los subconjuntos (i)-(iv) puede ser sustituido por un gen sustituto que coexpresa con dicho gen en dicho tumor con un coeficiente de Pearson $\geq 0,40$; y

(c) calcular la puntuación de recurrencia (RS) de dicho sujeto, ponderando las contribuciones de cada uno de los subconjuntos (i) - (iv), a la recurrencia del cáncer de mama.

El anterior método puede comprender además la determinación de los transcritos de ARN de CD68, GSTM1 y BAG1 o sus productos de expresión, o los correspondientes genes sustitutos o sus productos de expresión, e incluyendo la contribución de dichos genes o genes sustitutos a la recurrencia del cáncer de mama en el cálculo de la RS.

La RS puede ser determinada, por ejemplo, aplicando la siguiente ecuación:

$$RS = (0,23 \text{ a } 0,70) \times \text{umbr eje GRB7} - (0,17 \text{ a } 0,55) \times \text{eje ER} + (0,52 \text{ a } 1,56) \times \text{umbr eje prolif} + (0,07 \text{ a } 0,21) \times \text{eje invasión} + (0,03 \text{ a } 0,15) \times \text{CD68} - (0,04 \text{ a } 0,25) \times \text{GSTM1} - (0,05 \text{ a } 0,22) \times \text{BAG1}$$

donde

(I) eje GRB7 = $(0,45 \text{ a } 1,35) \times \text{GRB7} + (0,05 \text{ a } 0,15) \times \text{HER2}$;

(II) si eje GRB7 < -2, umbr eje GRB7 = -2, y si eje GRB7 \geq -2, umbr eje GRB7 = eje GRB7;

(III) eje ER = $(\text{Est1} + \text{PR} + \text{Bc12} + \text{CEGP1})/4$;

(IV) eje prolif = $(\text{SURV} + \text{Ki.67} + \text{MYBL2} + \text{CCNB1} + \text{STK15})/5$;

(V) si eje prolif < -3.5, umbr eje prolif = -3.5, si eje prolif \geq -3,5, umbr eje prolif = eje prolif ; y

(VI) eje invasión = $(\text{CTSL2} + \text{STMY3})/2$,

donde las contribuciones individuales de los genes en (iii), (iv) y (vi) son ponderadas por un factor de 0,5 a 1,5, y donde una RS mayor representa una mayor probabilidad de recurrencia del cáncer de mama.

En otra realización, se determina la RS aplicando la siguiente ecuación:

$$RS \text{ (rango, } 0 \text{ -} + 0,47 \times \text{Puntuación de Grupo HER2} \\ 100) = - 0,34 \times \text{Puntuación de Grupo ER} \\ + 1,04 \times \text{Puntuación de Grupo Proliferación} \\ + 0,10 \times \text{Puntuación de Grupo Invasión} \\ + 0,05 \times \text{CD68} \\ 0,08 \times \text{GSTM1} \\ 0,07 \times \text{BAG1}$$

La Figura 1 muestra la relación entre la puntuación de recurrencia (RS) y la probabilidad de respuesta del

paciente a la quimioterapia, basado en resultados de un ensayo clínico con la variable de respuesta patológica completa.

La Tabla 1 muestra una lista de genes, cuya expresión se correlaciona positiva o negativamente con la respuesta del cáncer de mama a la quimioterapia neoadyuvante con adriamicina y taxano. Resultados de un ensayo clínico con la variable de respuesta patológica completa. El análisis estadístico utilizó modelos lineales generalizados univariados 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. Resultados de un ensayo clínico retrospectivo. La tabla incluye los números de accesoión de los genes, las secuencias de cebadores directos e inversos (designados con "f" y "r", respectivamente), y sondas (designadas con "p") utilizadas para la amplificación PCR.

La Tabla 3 muestra las secuencias de amplificación utilizadas en la amplificación PCR de los genes indicados.

A. Definiciones

Salvo que se definan de otro modo, los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente alguien con conocimientos ordinarios en la técnica al que pertenece la presente invención. Singleton *et al*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, NY 1992), proporcionan a los expertos en la técnica una guía general para muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.

Un experto en la técnica entenderá que existen muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí, que podrían ser utilizados en la práctica de la presente invención. Sin duda, la presente invención no se limita en modo alguno a los métodos y materiales descritos. A los efectos de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

El término "microarray" se refiere a una disposición ordenada de elementos de un conjunto hibridizable, de preferencia sondas de polinucleótidos, sobre un sustrato.

El término "polinucleótido", utilizado en singular o plural, se refiere en general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado, o ARN o ADN modificado. Así, por ejemplo, los polinucleótidos como se definen aquí incluyen, sin limitación, ADN de cadena simple y doble, ADN incluyendo regiones de cadena simple y doble, ARN de cadena simple y doble, y ARN incluyendo regiones de cadena simple y doble, moléculas híbridas comprendiendo ADN y ARN que pueden ser de cadena simple o, más típicamente, de cadena doble, o incluyendo regiones de cadena simple y doble. Además, el término "polinucleótido", como se utiliza aquí, se refiere a regiones de cadena triple, comprendiendo ARN o ADN, o ARN y ADN. Las cadenas en tales regiones pueden ser de la misma molécula o de moléculas distintas. Las regiones pueden incluir la totalidad de una o más de las moléculas, pero más típicamente incluyen solamente una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región de triple hélice es frecuentemente un oligonucleótido. El término "polinucleótido" incluye específicamente ADNc. El término incluye ADN (incluyendo ADNc) y ARN que contienen una o más bases modificadas. Por tanto, ADN o ARN con espina troncal modificada para mayor estabilidad o por otras razones, son "polinucleótidos" según se entiende aquí el término. Además, ADN o ARN que comprenden bases inusuales, como iosina, o bases modificadas, como bases tritadas, están incluidos en el término "polinucleótidos" como se define aquí. En general, el término "polinucleótido" engloba todas las formas modificadas ya sea 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 simples y complejas.

El término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido relativamente corto, incluyendo, sin limitación, desoxirribonucleótidos de cadena simple, ribonucleótidos de cadena simple o doble, híbridos RNA:DNA y ADN de cadena doble. Los oligonucleótidos, como los oligonucleótidos sonda de ADN de cadena simple, son con frecuencia sintetizados por métodos químicos, por ejemplo utilizando sintetizadores automáticos de oligonucleótidos, que pueden obtenerse en el comercio. No obstante, los oligonucleótidos pueden hacerse mediante diversos métodos, incluyendo técnicas in vitro mediadas por ADN recombinante, y por expresión de ADN en células y organismos.

Los términos "gen expresado diferencialmente", "expresión génica diferencial" y sus sinónimos, que son utilizados de forma intercambiable, se refieren a un gen cuya expresión es activada a un nivel superior o inferior en un sujeto que padece una enfermedad, específicamente un cáncer, como cáncer de mama, en relación con su expresión en un sujeto normal o control. Los términos incluyen también genes cuya expresión es activada a un nivel superior o inferior en diferentes estadios de la misma enfermedad. Se entiende también que un gen expresado diferencialmente puede ser activado o inhibido más bien a nivel de ácido nucleico o nivel proteico, o puede ser sometido a empalme alternativo dando un producto polipeptídico distinto. Tales diferencias pueden evidenciarse por un cambio en los niveles de ARN, expresión de superficie, secreción u otra división de un polipéptido, por ejemplo. La expresión génica diferencial puede incluir una comparación de la expresión entre dos o más genes o sus productos génicos, o una comparación de los cocientes de la expresión entre dos o más genes o sus productos génicos, o incluso una comparación de dos productos del mismo gen procesados de forma distinta, que difieren entre sujetos normales y sujetos con una enfermedad, específicamente cáncer, o entre varios estadios de la misma enfermedad. La expresión diferencial incluye diferencias, tanto cuantitativas como cualitativas, en el patrón de expresión temporal o celular en un gen o sus productos de expresión entre,

por ejemplo, células normales o enfermas, o entre células que han pasado por distintos episodios o estadios de la enfermedad. A efectos de la presente invención, se considera presencia de "expresión génica diferencial" cuando hay una diferencia de por lo menos unas dos veces, de preferencia por lo menos unas cuatro veces, y mejor de por lo menos unas seis veces, y aún mejor de por lo menos diez veces entre la expresión de un gen determinado en sujetos normales y enfermos, o en varios estadios de la evolución de la enfermedad en un sujeto enfermo.

El término "normalizado" respecto a un transcrito de gen o un producto de expresión génica se refiere al nivel del transcrito o producto de expresión génica en relación a los niveles medios de transcritos/ productos de un conjunto de genes de referencia, donde los genes de referencia son seleccionados en base a su variación mínima entre pacientes, tejidos o tratamientos ("genes de limpieza"), o los genes de referencia son la totalidad de los genes comprobados. En este último caso, que se denomina generalmente "normalización global", es importante que el número total de genes comprobados sea relativamente amplio, de preferencia superior a 50. Específicamente, el término "normalizado" respecto a un transcrito de ARN se refiere al nivel de transcrito en relación con la media de niveles de transcrito de un conjunto de genes de referencia. Más específicamente, el nivel medio de un transcrito de ARN medido con TaqMan® RT-PCR se refiere al valor Ct menos los valores Ct medios de un conjunto de transcritos génicos de referencia.

Los términos "umbral de expresión" y "umbral de expresión definido" se utilizan de forma intercambiable, y se refieren al nivel de un gen o producto génico en cuestión por encima del cual el gen o producto génico sirven como marcador predictivo de la respuesta o resistencia de un paciente a un fármaco. Típicamente, el umbral se define experimentalmente en estudios clínicos. El umbral de expresión puede ser seleccionado para sensibilidad máxima (por ejemplo, para detectar todos los respondedores a un fármaco), o para selectividad máxima (por ejemplo, para detectar solamente los respondedores a un fármaco), o para un error mínimo.

La frase "amplificación génica" se refiere a un proceso por el que se forman múltiples copias de un gen o fragmento génico en una célula o línea celular determinadas. La región duplicada (un segmento de ADN amplificado) es denominada frecuentemente "amplicón." Con frecuencia, la cantidad de ARN mensajero (ARNm) producida, es decir, el nivel de expresión génica, aumenta también en proporción al número de copias hechas del gen concreto.

El término "pronóstico" se utiliza aquí en relación con la predicción de la probabilidad de muerte atribuible al cáncer o progresión, incluyendo recurrencia, diseminación metastásica y resistencia farmacológica de una enfermedad neoplásica, como el cáncer de mama. El término "predicción" se utiliza aquí respecto a la probabilidad de que un paciente responda favorable o desfavorablemente a un fármaco o conjunto de fármacos, y también al grado de tales respuestas, o que un paciente sobreviva, tras la extirpación quirúrgica del tumor primario y/o quimioterapia, durante determinado periodo de tiempo sin recurrencia del cáncer. Los métodos de predicción de la presente invención pueden utilizarse clínicamente para tomar decisiones de tratamientos, al elegir las modalidades de tratamiento para un paciente determinado. Los métodos de predicción de la presente invención constituyen valiosas herramientas para predecir si es probable que un paciente responda favorablemente a un régimen de tratamiento, como una intervención quirúrgica, quimioterapia con un fármaco o combinación de fármacos determinados, y/o radioterapia, o si es probable la supervivencia a largo plazo del paciente, tras la cirugía y/o finalización del ciclo de quimioterapia u otras modalidades de tratamiento.

El término supervivencia "a largo plazo" se utiliza aquí en referencia a una supervivencia de cómo mínimo 3 años, de preferencia un mínimo de 8 años, y más preferiblemente de cómo mínimo 10 años tras la cirugía u otro tratamiento.

El término "tumor", como se utiliza aquí, se refiere a todo crecimiento y proliferación neoplásica, maligna o benigna, y toda célula o tejido precancerosos y cancerosos.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer hepático, 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 ponen en peligro el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, el crecimiento celular anormal o incontrolable, las metástasis, la interferencia en el funcionamiento normal de las células vecinas, la liberación de citoquinas u otros productos de secreción a niveles anormales, la supresión o agravación de la respuesta inflamatoria o inmune, neoplasia, lesión premaligna, lesión maligna, la invasión de tejidos u órganos circundantes o distantes, como nódulos linfáticos, etc.

La "respuesta del paciente" puede ser evaluada utilizando cualquier variable que indique un beneficio para el paciente, incluyendo, sin limitación, (1) la inhibición, hasta cierta medida, del crecimiento tumoral, incluyendo el enlentecimiento o la completa detención del crecimiento; (2) la reducción del número de células tumorales; (3) la reducción del tamaño del tumor; (4) la inhibición (es decir, reducción, enlentecimiento o parada total) de la infiltración de células tumorales en órganos y/o tejidos periféricos adyacentes; (5) la inhibición (es decir, reducción, enlentecimiento o parada total) de metástasis; (6) el incremento de la respuesta inmune antitumoral, que puede, pero no tiene que resultar en la regresión o rechazo del tumor; (7) el alivio, hasta cierta medida, de uno o más de los síntomas asociados al tumor; (8)

el aumento de la supervivencia tras el tratamiento; y/o (9) el descenso en la mortalidad en un momento determinado tras el tratamiento.

La "terapia neoadyuvante" es terapia adicional o adyuvante administrada antes de la terapia primaria (principal). La terapia neoadyuvante incluye, por ejemplo, quimioterapia, radioterapia y hormonoterapia. Así, se puede administrar quimioterapia antes de la cirugía para reducir el tamaño del tumor, de forma que la cirugía pueda resultar más efectiva, o posible, en el caso de tumores previamente inoperables.

El "rigor" de las reacciones de hibridación puede ser determinado fácilmente por alguien con conocimientos ordinarios de la técnica, y en general es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración de sal. Generalmente, sondas más largas requieren temperaturas superiores para un adecuado templado, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para un segundo templado cuando están presentes cadenas complementarias en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridizable, tanto mayor es la temperatura relativa que se puede aplicar. El resultado es que se entiende que temperaturas relativas superiores tenderán a hacer más rigurosas las condiciones de reacción, mientras que con temperaturas inferiores lo son menos. Para detalles adicionales sobre explicación del rigor de las reacciones de hibridación, ver Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", como se definen aquí, típicamente: (1) se emplea baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/ citrato sódico 0,0015 M/ dodecil sulfato sódico 1% a 50°C; (2) se emplea durante la hibridación un agente desnaturalizante, como formamida, por ejemplo, formamida 50% (v/v) con albúmina de suero bovino 1%/Ficoll 0,1%/polivinilpirrolidona 0,1% /tampón fosfato sódico 50mM a pH 6.5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o(3) se emplea formamida 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH6.8), pirofosfato sódico 0,1%, 5 x solución Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS0,1% y sulfato dextrano 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida 50% a 55°C, seguido de un lavado de alta rigurosidad consistente en 0,1 x SSC conteniendo EDTA a 55°C.

Las "condiciones moderadamente rigurosas" pueden identificarse como se describen 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 (ej., temperatura, fuerza iónica y %SDS) menos rigurosas que las descritas más arriba. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es la incubación durante la noche a 37°C en una solución con: formamida 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7.6), 5 x Solución Denhardt, sulfato dextrano 10%, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. Los expertos sabrán como ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. según sea necesario para tener en cuenta factores tales como la longitud de la sonda y semejantes.

En el contexto de la presente invención, la referencia a "por lo menos uno", "por lo menos dos", "por lo menos cinco", etc. de los genes enumerados en cualquier conjunto de genes específico significa uno cualquiera, o cualquiera y todas las combinaciones de los genes enumerados.

B. Descripción detallada

En la práctica de la presente invención se emplearán, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, y bioquímica que son parte conocida del procedimiento. Tales técnicas se explican ampliamente en la literatura, 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 el análisis de hibridación de polinucleótidos, métodos basados en la secuenciación de polinucleótidos, y métodos basados en proteómica. Los métodos más habitualmente usados y conocidos por los técnicos para la cuantificación de la expresión de ARNm en una muestra incluyen northern blotting e hibridación in situ (Parker & Baines, *Methods in Molecular Biology* 106:247-283 (1999)); ensayos de protección de ARNsc (Hod, *Biotechniques* 13:852-854 (1992)); y métodos basados en PCR, como la reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) (Weis et al, *Trends in Genetics* 8:263-264 (1992)). Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN, y dúplex híbridos ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los métodos representativos para el análisis de expresión génica basado en la secuenciación incluyen el Análisis Serial

de Expresión Génica (Serial Analysis of Gene Expression, SAGE), y el análisis de expresión génica por secuenciación de firma paralela masiva (MPSS).

2. Métodos de perfilado de expresión génica basados en PCR

5 a. PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR)

Uno de los métodos de perfilado de expresión génica cuantitativos basados en PCR más sensibles y flexibles es la RT-PCR, que puede ser utilizado para comparar los niveles de ARNm en distintas poblaciones de muestra, en tejidos normales y tumorales, con o sin tratamiento farmacológico, para caracterizar patrones de expresión génica, discriminar entre ARNm estrechamente relacionados y analizar la estructura de ARN.

El primer paso es aislar el ARNm de una muestra diana. El material de partida es típicamente ARN total aislado de tumores humanos olíneas de células tumorales, y los correspondientes tejidos o líneas celulares normales, respectivamente. En consecuencia, se puede aislar ARN de diversos tumores primarios, incluyendo tumores o líneas de células tumorales de mama, pulmón, colon, próstata, cerebro, hígado, riñón, páncreas, bazo, timo, testículo, ovario, útero, etc., con ADN combinado de donantes sanos. Si la fuente de ARNm es un tumor primario, se puede extraer ARNm, por ejemplo, de muestras de tejido congeladas o embebidas en parafina y fijadas (ej. fijadas con formalina) guardadas.

Los métodos generales de extracción del ARNm son bien conocidos por los expertos y se divulgan en libros de texto estándar de biología molecular, incluyendo Ausubel et al., *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1997). Se divulgan métodos para la extracción de ARN de tejidos embebidos en parafina, por ejemplo, en Rupp and Locker, *Lab Invest.* 56:A67 (1987), y De Andres et al., *BioTechniques* 18:42044 (1995). En especial, el aislamiento de ARN puede realizarse utilizando un kit de purificación, serie de tampones y proteasa de fabricantes comerciales, como Qiagen, según las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, se puede aislar ARN total de células en cultivo utilizando minicolumnas Qiagen RNeasy. Otros kits de aislamiento de ARN disponibles en el comercio son MasterPure™ Complete DNA y RNA Purification Kit (EPICENTRE®, 10 Madison, WI), y Paraffin Block RNA Isolation Kit (Ambion, Inc.). ARN total de muestras de tejido puede aislarse utilizando RNA Stat-60 (Tel-Test). ARN preparado de tumor puede ser aislado, por ejemplo, por centrifugado de gradiente de densidad de cloruro de cesio.

Como el ARN no puede servir de plantilla para PCR, el primer paso en el perfilado de expresión génica por RT-PCR es la transcripción inversa de la plantilla de ARN en ADNc, seguido de su amplificación exponencial en una reacción PCR. Las dos transcriptasas inversas más comúnmente usadas son la transcriptasa inversa de virus de mieloblastosis aviar (AMV-RT), y la transcriptasa inversa de virus de leucemia murina Moloney (MMLV-RT). El paso de la transcripción inversa es cebado típicamente utilizando cebadores específicos, hexámeros aleatorios, o cebadores oligo dt, dependiendo de las circunstancias y el objetivo del perfilado de expresión. Por ejemplo, ARN extraído puede ser transcrito inversamente utilizando un kit GeneAmp RNA PCR (Perkin Elmer, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc derivado puede ser usado entonces como plantilla en la posterior reacción PCR.

Aunque en el paso de PCR se puede usar una variedad de ADN polimerasas dependientes de ADN termostable, típicamente se emplea Taq ADN polimerasa, que tiene una actividad 5'-3' nucleasa, pero carece de actividad de endonucleasa lectura de prueba (proofreading) 3'-5'. Así, TaqMan® PCR utiliza típicamente la actividad de nucleasa 5', de polimerasa Taq o Tth para hidrolizar una sonda de hibridación unida a su amplicón diana, pero se puede usar cualquier enzima con actividad de nucleasa 5' equivalente.

Dos cebadores oligonucleótidos son utilizados para generar un amplicón típico de una reacción PCR. Un tercer oligonucleótido, o sonda, está diseñado para detectar una secuencia de nucleótido localizada entre los dos cebadores PCR. La sonda no es extensible por el enzima Taq ADN polimerasa, y es marcada con un colorante fluorescente reporter, y un colorante fluorescente inhibidor. Toda emisión inducida por láser del colorante reporter es inhibida por el colorante inhibidor cuando los dos colorantes se colocan juntos en la sonda. Durante la reacción de amplificación, el enzima Taq ADN polimerasa escinde la sonda de modo dependiente de la plantilla. Los fragmentos de sonda resultantes se disocian en solución, y la señal del colorante reporter liberado está libre del efecto inhibidor del segundo fluoróforo. Una molécula de colorante reporter es liberada para cada nueva molécula sintetizada, y la detección del colorante reporter no inhibido proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

Se puede realizar TaqMan® RT-PCR utilizando equipo disponible en el comercio, como por ejemplo, ABI PRISM 7700™ Sequence Detection System™ (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, EE UU), o Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). En una realización preferente, el procedimiento de la nucleasa 5' se desarrolla en un dispositivo PCR cuantitativo de tiempo real como el ABI PRISM 7700™ Sequence Detection System™. El sistema está compuesto por un termociclador, láser, dispositivo con carga acoplada (CCD), cámara y ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por láser es recogida en tiempo real por cables de fibra óptica para todos los 96 pocillos, y es detectada en el CCD. El sistema incluye software para operar el instrumento y para analizar los datos.

Los datos del ensayo nucleasa 5' son expresados inicialmente como Ct, o ciclo umbral. Como se ha comentado más arriba, los valores de fluorescencia son registrados durante cada ciclo, y representan la cantidad de producto amplificado hasta ese punto en la reacción de amplificación. El punto cuando la señal fluorescente es registrada por primera vez como estadísticamente significativa es el ciclo umbral

(Ct).

Para minimizar los errores y el efecto de variación entre muestras, se realiza habitualmente RT-PCR utilizando un ARN de referencia que idealmente se expresa a un nivel constante entre distintos tejidos, y no resulta afectado por el tratamiento experimental. Los ARN usados más frecuentemente para normalizar patrones de expresión génica son ARNm de los genes de limpieza gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPD) y β -actina (ACTB).

Una variación más reciente de la técnica RT-PCR es la PCR cuantitativa en tiempo real, que mide la acumulación de producto PCR mediante una sonda fluorogénica de doble marcado (es decir, sonda TaqMan®). La PCR de tiempo real es compatible con la PCR cuantitativa competitiva, donde se utiliza el competidor interno de cada secuencia diana para la normalización, y con la PCR comparativa cuantitativa utilizando un gen de normalización contenido dentro de la muestra, o un gen limpiador para RT-PCR. Para más detalles ver, ej. Held et al, Genome Research 6:986-994 (1996).

b. Sistema MassARRAY

En el método de perfilado de expresión génica basado en MassARRAY, desarrollado por Sequenom, Inc. (San Diego, CA), tras aislar el ARN y la transcripción inversa, el ADNc obtenido es unido a una molécula de ADN sintético (competidor), que coincide con la región de ADNc diana en todas las posiciones, excepto en una sola base, y sirve de estándar interno. La mezcla de ADNc/competidores amplificada PCR y sometida a un tratamiento post-PCR con enzima de fosfatasa alcalina de camarón (SAP), lo que resulta en la desfosforilación de los nucleótidos restantes. Tras la inactivación de la fosfatasa alcalina, los productos PCR del competidor y del ADNc son sometidos a extensión de cebador, lo que genera distintas señales de masa para los productos PCR derivados del competidor y del ADNc. Tras la purificación, estos productos se disponen en una matriz de chips, precargada con los componentes necesarios para el análisis con espectrometría de masas TOF láser (Tiempo de vuelo) de desorción/ionización asistido por matriz (MALDI-TOF MS). El ADNc presente en la reacción es entonces cuantificado analizando las relaciones de las áreas pico en el espectro de masas generado. Para más detalles ver, ej. Ding and Cantor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3059-3064 (2003).

c. Otros métodos basados en PCR

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

3. Microarrays

La expresión génica diferencial puede ser también identificada o confirmada utilizando la técnica de microarrays. Así, el perfil de expresión de los genes asociados al cáncer de mama puede ser medido en tejido tumoral fresco o embebido en parafina, utilizando la tecnología de microarray. En este método, secuencias de nucleótidos de interés (incluyendo ADNc y oligonucleótidos) se colocan en placas o se disponen sobre un sustrato de microchip. Las secuencias dispuestas son entonces hibridadas con sondas de ADN específicas procedentes de células o tejidos de interés. Igual que en el método RT-PCR, típicamente la fuente de ARNm es ARN total aislado de tumores o líneas celulares tumorales humanas, y los correspondientes tejidos o líneas celulares normales. Así, se puede aislar ARN de diversos tumores primarios o líneas celulares tumorales. Si la fuente de ARNm es un tumor primario, se puede extraer ARNm, por ejemplo, de muestras de tejidos congeladas o embebidas en parafina y fijadas (ej., fijadas en formalina) guardadas, que son preparadas y conservadas rutinariamente en la práctica clínica diaria.

En una realización específica de la técnica de microarray, se aplican inserciones amplificadas por PCR de clones de ADNc a un sustrato en una matriz densa. De preferencia, se aplican por lo menos 10 000 secuencias de nucleótidos al sustrato. Los genes en microarray, inmovilizados sobre el microchip a 10 000 elementos cada uno, son adecuados para la hibridación en condiciones rigurosas. Se pueden generar sondas de ADNc marcadas con fluorescente mediante incorporación de nucleótidos fluorescentes por transcripción inversa de ARN extraído de tejidos de interés. Sondas marcadas de ADNc aplicadas al chip se hibridan con especificidad en cada punto de ADN sobre la matriz. Tras el riguroso lavado para eliminar sondas unidas no específicamente, el chip es escaneado con microscopio láser confocal o por otro método de detección, como puede ser una cámara CCD. La cuantificación de la hibridación de cada elemento en matriz permite la evaluación de la correspondiente abundancia de ARNm. Con fluorescencia de doble color, las sondas de ADNc marcadas por separado generadas a partir de dos fuentes de ARN son hibridadas apareadas a la matriz. La abundancia relativa de los transcritos de las dos fuentes

correspondientes a cada gen especificado es determinada así simultáneamente. La escala miniaturizada de la hibridación permite la cómoda y rápida evaluación del patrón de expresión para grandes números de genes. Tales métodos han demostrado tener la sensibilidad requerida para detectar transcritos raros, que son expresados en unas pocas copias por célula, y detectar de forma reproducible por lo menos

5

aproximadamente diferencias dobles en los niveles de expresión (Schena et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA 93(2):106-149 (1996)). El análisis de microarray puede realizarse con los equipos disponibles en el comercio, siguiendo los protocolos del fabricante, como utilizar la tecnología Affymetrix GenChip, o la tecnología de microarray lhycte.

10

4. Análisis en serie de expresión génica (SAGE)

15

El análisis en serie de 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 transcripción. Primero, se genera una etiqueta de secuencia corta (aproximadamente 10-14 bp) que contiene suficiente información para identificar de forma exclusiva un transcrito, siempre y cuando la etiqueta se obtenga de una posición única en cada transcrito. Entonces se unen juntas muchas transcripciones para formar largas moléculas en serie, que pueden ser secuenciadas, revelando la identidad de las múltiples etiquetas simultáneamente. El patrón de expresión de cualquier población de transcritos puede ser evaluado cuantitativamente determinando la abundancia de etiquetas individuales, e identificando el gen correspondiente a cada etiqueta. Para más detalles ver, ej. Velculescu et al., Science 270:484-487 (1995); y Velculescu et al., Cell 88:243-51 (1997).

20

25

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

Este método, descrito por Brenner et al, Nature Biotechnology 18:630-634 (2000), es un enfoque secuencial que combina secuenciación de firma no basada en gel, con clonación in vitro de millones de plantillas en microperlas de 5 µm de diámetro separadas. Primero se construye una biblioteca de microperlas de plantillas de ADN mediante clonación in vitro. Sigue a esto el ensamblaje de una matriz plana de las microperlas conteniendo plantillas en una célula de flujo a alta densidad (típicamente superior a 3×10^6 microperlas /cm²). Los extremos libres de las plantillas clonadas en cada microperla son analizados simultáneamente, utilizando un método de secuenciación de firma basado en fluorescencia que no requiere separación de fragmentos de ADN. Este método ha demostrado proporcionar de forma simultánea y precisa, en una única operación, cientos de miles de secuencias de firmas génicas de una biblioteca de ADNc de levadura.

30

35

6. Inmunohistoquímica

Los métodos de inmunohistoquímica son también adecuados para detectar los niveles de expresión de los marcadores pronósticos de la presente invención. Así, se utilizan para detectar la expresión anticuerpos o antisueros, de preferencia antisueros policlonales, y aún más preferible anticuerpos monoclonales específicos para cada marcador. Los anticuerpos pueden ser detectados por etiquetado directo de los propios anticuerpos, por ejemplo, con etiquetas radiactivas, etiquetas fluorescentes, etiquetas de hapteno, como biotina, o un enzima, como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Alternativamente, se utiliza un anticuerpo primario no etiquetado junto con un anticuerpo secundario etiquetado, comprendiendo antisueros, anticuerpos policlonales o un anticuerpo monoclonal específico para el anticuerpo primario. Los protocolos y kits de inmunohistoquímica son bien conocidos por los expertos y están disponibles en el comercio.

40

45

50

7. Proteómica

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

55

60

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

Este paso de un protocolo representativo para el perfilado de expresión génica utilizando tejidos fijados, embebidos en parafina, como fuente de ARN, incluyendo aislamiento, purificación, extensión de cebador y

65

amplificación, se comenta en varios artículos publicados en revistas (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]). Resumiendo, un proceso representativo comienza cortando secciones de muestras de tejido tumoral de aproximadamente un grosor de 10 µm. Se extrae entonces el ARN, y se eliminan la proteína y el ADN. Tras el análisis de la concentración de ARN, se pueden incluir pasos de reparación y/o amplificación de ARN, si es necesario, y el ARN se transcribe inversamente utilizando promotores específicos de gen, seguido de RT-PCR. Finalmente, se analizan los datos para identificar la mejor opción u opciones de tratamiento disponibles para el paciente en base al patrón de expresión génica característico identificado en la muestra tumoral examinada.

9. Quimioterapia del cáncer

Los agentes quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento del cáncer pueden dividirse en varios grupos, dependiendo de su mecanismo de acción. Algunos agentes quimioterapéuticos dañan directamente el ADN y el ARN. Alterando la replicación del ADN, tales agentes o detienen totalmente la replicación, o tienen como resultado la producción de ADN o ARN carentes de sentido. Esta categoría incluye, por ejemplo, cisplatino (Platinol®), daunorubicina (Cerubidine®), doxorubicina (Adriamycin®), y etopósido (VePesid®). Otro grupo de agentes quimioterapéuticos anticáncer interfieren en la formación de nucleótidos o desoxirribonucleótidos, de forma que se bloquea la síntesis de ARN y la replicación celular. Los ejemplos de fármacos de esta clase incluyen metotrexato (Abitrexate®), mercaptopurina (Purinethol®), fluorouracilo (Adrucil®), e hidroxiaurea (Hydrea®). Una tercera clase de agentes quimioterapéuticos afecta a la síntesis o descomposición de los husos mitóticos y, como resultado, interrumpen la división celular. Son ejemplos de fármacos de esta clase vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) y taxanos, tales como paclitaxel (Taxol®), y docetaxel (Taxotere®). Docetaxel está actualmente autorizado en los Estados Unidos para tratar a pacientes con cáncer de mama localmente avanzado o metastásico, tras el fracaso de quimioterapia previa, y pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña localmente avanzado o metastásico, tras el fracaso de quimioterapia previa basada en platino.

Un frecuente problema de la quimioterapia es la elevada toxicidad de los agentes quimioterapéuticos tales como antraciclinas y taxenos, lo que limita los beneficios clínicos de este método de tratamiento.

A la mayoría de los pacientes se les administra quimioterapia inmediatamente después de la resección quirúrgica del tumor. Este enfoque es denominado habitualmente terapia adyuvante. No obstante, la quimioterapia se puede administrar también antes de la cirugía, en lo que se denomina tratamiento neoadyuvante. Aunque el uso de quimioterapia neoadyuvante deriva del tratamiento de cáncer de mama avanzado e inoperable, ha ido ganando aceptación también en el tratamiento de otros tipos de cáncer. La eficacia de la quimioterapia neoadyuvante ha sido comprobada 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 utilizó terapia neoadyuvante con una combinación de adriamicina y ciclofosfamida ("régimen AC"). En otro ensayo clínico se administró quimioterapia con una combinación de 5-fluorouracilo, epirubicina y ciclofosfamida ("régimen FEC") (van Der Hage et al., J. Clin. Oncol. 19:4224-4237 (2001)). En ensayos clínicos más recientes se han utilizado también pautas de tratamiento neoadyuvante conteniendo taxanos. Ver, ej. 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 quimioterapia neoadyuvante para cáncer de mama ver, Cleator et al., Endocrine-Related Cancer 9:183-195 (2002).

10. Conjuntos de genes de cáncer. Subsecuencias génicas ensayadas y aplicación clínica de los datos de expresión génica

Un aspecto importante de la presente invención es usar la expresión medida de ciertos genes en tejido de cáncer de mama para proporcionar información pronóstica. A este efecto es necesario corregir (normalizar) diferencias en la cantidad de ARN ensayado, variabilidad en la calidad del ARN utilizado, y otros factores tales como diferencias en máquinas y operadores. En consecuencia, el ensayo típicamente mide e incorpora el uso de ARN de referencia, incluyendo los transcritos de genes limpiadores bien conocidos, tales como GAPD y ACTB. Se da un método preciso de normalización de datos de expresión génica en "User Bulletin #2" para ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems; 1997). Alternativamente, la normalización puede basarse en la señal media o mediana (Ct) de todos los genes ensayados o un amplio subconjunto de ellos (enfoque de normalización global). En el estudio descrito en el siguiente ejemplo, se utilizó la denominada estrategia de normalización central, donde se empleó un subgrupo de los genes cribados, seleccionados en base a la falta de correlación con el resultado clínico, para normalización.

11. Puntuaciones de recurrencia y respuesta a la terapia y sus aplicaciones

La solicitud en tramitación Nº de serie 60/486.302, presentada el 10 de julio de 2003, describe un test de pronóstico basado en un algoritmo, para determinar la probabilidad de recurrencia del 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 del cáncer incluyen: 1) un único conjunto de

ARNm de test (o los correspondientes productos de expresión génica) utilizado para determinar la probabilidad de recurrencia, 2) determinados pesos utilizados para combinar en una fórmula los datos de expresión, y 3) los umbrales utilizados para dividir a los pacientes en grupos de distintos niveles de riesgo, como grupos de riesgo bajo, medio y alto. El algoritmo proporciona una puntuación de recurrencia (RS) numérica o, si se evalúa la respuesta al tratamiento, la puntuación de respuesta a la terapia (RTS).

El test requiere un ensayo de laboratorio para medir los niveles de los ARNm especificados o sus productos de expresión, pero se pueden utilizar cantidades muy pequeñas de tejido fresco, tejido congelado, o muestras de biopsia de tumor embebidas en parafina y fijadas que haya sido ya necesario obtener de pacientes y se hayan guardado. Por tanto, el test puede no ser invasivo. Es también compatible con distintos métodos de obtención de tejido tumoral, por ejemplo mediante biopsia por punción con aguja gruesa o aspiración con aguja fina.

Según este método, la puntuación de recurrencia del cáncer (RS) se determina:

- a) sometiendo una muestra biológica conteniendo células cancerosas obtenida de dicho sujeto al perfilado de expresión génica o proteica;
- 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 subconjuntos de los valores de expresión génica, comprendiendo cada subconjunto valores de expresión de genes unidos por una función biológica relacionada con el cáncer y/o por coexpresión;
- d) multiplicando el nivel de expresión de cada gen de un subconjunto por un coeficiente que refleje su contribución relativa a la recurrencia del cáncer o la respuesta a la terapia dentro de dicho subconjunto, y sumando los productos de la multiplicación para obtener un término para dicho subconjunto;
- e) multiplicando el término de cada subconjunto por un factor que refleje su contribución a la recurrencia del cáncer o la respuesta a la terapia; y
- f) procediendo a la suma de términos para cada subconjunto multiplicado por dicho factor para obtener una puntuación de recurrencia (RS), o una puntuación de respuesta a la terapia (RTS),

donde la contribución de cada subconjunto que no muestre 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 los subconjuntos en los que la expresión aumentada de los genes especificados reduce el riesgo de recurrencia del cáncer se les asigna un valor negativo, y a los subconjuntos en los que la expresión de los genes especificados incrementa el riesgo de recurrencia del cáncer se les asigna un valor positivo.

En una realización particular, la RS se establece:

- a) determinando los niveles de expresión de GRB7, HER2, EstR1, PR, Bcl2, CEGP1, SURV, Ki.67, MYBL2, CCNB1, STK15, CTSL2, STMY3, CD68, GSTM1, y BAG1, o de sus productos de expresión, en una muestra biológica conteniendo células tumorales obtenidas de dicho sujeto, y
- b) calculando la puntuación de recurrencia (RS) mediante la siguiente ecuación:

$$RS = (0,23 \text{ a } 0,70) \times \text{umbr eje GRB7} - (0,17 \text{ a } 0,51) \times \text{eje ER} + (0,53 \text{ a } 1,56) \times \text{umbr eje prolif} + (0,07 \text{ a } 0,21) \times \text{eje invasión} + (0,03 \text{ a } 0,15) \times \text{CD68} - (0,04 \text{ a } 0,25) \times \text{GSTM1} - (0,05 \text{ a } 0,22) \times \text{BAG1}$$

Donde

- (I) eje GRB7 = (0,45 a 1,35) x GRB7 + (0,05 a 0,15) x HER2;
- (II) si eje GRB7 < -2, umbr eje GRB7 = -2, y si eje GRB7 ≥ -2, umbr eje GRB7 = eje GRB7;
- (III) eje ER = (Est1 + PR + Bcl2 + CEGP1)/4;
- (IV) eje prolif = (SURV + Ki.67 + MYBL2 + CCNB1 + STK15)/5;
- (V) si eje prolif < -3,5, umbr eje prolif = -3,5, si eje prolif ≥ -3,5, umbr eje prolif = eje prolif; y
- (VI) eje invasión = (CTSL2 + STMY3)/2

donde los términos de todos los genes individuales para quienes no se muestran específicamente rangos, pueden variar entre aproximadamente 0,5 y 1,5, y donde una RS mayor representa un incremento en la probabilidad de recurrencia del cáncer.

Más detalles de la invención se describen en el siguiente ejemplo no limitante.

Ejemplo

A. Un estudio retrospectivo de quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama invasivo: Perfilado de expresión génica de un tejido extraído de biopsia por punción con aguja gruesa embebido en parafina

Fue un estudio colaborativo implicando a Genomic Health, Inc., (Redwood City California), y el Instituto Tumori, Milan, Italia. El objetivo primario del estudio fue explorar la correlación entre los perfiles moleculares pretratamiento y la respuesta patológica completa (pCR) a la quimioterapia neoadyuvante en un cáncer de mama localmente avanzado.

Criterios de inclusión de pacientes:

Diagnóstico histológico de cáncer de mama invasivo (fecha de la cirugía 1998-2002); diagnóstico de
 5 cáncer de mama localmente avanzado definido por infiltración de la piel y/o afectación axilar N2, y/o
 ganglios homolaterales supraclaviculares positivos; biopsia por punción con aguja gruesa, quimioterapia
 neoadyuvante y resección quirúrgica realizadas en el Istituto Nazionale Tumori, Milan; consentimiento
 informado firmado de que el material biológico obtenido para diagnóstico histológico o procedimientos
 10 diagnósticos puedan ser utilizados para la investigación; y evaluación histopatológica indicando
 cantidades adecuadas de tejido tumoral para inclusión en este estudio de investigación.

Criterios de exclusión:

Metástasis distantes; sin bloque tumoral disponible de la biopsia por punción con aguja gruesa inicial, o de
 la resección quirúrgica; o tumor muy pequeño (<5% del tejido total en la placa) en bloque en la medida que
 15 se evalúa por examen de la placa H&E por el patólogo.

Diseño del estudio

Ochenta y nueve paciente evaluables (de un conjunto de 96 pacientes clínicamente evaluables) fueron
 20 identificadas y estudiadas. Se midieron por RT-PCR los niveles de 384 especies de ARNm, representando
 a productos de genes relacionados con el cáncer candidatos que fueron seleccionados de la literatura de
 investigación biomédica. Solo se perdió un gen debido a señal inadecuada.

Las características de las pacientes fueron las siguientes: Media de edad : 50 años; Grado tumoral: 24%
 25 bien, 55% moderado y 21% malo; 63% de las pacientes fueron ER positivas {por inmunohistoquímica}; 70
 % de las pacientes tenían nódulos linfáticos positivos.

Se administró a todas las pacientes quimioterapia neoadyuvante primaria: Doxorubicin + Taxol 3
 30 semanas/3 ciclos seguido de Taxol® (paclitaxel) 1 semana/12 ciclos. Extracción quirúrgica del tumor tras
 finalización de la quimioterapia. Se tomaron muestras de biopsia de tumor extraído por punción con aguja
 gruesa antes del inicio de la quimioterapia, y sirvieron como fuente de ARN para el ensayo de RT-PCR.

Materiales y métodos

El tejido tumoral embebido en parafina y fijado (PE) se obtuvo por biopsia antes y después de la
 quimioterapia. Las biopsias por punción con aguja gruesa se tomaron antes de la quimioterapia. En este
 35 caso, el patólogo seleccionó el bloque de tumor primario más representativo, y presentó nueve secciones
 de 10 micras para el análisis de ARN. Específicamente, se prepararon un total de 9 secciones (de 10
 micras de grosor cada una) y se colocaron en tres tubos Costar Brand Microcentrifuge (tubos de
 polipropileno, 1,7 ml, transparentes; 3 secciones en cada tubo) y se agruparon.

Se extrajo el ARN mensajero utilizando el MasterPure™ RNA Purification Kit (Epicentre Technologies) y
 40 cuantificado por el método de fluorescencia RiboGreen® (sondas moleculares). Se realizaron ensayos
 moleculares de expresión génica cuantitativa por RT-PCR, utilizando el ABI PRISM 7900™ Sequence
 Detection System™ (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, EE UU). El ABI PRISM 7900™
 está compuesto por termociclador, láser, dispositivo con carga acoplada (CCD), cámara y ordenador. El
 sistema amplifica muestras en un formato de 384 pocillos, en un termociclador. Durante la amplificación,
 45 se recoge la señal fluorescente inducida por láser en tiempo real para todos los 384 pocillos, y detectada
 en el CCD. El sistema incluye software para operar el instrumento y para analizar los datos.

Análisis y resultados

El tejido tumoral fue analizado respecto a 384 genes. Los valores de ciclo umbral (Ct) de cada paciente
 50 fueron normalizados en base a la media de un subconjunto de los genes cribados de esa paciente
 concreta, seleccionada en base a la falta de correlación con el resultado clínico (estrategia de
 normalización central). La respuesta positiva a la quimioterapia fue definida como respuesta patológica
 completa (pCR). Las pacientes fueron evaluadas formalmente en cuanto a la respuesta al finalizar el ciclo
 55 de quimioterapia.

Una respuesta clínica completa (cCR) requiere la total desaparición de toda enfermedad clínicamente
 detectable, mediante examen físico o por imagen diagnóstica de mama.

Una respuesta patológica completa (pCR) requiere la ausencia de cáncer de mama residual por examen
 60 histológico de tejido mamario biopsiado, muestras de lumpectomía o mastectomía tras quimioterapia
 primaria. Puede haber presencia de carcinoma ductal in situ (CDIS). No puede haber presencia de cáncer
 residual en nódulos regionales. De las 89 pacientes evaluables 11 (12%) tuvieron respuesta patológica
 completa (pCR). Siete de esas pacientes fueron ER negativas.

Una respuesta clínica parcial fue definida como una reducción $\geq 50\%$ del área tumoral (suma de los
 65 productos de los diámetros perpendiculares más largos), o una reducción $\geq 50\%$ en la suma de los
 productos de los diámetros perpendiculares más largos de lesiones múltiples en la mama y la axila.
 Ningún área de enfermedad puede aumentar > 25% y no pueden aparecer nuevas lesiones.

Se realizó un análisis comparando la relación entre la expresión génica normalizada y los resultados

ES 2 636 470 T3

binarios de pCR o no pCR. Se utilizaron modelos generalizados univariados con funciones de enlace probit o logit. Ver, ej. Van K. Borooah, LOGIT and PROBIT, Ordered Multinomial Models, Sage University Paper, 2002.

5 La Tabla 1 muestra correlaciones de la respuesta patológica con la expresión génica, y presenta una lista de los 86 genes en los que el valor p de las diferencias entre los grupos fue $<0,1$. La segunda columna (con el título "dirección") muestra si el incremento de la expresión se correlaciona con la reducción o el aumento de la probabilidad de respuesta a la quimioterapia. La significación estadística del valor predictivo de cada gen viene dado por el valor P (columna de la derecha).

10

Gen	Dirección	Enlace probit		Valor P
		Intercept	Pendiente	
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
GAT A3	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
ID 2	Aumento	1,7326	-0,7032	0,0104
G.Catenina	Reducción	-0,1221	0,5954	0,0110
FBX05	Aumento	0,3421	-0,4935	0,0110
FHIT	Reducción	1,9966	0,4989	0,0113
MTA1	Reducción	0,3127	0,6069	0,0133
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

ES 2 636 470 T3

Gen	Dirección	Enlace Probit		
		Intercept	Pendiente	Valor P
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	0,2817	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
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

- 5 En base a los datos presentados en la Tabla 1, la expresión aumentada de los siguientes genes se correlaciona con una mayor probabilidad de respuesta patológica completa al tratamiento: ILT.2; CD18; GBP1; CD3z; fasl; MCM6; E2F1; ID2; FBX05; 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 expresión aumentada de los siguientes genes se correlaciona con una
- 10 menor probabilidad de respuesta patológica completa al tratamiento:
TBP; ABCC5; GATA3; DICER1; MSH3; IRS1; TUBB; BAD; ERCC1; PR; APC; GGPS1; KRT18; ESRRG; AKT2; A.Catenina; CEGP1; NP009; MAPK14; RUNX1; G.Catenina; FHIT; MTA1; ErbB4; FUS; BBC3; IGF1R; CD9; TP53BP1; MUC1; IGFBP5; rhoC; RALBP1; STAT3; ERK1; SGCB; DHPS; MGMT; CRIP2; ErbB3; RAP1GDS1; CCND1; PRKCD; Hepsina; AK055699; ZNF38; SEMA3F; COL1A1; BAG1; AKT1;
- 15 COL1A2; Wnt.5a; PTPD1; RAB6C; Bcl2.
También se investigó la relación entre el algoritmo del riesgo de recurrencia (descrito en la solicitud en trámite USA N° de Serie 60/486 302) y la pCR. El algoritmo incorpora los niveles medidos de 21 especies de ARNm. 16 ARNm (detallados más abajo) fueron marcadores clínicos candidatos, y los restantes 5 (ACTB, GAPD, GUSB, RPLPO, y TFRC) fueron genes de referencia. Las mediciones de expresión
- 20 normalizada de referencia oscilan de 0 a 15, donde un incremento de una unidad refleja un doble incremento en ARN.

ES 2 636 470 T3

La puntuación de recurrencia (RS) se calcula a partir de la expresión cuantitativa de cuatro grupos de genes marcadores (un grupo de 4 genes de receptores estrogénicos —ESR1, PGR, BCL2, y SCUBE2; un grupo de proliferación de 5 genes—MKI67, MYBL2, BIRC5, CCNB1, y STK6; un grupo de 2 genes de HER2 —ERBB2 y GRB7, un grupo de invasión de 2 genes —MMP11 y CTSL2) y 3 otros genes individuales —GSTM1, BAG1, y CD68.

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

$$\begin{aligned} \text{RS (rango, 0 -+ 0,47 x Puntuación Grupo HER2} \\ 100) = & 0,34 \text{ x Puntuación Grupo ER} \\ & +1,04 \text{ x Puntuación Grupo Proliferación} \\ & + 0,10 \text{ x Puntuación Grupo Invasión} \\ & + 0,05 \text{ x CD68} \\ & 0,08 \text{ x GSTM1} \\ & 0,07 \text{ x BAG1} \end{aligned}$$

La aplicación de este algoritmo para el estudio de los conjuntos de datos clínicos y de expresión génica da una curva continua relacionando la RS con los valores de pCR, como se muestra en la Figura 1. El examen de estos datos demuestra que las pacientes con RS > 50 están situadas en el percentil 50 superior de los pacientes en términos de probabilidad de respuesta a la quimioterapia, y que los pacientes con RS < 35 se sitúan en el percentil 50 inferior de los pacientes en términos de probabilidad de respuesta a la quimioterapia.

Si bien la invención ha sido descrita poniendo de relieve determinadas realizaciones específicas, resulta evidente para los expertos en la técnica que son posibles variaciones y modificaciones en los métodos y técnicas específicos. Por tanto, esta invención incluye todas las modificaciones comprendidas en el espíritu y el alcance de la invención tal como viene definida por las siguientes reivindicaciones.

TABLA 2

A-Catenin	NM_00190 S2138/A-Cate.f2	CGTTCCGATCCTCTATACTGCAT	23
A-Catenin	NM_00190 S2139/A-Cate.r2	AGGTCCCTGTTGGCCTTATAGG	22
A-Catenin	NM_00190 S4725/A-Cate.p2	ATGCCTACAGCACCCTGATGTCGCA	25
ABCC5	NM_00568 S5605/ABCC5.f1	TGCAGACTGTACCATGCTGA	20
ABCC5	NM_00568 S5606/ABCC5.r1	GGCCAGCACCATAATCCTAT	20
ABCC5	NM_00568 S5607/ABCC5.p1	CTGCACACGGTCTAGGCTCCG	22
AK055699	AK055699 S2097/AK0556.f1	CTGCATGTGATTGAATAAGAAACAAGA	27
AK055699	AK055699 S2098/AK0556.r1	TGTGGACCTGATCCCTGTACAC	22
AK055699	AK055699 S5057/AK0556.p1	TGACCACACCAAAGCCTCCCTGG	23
AKAP-2	NM_00720 S1374/AKAP-2.f1	ACGAATTGTGCGGTGAGGTCT	20
AKAP-2	NM_00720 S1375/AKAP-2.r1	GTCCATGCTGAAATCATTGG	20
AKAP-2	NM_00720 S4934/AKAP-2.p1	CAGGATACCACAGTCCCTGGAGACCC	25
AKT1	NM_00516 S0010/AKT1.f3	CGCTTCTATGGCGCTGAGAT	20
AKT1	NM_00516 S0012/AKT1.r3	TCCCGGTACACCACGTTCTT	20
AKT1	NM_00516 S4776/AKT1.p3	CAGCCCTGGACTACCTGCACTCGG	24
AKT2	NM_00162 S0828/AKT2.f3	TCCTGCCACCCTTCAAACC	19
AKT2	NM_00162 S0829/AKT2.r3	GGCGGTAAATTCATCATCGAA	21
AKT2	NM_00162 S4727/AKT2.p3	CAGGTCACGTCCGAGGTCGACACA	24
APC	NM_00003 S0022/APC.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 S2012/BAD.r1	CTGCTCACTCGGCTGAAACTC	21
BAD	NM_03298 S5058/BAD.p1	TGGGCCCAGAGCATGTTCCAGATC	24
BAG1	NM_00432 S1386/BAG1.f2	CGTTGTCAGCACTTGAATACAA	23
BAG1	NM_00432 S1387/BAG1.r2	GTTCAACCTCTTCCTGTGGACTGT	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	CCTATGATTTAAGGGCATTITTC	24
Bcl2	NM_00063 S4732/Bcl2.p2	TTCCACGCCGAAGGACAGCGAT	22
CCND1	NM_00175 S0058/CCND1.f3	GCATGTTCTGTGGCCTTAAGA	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	TGCCTCTGTAATCGGCAACTG	21
CD3z	NM_00073 S4988/CD3z.p1	CACCGCGGCCATCCTGCA	18
CD9	NM_00176 S0686/CD9.f1	GGGCGTGGAACAGTTTATCT	20
CD9	NM_00176 S0687/CD9.r1	CACGGTGGAAGTTTCGAGT	19
CD9	NM_00176 S4792/CD9.p1	AGACATCTGCCCAAGAAGGACGT	24
CDC20	NM_00125 S4447/CDC20.f1	TGGATTGGAGTTCTGGGAATG	21
CDC20	NM_00125 S4448/CDC20.r1	GCTTGCCTCCACAGGTACACA	22
CDC20	NM_00125 S4449/CDC20.p1	ACTGGCCGTGGCACTGGACAACA	23
CDC25B	NM_02187 S1160/CDC25B.f1	AAACGAGCAGTTTGCCATCAG	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	CAAACCGCTGTGTTTCTTC	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	CAGCCAAGAACTGGTATAGGAGCT	24
COL1A2	NM_00008 S4535/COL1A2.r1	AAACTGGCTGCCAGCATTG	19
COL1A2	NM_00008 S4536/COL1A2.p1	TCTCCTAGCCAGACGTGTTTCTTGTCCTTG	30
Contig 510	XM_05894 S2070/Contig.f1	CGACAGTTGCGATGAAAGTTCTAA	24
Contig 510	XM_05894 S2071/Contig.r1	GGCTGCTAGAGACCATGGACAT	22
Contig 510	XM_05894 S5059/Contig.p1	CCTCCTCCTGTTGCTGCCACTAATGCT	27
CRABP1	NM_00437 S5441/CRABP1.f3	AACTTCAAGGTCCGAGAAGG	20
CRABP1	NM_00437 S5442/CRABP1.r3	TGGCTAAACTCCTGCACTTG	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
CYBA	NM_00010 S5300/CYBA.f1	GGTGCCTACTCCATTGTGG	19
CYBA	NM_00010 S5301/CYBA.r1	GTGGAGCCCTTOTTCTCCTT	20
CYBA	NM_00010 S5302/CYBA.p1	TACTCCAGCAGGCACACAAACACG	24
DHPS	NM_01340 S4519/DHPS.f3	GGGAGAACGGGATCAATAGGAT	22
DHPS	NM_01340 S4520/DHPS.r3	GCATCAGCCAGTCCCTCAAACCT	21
DHPS	NM_01340 S4521/DHPS.p3	CTCATTGGGCCACCAGCAGGTTTCC	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	TGCACAGAGGGTGTGGGTTAC	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	CAGGCCTCAGTTCCCTTCAGT	20
E2F1	NM_00522 S4821/E2F1.p3	CAGAAGAACAGCTCAGGGACCCT	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	GAACTGAGACCCACTGAAGAAAGG	24
ErbB3	NM_00198 S5002/ErbB3.p1	CCTCAAAGGTACTCCCTCCTCCCGG	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	CTCATCCGTGGGTCATAGT	20

ERK1	Z11696	S4882/ERK1.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	GCATGTAAGAAGACCCTCACTGAA	24
fasl	NM_00063	S5004/fasl.p2	ACAACATTCTCGGTGCCTGTAACAAAGAA	29
FBXO5	NM_01217	S2017/FBXO5.r1	GGATTGTAGACTGTCACCGAAATTC	25
FBXO5	NM_01217	S2018/FBXO5.f1	GGCTATTCCTCATTCTCTACAAAGTG	28
FBXO5	NM_01217	S5061/FBXO5.p1	CCTCCAGGAGGCTACCTTCTTCATGTTCCAG	30
FHIT	NM_00201	S2443/FHIT.f1	CCAGTGGAGCGCTTCCAT	18
FHIT	NM_00201	S2444/FHIT.r1	CTCTCTGGGTCGTCTGAAACAA	22
FHIT	NM_00201	S4921/FHIT.p1	TCGGCCACTTCATCAGGACGCGAG	23
FUS	NM_00496	S2936/FUS.f1	GGATAATTCAGACAACAAGACCATCT	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	CTGAAGCAGACAAGCTGGTCCAG	24
G-Catenin	NM_00223	S2153/G-Cate.f1	TCAGCAGCAAGGGCATCAT	19
G-Catenin	NM_00223	S2154/G-Cate.r1	GGTGGTTTTCTTGAGCGTGTACT	23
G-Catenin	NM_00223	S5044/G-Cate.p1	CGCCCGCAGGCCTCATCCT	19
GATA3	NM_00205	S0127/GATA3.f3	CAAAGGAGCTCACTGTGGTGTCT	23
GATA3	NM_00205	S0129/GATA3.r3	GAGTCAGAATGGCTTATTCACAGATG	26
GATA3	NM_00205	S5005/GATA3.p3	TGTTCCAACCACTGAATCTGGACC	24
GBP1	NM_00205	S5698/GBP1.f1	TTGGGAAATATTTGGGCATT	20
GBP1	NM_00205	S5699/GBP1.r1	AGAAGCTAGGCTGGTTGTCC	20
GBP1	NM_00205	S5700/GBP1.p1	TTGGGACATTGTAGACTTGGCCAGAC	26
GBP2	NM_00412	S5707/GBP2.f2	GCATGGGAACCATCAACCA	19
GBP2	NM_00412	S5708/GBP2.r2	TGAGGAGTTTTGCCTTGATTCCG	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	TGGCCCACAGCATCTATGGAATCCC	25
GRB7	NM_00531	S0130/GRB7.f2	CCATCTGCATCCATCTTGTT	20
GRB7	NM_00531	S0132/GRB7.r2	GGCCACCAGGGTATTATCTG	20
GRB7	NM_00531	S4726/GRB7.p2	CTCCCCACCCCTTGAGAAGTGCCT	23
Hepsin	NM_00215	S2269/Hepsin.f1	AGGCTGCTGGAGGTCATCTC	20
Hepsin	NM_00215	S2270/Hepsin.r1	CTTCCTGCGGCCACAGTCT	19
Hepsin	NM_00215	S2271/Hepsin.p1	CCAGAGGCCGTTTCTTGGCCG	21
HLA-DPB1	NM_00212	S4573/HLA-DP.f1	TCCATGATGGTTCTGCAGGT	21
HLA-DPB1	NM_00212	S4574/HLA-DP.r1	TGAGCAGCACCATCAGTAACG	21
HLA-DPB1	NM_00212	S4575/HLA-DP.p1	CCCCGGACAGTGGCTCTGACG	21
ID2	NM_00218	S0151/ID2.f4	AACGACTGCTACTCCAAGCTCAA	23
ID2	NM_00218	S0153/ID2.r4	GGATTTCCATCTTGCTCACCTT	22
ID2	NM_00218	S5009/ID2.p4	TGCCAGCATCCCCAGAACAA	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	ACCAGGCAAGTCTCCTCATT	20
IL6	NM_00060	S4800/IL6.p3	CCAGATTGGAAGCATCCATCTTTTCA	27

ILT-2	NM_00666 S1611/ILT-2.f2	AGCCATCACTCTCAGTGCG	20
ILT-2	NM_00666 S1612/ILT-2.r2	ACTGCAGAGTCAGGGTCTCC	20
ILT-2	NM_00666 S4904/ILT-2.p2	CAGGTCTATCGTGGCCCCTGA	22
IRS1	NM_00554 S1943/IRS1.f3	CCACAGCTCACCTTCTGTCA	20
IRS1	NM_00554 S1944/IRS1.r3	CCTCAGTGCCAGTCTCTTCC	20
IRS1	NM_00554 S5050/IRS1.p3	TCCATCCCAGCTCCAGCCAG	20
KRT18	NM_00022 S1710/KRT18.f2	AGAGATCGAGGCTCTCAAGG	20
KRT18	NM_00022 S1711/KRT18.r2	GGCCTTTTACTTTCCTCTTCG	20
KRT18	NM_00022 S4762/KRT18.p2	TGGTTCTTCTTCATGAAGAGCAGCTCC	27
MAPK14	NM_13901 S5557/MAPK14.f2	TGAGTGGAAAAGCCTGACCTATG	23
MAPK14	NM_13901 S5558/MAPK14.r2	GGACTCCATCTCTTCTTGGTCAA	23
MAPK14	NM_13901 S5559/MAPK14.p2	TGAAGTCATCAGCTTTGTGCCACCACC	27
MCM2	NM_00452 S1602/MCM2.f2	GACTTTTGCCCGTACCTTTC	21
MCM2	NM_00452 S1603/MCM2.r2	GCCACTAAGCTTTCAGTATGAAGAG	26
MCM2	NM_00452 S4900/MCM2.p2	ACAGTCTATTGTTGTCACGCCGGA	24
MCM6	NM_00591 S1704/MCM6.f3	TGATGGTCCTATGTGTCACATTCA	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	GCACTGAGATCTTCTTATTGGTGAA	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	CAGCCCTTTGGGGAAAGCTGG	20
MMP12	NM_00242 S4381/MMP12.f2	CCAACGCTTGCCAAATCCT	19
MMP12	NM_00242 S4382/MMP12.r2	ACGGTAGTGACAGCATCAAACTC	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	TCCCAATTGTCGCTTCTTCTGCAG	24
MTA1	NM_00468 S2369/MTA1.f1	CCGCCCTCACCTGAAGAGA	19
MTA1	NM_00468 S2370/MTA1.r1	GGAATAAGTTAGCCGCGTCT	22
MTA1	NM_00468 S4855/MTA1.p1	CCCAGTGTCCGCCAAGGAGCG	21
MUC1	NM_00245 S0782/MUC1.f2	GGCCAGGATCTGTGGTGGTA	20
MUC1	NM_00245 S0783/MUC1.r2	CTCCACGTCGTGGACATTGA	20
MUC1	NM_00245 S4807/MUC1.p2	CTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACC	23
NPD009 (A	NM_02068 S4474/NPD009.f3	GGCTGTGGCTGAGGCTGTAG	20
NPD009 (A	NM_02068 S4475/NPD009.r3	GGAGCATTGAGGTCAAATCA	21
NPD009 (A	NM_02068 S4476/NPD009.p3	TTCCCAGAGTGTCTCACCTCCAGCAGAG	28
PR	NM_00092 S1336/PR.f6	GCATCAGGCTGTCATTATGG	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	AGGTGGTCCTTGGTCTGGAA	20
PRKCD	NM_00625 S4923/PRKCD.p2	CCCTTTCTCACCCACCTCATCTGCAC	26
PTPD1	NM_00703 S3069/PTPD1.f2	CGCTTGCCTAACCTCATACTTTC	23
PTPD1	NM_00703 S3070/PTPD1.r2	CCATTACAGACTGCGCCACTT	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	GGAACACCAGCTTGAATTCCT	22
RALBP1	NM_00678 S5853/RALBP1.f1	GGTGTGAGATATAAATGTGCAAATGC	26

RALBP1	NM_00678	S5854/RALBP1.r1	TTGGATATTGCCAGCAGCTATAAA	24
RALBP1	NM_00678	S5855/RALBP1.p1	TGCTGTCCTGTCGGTCTCAGTACGTTCA	28
RAP1GDS	NM_02115	S5306/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	CCCGTTCCGGTCTGAGGAA	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	GTGATTTGCCCAGGAAGTTT	20
RUNX1	NM_00175	S4590/RUNX1.p2	TTGGATCTGCTTGCTGTCCAAACC	24
SEMA3F	NM_00418	S2857/SEMA3F.f3	CGCGAGCCCCTCATTATACA	20
SEMA3F	NM_00418	S2858/SEMA3F.r3	CACTGCCCGTTGACATCCT	19
SEMA3F	NM_00418	S4972/SEMA3F.p3	CTCCCCACAGCCGATCGAGGAA	22
SGCB	NM_00023	S5752/SGCB.f1	CAGTGGAGACCAGTTGGGTAGTG	23
SGCB	NM_00023	S5753/SGCB.r1	CCTTGAAGAGCGTCCCATCA	20
SGCB	NM_00023	S5754/SGCB.p1	CACACATGCAGAGCTTGTAGCGTACCCA	28
STAT1	NM_00731	S1542/STAT1.f3	GGGCTCAGCTTTTCAGAAGTG	20
STAT1	NM_00731	S1543/STAT1.r3	ACATGTTCCAGCTGGTCCACA	20
STAT1	NM_00731	S4878/STAT1.p3	TGGCAGTTTTCTTCTGTCAACAAAA	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	GCCGGGAAGACCCTAATTGT	20
TK1	NM_00325	S0927/TK1.r2	CAGCGGCACCAGGTTCCAG	18
TK1	NM_00325	S4798/TK1.p2	CAAATGGCTTCCTCTGGAAGGTCCCA	26
TP53BP1	NM_00565	S1747/TP53BP.f2	TGCTGTTGCTGAGTCTGTTG	20
TP53BP1	NM_00565	S1748/TP53BP.r2	CTTGCCTGGCTTCACAGATA	20
TP53BP1	NM_00565	S4924/TP53BP.p2	CCAGTCCCAGAAAGACCATGTCTG	24
TUBB	NM_00106	S5826/TUBB.f3	TGTGGTGAGGAAGGAGTCAG	20
TUBB	NM_00106	S5827/TUBB.r3	CCCAGAGAGTGGGTGAGC	18
TUBB	NM_00106	S5828/TUBB.p3	CTGTGACTGTCTCCAGGGCTTCCA	24
VCAM1	NM_00107	S3505/VCAM1.f1	TGGCTTCAGGAGCTGAATACC	21
VCAM1	NM_00107	S3506/VCAM1.r1	TGCTGTGCTGATGAGAAAATAGTG	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	TTGATGCCTGTCTTCGGCCTTCT	24
ZNF38	NM_14591	S5593/ZNF38.f3	TTCCAAACATCAGCGAGTC	20
ZNF38	NM_14591	S5594/ZNF38.r3	AACAGGAGCGCTTAAAAGTT	20
ZNF38	NM_14591	S5595/ZNF38.p3	ACGGTGCTTCTCCCTCTCCAGTG	23

Continuación

GRB7 NM_00531 CCATCTGCATCCATCTTGTTGGGCTCCCAACCCCTTGAGAAAGTGCCTCAGATAATACCCCTGGTGGCC

Hepsin NM_00215 AGGCTGCTGGAGGTCATCTCCGTTGTGATGCCCCAGAGCCCGTTCTTGGCCGCCATCTGCCAAAGACTGTGCCCGCAGGAAG

HLA-DPB1 NM_00212 TCCATGATGGTCTGCAGGTTCTGGGCCGCCGACAGTGGCTCTGACGGCGTTACTGATGGTGGCTGCTCA

ID2 NM_00216 AACGACTGCTACTCAAGCTCAAGGCTCAAGGCTGGTCCCGCAGTCCCCAGAACAAAGATGGAATCC

IGF1R NM_00087 GCATGGTAGCCGAAGATTACAGACTCAAATCGGAGATTTGGTATGACCGCAATCTATGACAGACTATTACCGGAAA

IL6 NM_00060 CCTGAACCTTCCAAAGTGGCTGAAAGATGGATCTTCCAAATCGGATTCGAATGAGGAGACTTGCCTGGT

ILT-2 NM_00688 AGCCATCACTCTCAGTGCAGCCAGGTCTATGTGGCCCTGAGGAGACCCTGACTCTGCAGT

IRS1 NM_00554 CCACAGCTCACCTTCTGTCCAGGTGCCATCCAGCTCCAGCCAGCTCCAGAGAGGAAGACTGGCACTGAGG

KRT18 NM_00022 AGAGATCGAGGCTCAAGGAGAGCTCTTTCATGAAGAAAGAACCCACGAAAGGAAAGTAAAGGCC

MAPK14 NM_13901 TGAGTGGAAAGCCCTGACCTATGATGAAGTCAATCAGCTTTGTGCCACACCCCTTGACCAAGAGAGATGGAGTCC

MCM2 NM_00452 GACTTTGCCCGTACCTTTCATTCGCGCTGACAACTATGAGCTGTGCTCTTACTACTGAAGCAGTATGTTGGC

MCM6 NM_00591 TGATGGTCTATGTGCATTTTCATCAGGTTTCATCAACACAGGCTTCAGCACTCCCTTGGTGGTCTTCTGTGCCA

MCP1 NM_00298 CGCTCAGCCAGATGCAATCAATGCCAGTCACTGTGTTAATCACTTCCAAATAGGAAATCTCAGTGC

MGMT NM_00241 GTGAATGAACCGCACCACTGGACGCCCTTGGGAAAGCTGGAGCTGTCTGTTGTGAGCAGGGTC

MMP12 NM_00242 CCAACGCTTGCCTAATGCAATTCAGAACCACTCTCTGTGACCCCAATTTGAGTTTGTGCTGTCACTACCCT

MSH3 NM_00243 TGATTACCATCATGGCTCAGATTGGCTCCTATGTTCTGCAAGAAAGCGCAATTTGGGATTTGGATGGCAATTTTCAAG

MTA1 NM_00488 CCGCCCTCACCTGGAAGAACCGCTCCTTGGCCGACACTGGGGAGAGAGGAAAGCCGCGGTAACCTTATTCC

MUC1 NM_00245 GGCCAGGATCTGGTGGTACAAATGACTTGGCCCTCCGAGAAAGTACCATCAATGCCACGCTGGAG

NPD008 (f NM_02068 GGCTGGTGGCTGAGGCTAGACCTCTGCTGGAGTGAGACACTCTGGAACTGATTGAACTCGAAATGCTCC

PR NM_00092 GCATCAGGCTGCATATGGTGTCTTACCTGTGGAGCTGAAAGTCTCTTTAAGAGGCCAATGGAAGGGCAGCACAACTACT

PRKCD NM_00625 CTGACACTTCCCGCAGAGAAATCCCTTCTCACCCACTATCTGCACCTCCAGACCAGCAAGCAAGCCACT

PTPDI NM_00703 CGCTTGCCTAACTCAGTCTTCCCGTTGACATTTCCAGCCAGCTGCATCCAGCCAGCTGGACGTAAGTGGCCAGTCTGAATGG

RAB6C NM_03214 GCGAGACTCCTAGTCCACCATGTCCGCGGSCSBAGACTTCGGGAATCCGCTGAGGAAATTCAGCTGGTGTCC

RALBP1 NM_00678 GGTGCAGATAAATGTCAAATGCTCTTGGTCTCTGTGCTGCTCAGTACGTTCACTTTATAGCTGTGCAATATCGAA

RAP1GDS NM_02115 TGTGGATGCTGGATTGATTTCACCACTGGTGCAGCTGCTAAATAGCAAAGACCAGGAAATGCTGCT

RASSF1 NM_00718 AGTGGGAGACCTGACCTTCTCAAGCTGAGATTGAGCAGAAAGTCAAGGATCAATGCCAGATCA

rlbc NM_00518 CCCGTTCCGCTGAGGAAAGCCGGACATGCGAACCGGATCAGTCCCTTGGCTACCTTGGTGGTGTCTC

RUNX1 NM_00175 AACAGAGACATTCGAACATATGGATCTGCTGTCCAAACCAGCAACTTCCGCGCAATTCAC

SEMA3F NM_00418 GCGGAGCCCTATTATACACTGGGAGCCCTCCACACGCTATCGAGGAATCGGTCTCTCAGGCAAGGATGTCAACGGCGAGTG

SGCB NM_00023 CAGTGGAGACCAGTTGGGTAGTGGTACTGGTACGCTACAAGCTCTGCATGTGTGCTGATGGAGCCCTCTCAAGG

STAT1 NM_00731 GGGCTCAGCTTCAGAAAGTCTGAGTTGGCAGTTTCTTCTGTCCACAAAGAGGTTCAATGTGGACCAGCTGAACATGT

STAT3 NM_00315 TCACATGCCACTTGGTGGTTTATAATCTCTGGAGAGATTGACCCAGCAGTATAGCCGCTCTGTCGCAAG

TBP NM_00319 GCCGAAACGCCGATATAATCCAAAGCGGTTTGTGCGGTAATCATGAGGATAAGAGACCAGC

TK1 NM_00325 CCCGGGAACCCGTAATTGTGGCTGCACCTGGATGGACCTCCAGAGGAAGCCATTTGGGGCCATCTGAACTCTGGCCCTG

TP53BP1 NM_00565 TGCTGTGCTGAGTCTGTTGCCAGTCCCAGAAAGACCATGTCTGTGTGAGCTGTATCTGTGAAGCCAGGCAAG

TUBB NM_00106 TGTGGTGAAGGAGGTCAGAGCTGTGACTGTCTCCAGGBCCTCCAGCTGACCCACTCTCTGGG

VCAM1 NM_00107 TGGCTTCAGGAGTGAATCCCTCCAGGCACACAGGTTGGGACACAATAAGGGTTTTGGAACCACTATTTCTCATCACGACAGCA

Wnt-5b NM_00338 GTATCAGGACCACATGAGTACATCGGAGAAAGGCCGCAAGGATGCAAGGATGCCAGTATCAATCCCGACA

ZNF38 NM_14591 TTTGCCAAACATCAGCGAGTCCACACTGGAGAGGGGAAGCACCCGTAACCTTTCAAGCGCTCCTGTT

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de predicción de la respuesta a la quimioterapia de un sujeto diagnosticado de cáncer, conteniendo la determinación del nivel de expresión de uno o más transcritos de ARN de pronóstico o sus productos de expresión, en una muestra biológica comprendiendo células cancerosas obtenidas de dicho sujeto, donde el transcrito de ARN predictivo es el

- transcrito de uno o más genes seleccionados del grupo compuesto por TBP; ILT.2; ABCC5; CD18; GATA3; DICER1; MSH3; GBP1; IRS1; CD3z; fasl; TUBB; BAD; ERCC1; MCM6; PR; APC; GGPS1; KRT18; ESRRG; E2F1; AKT2; A.Catenina; CEGP1; NPD009; MAPK14; RUNX1; ID2; G.Catenina; FBX05; FHIT; MTA1; ERBB4; FUS; BBC3; IGF1R; CD9; TP53BP1; MUC1; IGFBP5; rhoC; RALBP1; CDC20; STAT3; ERK1; HLA.DPB1; SGCB; CGA; DHPS; MGMT; CRIP2; MMP12; ErbB3; RAP1GDS1; CDC25B; IL6; CCND1; CYBA; PRKCD; DR4; Hepsina; CRABP1; AK055699; Contig.51037; VCAM1; FYN; GRB7; AKAP.2; RASSF1; MCP1; ZNF38; MCM2; GBP2; SEMA3F; CD31; COL1A1; ER2; BAG1; AKT1; COL1A2; STAT1; Wnt.5a; PTPD1; RAB6C; TK1, ErbB2, CCNB1, BIRC5, STK6, MKI67, MYBL2, MMP11, CTSL2, CD68, GSTM1, BCL2, ESR1 donde
- 5
- 10 (a) por cada unidad de expresión aumentada de uno o más de ILT.2; CD18; GBP1; CD3z; fasl; MCM6; E2F1; ID2; FBX05; 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 ERBB2, CCNB1, BIRC5, STK6, MKI67, MYBL2,
- 15 MMP11, CTSL2 y CD68; o el correspondiente producto de expresión, se prevé que dicho sujeto tenga una mayor probabilidad de respuesta a la quimioterapia; y
- 20 (b) por cada unidad de expresión aumentada de uno o más de TBP; ABCC5; 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; IGFBP5; rhoC; RALBP1; STAT3; ERK.1; SGCB; DHPS; MGMT; CRIP2; ErbB3; RAP1GDS1; CCND1; PRKCD; Hepsina; AK055699; ZNF38; SEMA3F; COL1A1; BAG1; AKT1; COL1A2; Wnt.5a; PTPD1; RAB6C; GSTM1, BCL2, ESR1; o el correspondiente producto de expresión, se prevé que dicho sujeto tenga una menor probabilidad de respuesta a la quimioterapia.
- 25 El transcrito de ARN predictivo puede ser el transcrito de uno o más genes seleccionados del grupo compuesto por TBP; ILT.2; ABCC5; CD18; GATA3; DICER1; MSH3; GBP1; IRS1; CD3z; fesi; TUBB; BAD; ERCC1; MCM6; PR; APC; GGPS1; KRT18; ESRRG; E2F1; AKT2; A.Catenina; CEGP1; NPD009; MAPK14; RUNX1; ID2; G.Catenina; FBX05; FHIT; MTA1; ERBB4; PUS; BBC3; IGF1R; CD9; TP53BP1; MUC1; IGFBP5; rhoC; RALBP1; CDC20; STAT3; ERK1; HLA.DPB1; SGCB; CGA; DHPS; MGMT; CRIP2; MMP12; ErbB3; RAP1GDS1; CDC25B; IL6; CCND1; CYBA; PRKCD; DR4; Hepsina; CRABP1; AK055699; Contig.51037; VCAM1; FYN; GRB7; AKAP.2; RASSF1; MCP1; ZNF38; MCM2; GBP2; SEMA3F; CD31; COL1A1; ER2; BAG1; AKT1; COL1A2; STAT1; Wnt.5a; PTPD1; RAB6C; y TK1.
- 30 La respuesta puede ser una respuesta patológica completa.
El sujeto puede ser un paciente humano.
- 35 El cáncer puede ser seleccionado del grupo compuesto por cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de pulmón.
El cáncer puede ser cáncer de mama invasivo.
El cáncer puede ser cáncer de mama de estadio II o estadio III.
La quimioterapia puede ser quimioterapia adyuvante.
- 40 La quimioterapia puede ser quimioterapia neoadyuvante.
La quimioterapia neoadyuvante puede comprender la administración de un derivado de taxano.
El taxano puede ser docetaxel o paclitaxel.
La quimioterapia puede comprender además la administración de un agente anticáncer adicional.
El agente anticáncer adicional puede ser un miembro de la clase de agentes anticáncer de las
- 45 antraciclinas.
El agente anticáncer adicional puede ser doxorubicina.
El agente anticáncer adicional puede ser un inhibidor de la topoisomerasa.
- 50 El método puede comprender la determinación de los niveles de expresión de por lo menos dos de dichos transcritos de pronóstico de sus productos de expresión.
El método puede comprender la determinación de los niveles de expresión de por lo menos cinco de dichos transcritos de pronóstico de sus productos de expresión.
El método puede comprender la determinación de los niveles de expresión de todos los transcritos de pronóstico mencionados, o sus productos de expresión.
- 55 La muestra biológica puede ser una muestra de tejido comprendiendo células cancerosas.
El tejido puede ser fijado, embebido en parafina, o fresco, o congelado.
El tejido puede proceder de una biopsia por aspiración con aguja fina, punción con aguja gruesa u otros tipos de biopsia.
La muestra de tejido puede obtenerse por aspiración con aguja fina, lavado bronquial o biopsia transbronquial.
- 60 El nivel de expresión de dicho transcrito o transcritos de ARN de pronóstico puede ser determinado por RT-PCR u otro método basado en PCR.
El nivel de expresión de dicho producto o productos de expresión puede ser determinado por inmunohistoquímica.
- 65 El nivel de expresión de dicho producto o productos de expresión puede ser determinado por técnicas proteómicas.
El ensayo para la medición de dichos transcritos de ARN de pronóstico o sus productos de expresión

puede proporcionarse en forma de un kit o kits.

El transcrito predictivo puede comprender una secuencia basada en intrón, cuya expresión se correlacione con la expresión de una secuencia de exón correspondiente.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un conjunto de polinucleótidos que hibridan con varios de los siguientes genes: TBP; 1LT.2; ABCC5; CD18; GATA3; DICER1; MSH3; GBP1; IRS1; CD3z; fasl; TUBB; BAD; ERCC1; MCM6; PR; APC; GGPS1; KRT18; ESRRG; E2F1; AKT2; A.Catenina; CEGP1; NPD009; MAPK14; RUNX1; ID2; G.Catenina; FBX05; FHIT; MTA1; ERBB4; FUS; BBC3; IGF1R; CD9; TP53BP1; MUC1; IGFBP5; rhoC; RALBP1; CDC20; STAT3; ERK1; HLA.DPB1; SGCB; CGA; DHPS; MGMT; CRIP2; MMP12; ErbB3; RAPIGDS1; CDC25B; IL6; CCND1; CYBA; PRKCD; DR4; Hepsina; CRABP1; AK055699; Contig.51037; VCAM1; FYN; GRB7; AKAP.2; RASSF1; MCP1; ZNF38; MCM2; GBP2; SEMA3F; CD31; COL1A1; ER2; BAG1; AKT1; COL1A2; STAT1; Wnt5a; PTPD1; RAB6C; TK1, ErbB2, CCNB1, BIRC5, STK6, MKI67, MYBL2, MMP11, CTSL2, CD68, GSTM1, BCL2, ESR1.

La serie puede comprender polinucleótidos que hibridan con la mayoría de los siguientes genes: TBP; 1LT.2; ABCC5; CD18; GATA3; DICER1; MSH3; GBP1; IRS1; CD3z; fasl; TUBB; BAD; ERCC1; MCM6; PR; APC; GGPS1; KRT18; ESRRG; E2F1; AKT2; A.Catenina; CEGP1; NPD009; MAPK14; RUNX1; ID2; G.Catenina; FBX05; FHIT; MTA1; ERBB4; FUS; BBC3; IGF1R; CD9; TP53BP1; MUC1; IGFBP5; rhoC; RALBP1; CDC20; STAT3; ERK1; HLA.DPB1; SGCB; CGA; DHPS; MGMT; CRIP2; MMP12; ErbB3; RAPIGDS1; CDC25B; IL6; CCND1; CYBA; PRKCD; DR4; Hepsina; CRABP1; AK055699; Contig.51037; VCAM1; FYN; GRB7; AKAP.2; RASSF1; MCP1; ZNF38; MCM2; GBP2; SEMA3F; CD31; COL1A1; ER2; BAG1; AKT1; COL1A2; STAT1; Wnt5a; PTPD1; RAB6C; TK1.

La serie puede comprender polinucleótidos que hibridan con la mayoría de los siguientes genes: 1LT.2; CD18; GBP1; CD3z; fasl; MCM6; E2F1; ID2; FBX05; CDC20; HLA.DPB1; CGA; MMP12; CDC25B; EL6; CYBA; DR4; CRABP1; Contig.51037; VCAM1; FYN; GRB7; AKAP.2; RASSF1; MCP1; MCM2; GBP2; CD31; ER2; STAT1; TK1; ERBB2, CCNB1, BIRC5, STK6, MKI67, MYBL2, MMP11, CTSL2 y CD68.

La serie puede comprender polinucleótidos que hibridan con la mayoría de los siguientes genes: 1LT.2; CD18; GBP1; CD3z; fasl; MCM6; E2F1; ID2; FBX05; 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.

La serie puede comprender polinucleótidos que hibridan con la mayoría de los siguientes genes: TBP; ABCC5; 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; IGFBP5; rhoC; RALBP1; STAT3; ERK1; SGCB; DHPS; MGMT; CRIP2; ErbB3; RAPIGDS1; CCND1; PRKCD; Hepsina; AK055699; ZNF38; SEMA3F; COL1A1; BAG1; AKT1; COL1A2; Wnt.5a; PTPD1; RAB6C; GSTM1, BCL2, ESR1.

La serie puede comprender polinucleótidos que hibridan con la mayoría de los siguientes genes: TBP; ABCC5; 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; IGFBP5; rhoC; RALBP1; STAT3; ERK1; SGCB; DHPS; MGMT; CRIP2; ErbB3; RAPIGDS1; CCND1; PRKCD; Hepsina; AK055699; ZNF38; SEMA3F; COL1A1; BAG1; AKT1; COL1A2; Wnt.5a; PTPD1; RAB6C.

La serie puede comprender por lo menos cinco de dichos polinucleótidos.

La serie puede comprender por lo menos 10 de dichos polinucleótidos.

La serie puede comprender por lo menos 15 de dichos polinucleótidos.

La serie puede comprender polinucleótidos que hibridan con todos los genes mencionados.

La serie puede comprender más de un polinucleótido que hibridan con el mismo gen.

Por lo menos uno de los polinucleótidos mencionados puede comprender una secuencia basada en intrón, cuya expresión se correlaciona con la expresión de una secuencia de exón correspondiente.

Los polinucleótidos pueden ser ADNc.

Los polinucleótidos pueden ser oligonucleótidos.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de preparación de un perfil genómico personalizado para un paciente, comprendiendo los siguientes pasos:

- a) determinar los niveles de expresión normalizados de los transcritos de ARN o los productos de expresión de un gen o conjunto de genes seleccionados del grupo consistente en TBP; 1LT.2; ABCC5; CD18; GATA3; DICER1; MSH3; GBP1; IRS1; CD3z; fasl; TUBB; BAD; ERCC1; MCM6; PR; APC; GGPS1; KRT18; ESRRG; E2F1; AKT2; A.Catenina; CEGP1; NPD009; MAPK14; RUNX1; ID2; G.Catenina; FBX05; FHIT; MTA1; ERBB4; FUS; BBC3; IGF1R; CD9; TP53BP1; MUC1; IGFBP5; rhoC; RALBP1; CDC20; STAT3; ERK1; HLA.DPB1; SGCB; CGA; DHPS; MGMT; CRIP2; MMP12; ErbB3; RAPIGDS1; CDC25B; IL6; CCND1; CYBA; PRKCD; DR4; Hepsina; CRABP1; AK055699; Contig.51037; VCAM1; FYN; GRB7; AKAP.2; RASSF1; MCP1; ZNF38; MCM2; GBP2; SEMA3F; CD31; COL1A1; ER2; BAG1; AKT1; COL1A2; STAT1; Wnt.5a; PTPD1; RAB6C; TK1, ErbB2, CCNB1, BIRC5, STK6, MKI67, MYBL2, MMP11, CTSL2, CD68, GSTM1, BCL2, ESR1, en una célula cancerosa obtenida de dicho paciente, y
- b) crear un informe que recoja los datos obtenidos por dicho análisis de expresión génica.

La célula cancerosa puede obtenerse de un tumor sólido.

El tumor sólido puede ser seleccionado de entre un grupo compuesto por cáncer de mama, cáncer de

ovario, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de pulmón. La célula cancerosa puede ser obtenida de una muestra de biopsia fijada, embebida en parafina, de dicho tumor.

El ARN puede ser fragmentado.

- 5 El informe puede incluir la recomendación de una modalidad de tratamiento para dicho paciente. En una realización del método, si se determina la expresión aumentada de uno o más de ILT.2; CD18; GBP1; CD3z; fasI; MCM6; E2F1; ED2; FBX05; 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; ERBB2, CCNB1, BJRC5, STK6, MKI67, MYBL2, MMP11, CTSL2 y CD68; o el correspondiente producto de expresión, dicho informe incluye la predicción de que dicho sujeto tiene una mayor probabilidad de respuesta a la quimioterapia.

El método puede comprender el paso de tratar a dicho paciente con un agente quimioterapéutico.

El paciente puede ser sometido a quimioterapia adyuvante.

El paciente puede ser sometido a quimioterapia neoadyuvante.

- 15 La quimioterapia neoadyuvante puede comprender la administración de un derivado de taxano.

El taxano puede ser docetaxel o paclitaxel.

La quimioterapia puede comprender además la administración de un agente anticáncer adicional.

El agente anticáncer adicional puede ser un miembro de la clase de agentes anticáncer de las antraciclina.

- 20 El agente anticáncer es doxorubicina.

El agente anticáncer adicional puede ser un inhibidor de la topoisomerasa.

En una realización del método si se determina una expresión aumentada de uno o más de TBP; ABCC5; GATA3; DICER1; MSH3; IRS1; TUBB; BAD; ERCC1; PR; APC; GGPS1; KRT18; BSRRG; AKT2; A.Catenina; CEGP1; NPD009; MAPK14; RUNX1; G.Catenina; FHIT; MTA1; EibB4; FUS; BBC3; IGF1R; CD9; TP53BP1; MUC1; IGFBP5; rhoC; RALBP1; STAT3; ERK1; SGCB; DHPS; MGMT; CRIP2; ErbB3; RAPIGDSI; CCND1; PRKCD; Hepsina; AK055699; ZNF38; SEMA3F; BAG1; AKT1; COL1A2; Wnt.5a; PTPD1; RAB6C; GSTM1, BCL2, ESR1; o el correspondiente producto de expresión, dicho informe incluye la predicción de que dicho sujeto tiene una menor probabilidad de respuesta a la quimioterapia.

- 30 El transcrito de ARN puede comprender una secuencia basada en intrón, cuya expresión se correlaciona con la expresión de una secuencia de exón correspondiente.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar la probabilidad de respuesta de un paciente a la quimioterapia, comprendiendo:

- 35 (a) determinar los niveles de expresión de los transcritos de ARN de los siguientes genes ACTB, BAG1, BCL2, CCNB1, CD68, SCUBE2, CTSL2, ESR1, GAPD, GRB7, GSTM1, GUSB, ERBB2, MKI67, MYBL2, PGR, RPLPO, STK6, MMP11, BIRC5, TFRC, o sus productos de expresión, y
(b) calcular la puntuación de recurrencia (RS).

- 40 En una realización, los pacientes con una RS > 50 están situados en el percentil 50 superior de los pacientes con probabilidad de respuesta a la quimioterapia.

En una realización, los pacientes con una RS < 35 se sitúan en el percentil 50 inferior de los pacientes con probabilidad de respuesta a la quimioterapia.

La RS puede ser determinada por los siguientes subconjuntos de genes:

- 45 (i) subconjunto de factor de crecimiento: GRB7 y HER2;
(ii) subconjunto de receptor estrogénico: ER, PR, Bcl2, y CEGP1;
(iii) subconjunto de proliferación: SURV, Ki.67, MYBL2, CCNB1, y STK15; y
(iv) subconjunto de invasión: CTSL2, y STMY3;

- 50 donde un gen en cualquiera de los subconjuntos (i)-(iv) puede ser sustituido por un gen sustituto que coexpresa con dicho gen en dicho tumor con un coeficiente de correlación de Pearson $\geq 0,40$; y calcular la puntuación de recurrencia (RS) para dicho sujeto ponderando las contribuciones de cada uno de los subconjuntos (i) - (iv), a la recurrencia del cáncer de mama.

- 55 El método puede comprender además la determinación de los transcritos de ARN de CD68, GSTM1 y BAG1 o sus productos de expresión, o los genes sustitutos correspondientes o sus productos de expresión, incluyendo la contribución de tales genes o genes sustitutos a la recurrencia del cáncer de mama en el cálculo de la RS.

La RS puede determinarse aplicando la siguiente ecuación:

- 60
$$RS = (0,23 \text{ a } 0,70) \times \text{umbr eje GRB7} - (0,17 \text{ a } 0,55) \times \text{eje ER} + (0,52 \text{ a } 1,56) \times \text{umbr eje prolif.} + (0,07 \text{ a } 0,21) \times \text{eje invasión} + (0,03 \text{ a } 0,15) \times \text{CD68} - (0,04 \text{ a } 0,25) \times \text{GSTM1} - (0,05 \text{ a } 0,22) \times \text{BAG1}$$

- 65 Donde

$$I) \text{ eje GKB7} = (0,45 \text{ a } 1,35) \times \text{GRB7} + (0,05 \text{ a } 0,15) \times \text{HER2};$$

ES 2 636 470 T3

- II) si eje GRB7 < -2, umbr eje GRB7 = -2, y si eje GRB7 ≥ -2, umbr eje GRB7 = eje GRB7;
III) eje ER = (Est1 + PR + Bcl2 + CEGP1)/4;
IV) eje prolif = (SURV + Ki.67 + MYBL2 + CCNB1 + STK15)/5;
V) si eje prolif < -3,5, umbr eje prolif = -3,5, si eje prolif ≥ -3,5, umbr eje prolif = eje prolif; y
VI) eje invasión = (CTSL2 + STMY3)/2,3

donde las contribuciones individuales de los genes de (iii), (iv) y (vi) son ponderados por un factor de ponderación de 0,5 a 1,5, y donde una RS mayor representa una mayor probabilidad de recurrencia del cáncer de mama.

La RS se puede determinar aplicando la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{RS (rango, 0 -100)} = & +0,47x \text{ Puntuación Grupo HER2} \\ & - 0,34 x \text{ Puntuación Grupo ER} \\ & + 1,04 x \text{ Puntuación Grupo Proliferación} \\ & + 0,10 x \text{ Puntuación Grupo Invasión} \\ & + 0,05 x \text{ CD68} \\ & - 0,08 x \text{ GSTM1} \\ & - 0,07 x \text{ BAG1} \end{aligned}$$

El transcrito de ARN puede comprender una secuencia basada en intrón, cuya expresión correlaciona con la expresión de una secuencia de exón correspondiente.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de predicción de la respuesta a la quimioterapia de un sujeto diagnosticado de cáncer, comprendiendo la determinación del nivel de expresión de un transcrito de ARN de pronóstico o su producto de expresión, en una muestra biológica conteniendo células cancerosas obtenidas de dicho sujeto, donde el transcrito de ARN predictivo es el transcrito de BAG1, donde por cada unidad de expresión aumentada de BAG1 o el producto de expresión correspondiente, se prevé que dicho sujeto tenga una menor probabilidad de respuesta a la quimioterapia. El cáncer puede ser cáncer de mama y/o el sujeto puede ser un paciente humano.

La quimioterapia puede ser quimioterapia neoadyuvante, especialmente donde dicha quimioterapia neoadyuvante comprende la administración de un miembro o miembros de la clase de agentes anticáncer de las antraciclinas.

La quimioterapia neoadyuvante puede comprender la administración de doxorubicina.

La quimioterapia neoadyuvante puede comprender la administración de un derivado del taxano, en especial donde el taxano es docetaxel y/o paclitaxel.

La muestra biológica puede ser fijada, embebida en parafina, o fresca o congelada.

El ARN puede ser aislado de una muestra de tejido de cáncer de mama fijada, embebida en parafina, de dicho paciente.

La respuesta positiva puede ser una respuesta clínica completa.

La respuesta positiva puede ser una respuesta patológica completa.

El nivel de expresión de dicho transcrito de ARN puede ser determinado por RT-PCR.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la determinación de la probabilidad de respuesta de un paciente a la quimioterapia, comprendiendo:

- (a) determinación de los niveles de expresión de los transcritos de ARN de los siguientes genes BAG1, ACTB, BCL2, CCNB1, CD68, SCUBE2, CTSL2, ESR1, GAPD, GRB7, GSTM1, GUSB, ERBB2, MKI67, MYBL2, PGR, RPLPO, STK6, MMP11, BIRC5, TFRC, o sus productos de expresión, y
b) cálculo de la puntuación de recurrencia (RS).

La RS puede determinarse creando los siguientes subconjuntos de genes:

- I) subconjunto de factor de crecimiento: GRB7 y HER2;
II) subconjunto de receptor estrogénico: ER, PR, Bcl2, y CEGPI;
III) subconjunto de proliferación: SURV, Ki.67, MYBL2, CCNB1, y STK15; y
IV) subconjunto de invasión: CTSL2, y STMY3;

donde un gen en cualquiera de los subconjuntos (i)-(iv) puede ser sustituido por un gen sustituto que coexpresa con dicho gen en dicho tumor con un coeficiente de correlación de Pearson de ≥ 0,40; y calcular la RS de dicho sujeto ponderando las contribuciones de cada subconjunto (i)-(iv) a la recurrencia del cáncer de mama.

El método puede comprender además la determinación de los transcritos de ARN de CD68, GSTM1 y BAG1, o sus productos de expresión, o los correspondientes genes sustituto o sus productos de expresión, e incluyendo la contribución de dichos genes o genes sustituto a la recurrencia del cáncer de mama en el cálculo de la RS.

La RS puede determinarse aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{RS} = (0,23 \text{ a } 0,70) x \text{ umbr eje GRB7} - (0,17 \text{ a } 0,55) x \text{ eje ER} + (0,52 \text{ a } 1,56) x \text{ umbr eje prolif} + (0,07 \text{ a } 0,21) x \text{ eje invasión} + (0,03 \text{ a } 0,15) x \text{ CD68} - (0,04 \text{ a } 0,25) x \text{ GSTM1} - (0,05 \text{ a } 0,22) x \text{ BAG1}$$

Donde

- (I) eje GRB7 = (0,45 a 1,35) x GRB7 + (0,05 a 0,15) x HER2;
 (II) si eje GRB7 < -2, umbr eje GRB7 = -2, y si eje GRB7 ≥ -2, umbr eje GRB7 = eje GRB7;
 (III) eje ER = (Est1 + PR + Bcl2 + CEGP1)/4;
 (IV) eje prolifer = (SURV + Ki.67 + MYBL2 + CCNB1 + STK15)/5;
 (V) si eje prolifer < -3,5, umbr eje prolifer = -3,5, si eje prolifer ≥ -3,5, umbr eje prolifer = eje prolifer; y
 (VI) eje invasión = (CTSL2 + STMY3)/2,
 donde las contribuciones individuales de los genes en (iii), (iv) y (vi) son ponderadas por un factor de 0,5 a 1,5, y donde una RS mayor representa una mayor probabilidad de recurrencia del cáncer de mama.
 La RS puede ser determinada aplicando la siguiente ecuación:

$$RS \text{ (rango, 0 - 100)} = + 0,47 \times \text{Puntuación Grupo HER2} \\
 - 0,34 \times \text{Puntuación Grupo ER} \\
 + 1,04 \times \text{Puntuación Grupo Proliferación} \\
 + 0,10 \times \text{Puntuación Grupo Invasión} \\
 + 0,05 \times \text{CD68} \\
 - 0,08 \times \text{GSTM1} \\
 - 0,07 \times \text{BAG1}$$

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> GENOMIC HEALTH, INC.
 FONDAZIONE IRCCS ISTITUTO NAZIONALE DEI TUMORI
- <120> MARCADORES DE EXPRESIÓN GÉNICA PARA LA PREDICCIÓN DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA
- <130> KE/N32061
- <140> Divisional de 09014283.7
 <141> 2005-04-07
- <150> EE UU 60/561,035
 <151> 2004-04-09
- <160> 340
 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético
- <400> 1**
cggtccgatc ctctatactg cat **23**
- <210>2
 <211>22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético
- <400> 2**
agggtccctgt tggccttata gg **22**
- <210> 3
 <211> 25

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 3		
	atgcctacag caccctgatg tcgca		25
	<210> 4		
10	<211>20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
15	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 4		
	tgcagactgt accatgctga		20
	<210> 5		
20	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 5		
	ggccagcacc ataatcctat		20
	<210> 6		
30	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213>Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223>Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 6		
	ctgcacacgg ttctaggctc cg		22
	<210> 7		
40	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213>Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223>Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 7		
	ctgcatgtga ttgaataaga aacaaga		27
	<210> 8		
50	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213>Secuencia artificial		
	<220>		
55	<223>Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 8		
	tgtggacctg atccctgtac ac		22

	<210> 9	
	<211> 23	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 9	
10	tgaccacacc aaagcctccc tgg	23
	<210>10	
	<211>20	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 10	
20	acgaattgct ggtgaggtct	20
	<210>11	
	<211>20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 11	
30	gtccatgctg aatcattgg	20
	<210> 12	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 12	
40	caggatacca cagtcctgga gaccc	25
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 13	
50	cgcttctatg gcgctgagat	20
	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Synthetic Oligonucleotide Reverse Primer	

	<400> 14 tccccgtaca ccacgttctt	20
	<210> 15 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 15 cagccctgga ctacctgcac tcgg	24
10	<210> 16 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 16 tcctgccacc cttcaaacc	19
20	<210> 17 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 17 ggcggtaaat tcatcatcga a	21
30	<210> 18 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 18 caggtcacgt ccgaggtcga caca	24
40	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 19 ggacagcagg aatgtgtttc	20
45	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	

	<400> 20	
	accactcga ttgtttctg	20
	<210> 21	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 21	
	cattggctcc ccgtgacctg ta	22
10	<210> 22	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 22	
	gggtcaggtg cctcgagat	19
20	<210> 23	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 23	
	ctgctcactc ggctcaaact c	21
30	<210> 24	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 24	
	tgggccaga gcatgttcca gatc	24
40	<210> 25	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 25	
	cgttgtcagc acttgaata caa	23
50	<210> 26	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

<223>Cebador inverso de oligonucleótido sintético

<400> 26

gttcaacctc ttcctgtgga ctgt

24

<210> 27

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda sintética de oligonucleótido

<400> 27

cccaattaac atgacccggc aaccat

26

<210> 28

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético

<400> 28

cctggagggt cctgtacaat

20

<210> 29

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>Cebador inverso de oligonucleótido sintético

<400> 29

ctaattgggc tccatctcg

19

<210> 30

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda sintética de oligonucleótido

<400> 30

catcatggga ctccctgccct tacc

24

<210> 31

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético

<400> 31

cagatggacc tagtaccac tgaga

25

<210> 32

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

	<223>Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 32	
	cctatgattt aaggcattt ttcc	24
5	<210> 33 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 33	
	ttccacgccg aaggacagcg at	22
15	<210> 34 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 34	
	gcatgttcgt ggcctctaag a	21
25	<210> 35 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
30	<400> 35	
	cggtgtagat gcacagcttc tc	22
35	<210> 36 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido	
40	<400> 36	
	aaggagacca tccccctgac ggc	23
45	<210> 37 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
50	<400> 37	
	cgtcaggacc caccatgtct	20
55	<210> 38 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 38	
	ggttaattgg tgacatcctc aaga	24
5	<210> 39 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 39	
	cgcgggccgag acatggcttg	20
15	<210> 40 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 40	
	tgtatttcaa gacctctgtg cactt	25
25	<210> 41 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 41	
30	ttagcctgag gaattgctgt gtt	23
35	<210> 42 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 42	
40	tttatgaacc tgccctgctc ccaca	25
45	<210> 43 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 43	
50	agatgaagtg gaaggcgctt	20
55	<210> 44 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223>	Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400>	44	
		tgcctctgta atcggcaact g	21
5	<210>	45	
	<211>	18	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
10	<220>		
	<223>	Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400>	45	
		caccgcggcc atcctgca	18
15	<210>	46	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
20	<220>		
	<223>	Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400>	46	
		gggcgtggaa cagtttatct	20
25	<210>	47	
	<211>	19	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
30	<220>		
	<223>	Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400>	47	
		cacggtgaag gtttcgagt	19
35	<210>	48	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
40	<220>		
	<223>	Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400>	48	
		agacatctgc cccaagaagg acgt	24
45	<210>	49	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
50	<220>		
	<223>	Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400>	49	
		tggattggag ttctgggaat g	21
	<210>	50	
	<211>	22	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	

	<220> <223>Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 50 gcttgactc cacaggtaca ca	22
5	<210> 51 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 51 actggcctg gcactggaca aca	23
15	<210> 52 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 52 aaacgagcag ttgcatca g	21
25	<210> 53 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223>Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 53 gttggtgatg ttccgaagca	20
35	<210> 54 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 54 cctcaccggc atagactgga agcg	24
45	<210> 55 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 55 tgacaatcag cacacctgca t	21
50	<210> 56 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55		

	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 56		
	tgtgactaca gccgtgatcc tta		23
5	<210> 57		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 57		
	caggccctct tccgagcgg		20
15	<210> 58		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 58		
	ctgaaggagc tccaagacct		20
25	<210> 59		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 59		
	caaaaccgct gtgtttcttc		20
35	<210> 60		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 60		
	tgctgatgtg cctctcctt gg		22
45	<210> 61		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 61		
	gtggccatcc agctgacc		18
55	<210> 62		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		

	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 62	
	cagtggtagg tgatggttctg gga	23
5	<210> 63 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 63	
	tcctgcgct gatgtccacc g	21
15	<210> 64 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 64	
20	cagccaagaa ctggtatagg agct	24
25	<210> 65 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 65	
30	aaactggctg ccagcattg	19
	<210> 66 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<400> 66	
35	tctcctagcc agacgtgttt cttgtccttg	30
40	<210> 67 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 67	
45	cgacagttgc gatgaaagtt ctaa	24
	<210> 68 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 68	
	ggctgctaga gaccatggac at	22

	<210> 69	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 69	
	cctcctcctg ttgctgccac taatgct	27
	<210> 70	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<400> 70	
	aacttcaagg tcggagaagg	20
	<210> 71	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<400> 71	
	tggtctaaact cctgcacttg	20
	<210> 72	
30	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<220>	
	<400> 72	
35	ccgtccacgg tctcctcctc a	21
	<210> 73	
40	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<400> 73	
45	gtgctacgcc accctggt	18
	<210> 74	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<400> 74	
	caggggcttc tcgtagatgt	20
55	<210> 75	
	<211> 22	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 75	
	ccgatgttca cgcctttggg tc	22
	<210> 76	
	<211> 19	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223>Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 76	
	ggtgcctact ccattgtgg	19
	<210> 77	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223>Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 77	
	gtggagccct tcttcctatt	20
	<210> 78	
	<211> 24	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 78	
35	tactccagca ggcacacaaa cacg	24
	<210> 79	
	<211> 22	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 79	
	gggagaacgg gatcaatagg at	22
45	<210> 80	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223>Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 80	
	gcatcagcca gtcctcaaac t	21
	<210> 81	
55	<211> 24	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 81	
	ctcattgggc accagcaggt ttcc	24
	<210> 82	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 82	
	tccaattcca gcatcactgt	20
	<210> 83	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223>Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 83	
	ggcagtgaag gcgataaagt	20
25	<210> 84	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 84	
	agaaaagctg tttgtctccc cagca	25
35	<210> 85	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 85	
	tgcacagagg gtgtgggtta c	21
	<210> 86	
	<211> 28	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 86	
	tcttcatctg atttacaagc tgtacatg	28
	<210> 87	
	<211> 29	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 87		
5	caatgcttcc aacaatttgt ttgcttgcc		29
	<210>88		
	<211>20		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 88		
	actccctcta cccttgagca		20
15	<210> 89		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 89		
	caggcctcag ttccttcagt		20
25	<210> 90		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 90		
	cagaagaaca gctcagggac ccct		24
35	<210> 91		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 91		
	tgggccatcg ccagttatca		20
45	<210> 92		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 92		
	tgttctagcg atcttgcttc aca		23
55	<210> 93		
	<211> 30		

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 93	
	atctgtatgc ggaacctcaa aagagtcctt	30
	<210> 94	
	<211> 23	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 94	
	cggttatgtc atgccagata cac	23
	<210> 95	
	<211> 24	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 95	
	gaactgagac ccaactgaaga aagg	24
25	<210> 96	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 96	
	cctcaaagggt actccctcct cccgg	25
35	<210> 97	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 97	
	tggctcttaa tcagtttcgt tacct	25
45	<210> 98	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 98	
	caaggcatat cgatcctcat aaagt	25

	<210> 99	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 99	
	tgtcccacga ataatgcgta aattctccag	30
10	<210>100	
	<211>20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 100	
	gtccagggtgg atgtgaaaga	20
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 101	
	cggccaggat acacatctta	20
	<210> 102	
	<211> 21	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 102	
35	cagcaggccc tcaaggagct g	21
	<210> 103	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 103	
	acggatcaca gtggaggaag	20
45	<210> 104	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 104	
	ctcatccgtc gggtcatagt	20

ES 2 636 470 T3

	<210> 105	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 105	
	cgctggctca cccctacctg	20
10	<210> 106	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 106	
	ccagcaccat tgttgaagat	20
20	<210> 107	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 107	
	agtctcttgg gcatcgagtt	20
30	<210> 108	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 108	
	ccccagacca agtgtgaata catgct	26
40	<210> 109	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 109	
	gcactttggg attctttcca ttat	24
50	<210>110	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 110	
	gcatgtaaga agaccctcac tgaa	24
55	<210>111	

	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 111		
	acaacattct cggtgcctgt aacaaagaa		29
	<210> 112		
10	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
15	<223>Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 112		
	ggattgtaga ctgtcaccga aattc		25
	<210> 113		
	<211> 28		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 113		
	ggctattcct cattttctct acaaagtg		28
	<210> 114		
	<211> 30		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 114		
	cctccaggag gctaccttct tcatgttcac		30
	<210> 115		
	<211> 18		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 115		
	ccagtggagc gcttccat		18
	<210> 116		
	<211> 22		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
55	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 116		
	ctctctgggt cgtctgaaac aa		22

	<210> 117	
	<211> 23	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 117	
	tcggccactt catcaggacg cag	23
10	<210> 118	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 118	
	ggataattca gacaacaaca ccatct	26
	<210> 119	
	<211> 25	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 119	
	tgaagtaatc agccacagac tcaat	25
25	<210> 120	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 120	
	tcaattgtaa cattctcacc caggccttg	29
35	<210> 121	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 121	
	gaagcgcaga tcatgaagaa	20
	<210> 122	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 122	
	ctcctcagac accactgcat	20
50	<210> 123	
	<211> 24	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 123		
5	ctgaagcacg acaagctggt ccag		24
	<210> 124		
	<211> 19		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 124		
15	tcagcagcaa gggcatcat		19
	<210> 125		
	<211> 23		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 125		
25	ggtggtttttc ttgagcgtgt act		23
	<210> 126		
	<211> 19		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 126		
35	cgccccgagg cctcatcct		19
	<210> 127		
	<211> 23		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 127		
45	caaaggagct cactgtggtg tct		23
	<210> 128		
	<211> 26		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 128		
55	gagtcagaat ggcttattca cagatg		26
	<210> 129		

	<211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 129 tgttccaacc actgaatctg gacc	24
10	<210> 130 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 130 ttgggaaata tttgggcatt	20
20	<210> 131 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 131 agaagctagg gtggttgtcc	20
30	<210> 132 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 132 ttgggacatt gtagacttgg ccagac	26
40	<210> 133 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 133 gcatgggaac catcaacca	19
50	<210> 134 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	

	<400> 134		
	tgaggagttt gccttgattc g		21
	<210> 135		
	<211> 30		
5	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
10			
	<400> 135		
	ccatggacca acttcactat gtgacagagc		30
	<210> 136		
	<211> 18		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
20			
	<400> 136		
	ctccgacgtg gctttcca		18
	<210> 137		
	<211> 23		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
30			
	<400> 137		
	cgtaattggc agaattgatg aca		23
	<210> 138		
	<211> 25		
35	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
40			
	<400> 138		
	tggcccacag catctatgga atccc		25
	<210> 139		
	<211> 20		
45	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
50			
	<400> 139		
	ccatctgcat ccatcttggt		20
	<210> 140		
	<211> 20		

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 140	
	ggccaccagg gtattatctg	20
	<210> 141	
10	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 141	
	ctccccaccc ttgagaagtg cct	23
	<210> 142	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 142	
	aggctgctgg aggtcatctc	20
	<210> 143	
	<211> 19	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 143	
	cttcctgcgg ccacagtct	19
35	<210> 144	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 144	
	ccagaggccg tttcttgcc g	21
45	<210> 145	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 145	
	tccatgatgg ttctgcaggt t	21
	<210> 146	

	<211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 146 tgagcagcac catcagtaac g	21
10	<210> 147 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 147 ccccggacag tggctctgac g	21
20	<210> 148 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 148 aacgactgct actccaagct caa	23
30	<210> 149 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 149 ggatttccat cttgctcacc tt	22
40	<210> 150 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 150 tgcccagcat cccccagaac aa	22
50	<210> 151 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 151 gcatggtagc cgaagatttc a	21

ES 2 636 470 T3

	<210> 152	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 152	
	tttccggtaa tagtctgtct catagatac	30
10	<210> 153	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 153	
	cgcgtcatac caaatctcc gattttga	28
20	<210> 154	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 154	
	cctgaacctt ccaaagatgg	20
30	<210> 155	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 155	
	accaggcaag tctcctcatt	20
40	<210> 156	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 156	
	ccagattgga agcatccatc tttttca	27
50	<210> 157	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	

	<400> 157		
	agccatcact ctcagtgca		20
	<210> 158		
	<211> 20		
5	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 158		
10	actgcagagt cagggctctcc		20
	<210> 159		
	<211> 22		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 159		
20	caggtcctat cgtggcccct ga		22
	<210> 160		
	<211> 20		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223>Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 160		
30	ccacagctca ccttctgtca		20
	<210> 161		
	<211> 20		
35	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 161		
40	cctcagtgcc agtctcttcc		20
	<210> 162		
	<211> 20		
45	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 162		
50	tccatcccag ctccagccag		20
	<210> 163		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 163		
	agagatcgag gctctcaagg		20
5	<210> 164		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 164		
	ggccttttac ttcctcttcg		20
15	<210> 165		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 165		
	tggttcttct tcatgaagag cagctcc		27
25	<210> 166		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 166		
	tgagtggaaa agcctgacct atg		23
35	<210> 167		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 167		
	ggactccatc tcttcttggt caa		23
45	<210> 168		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 168		
	tgaagtcac agctttgtgc caccacc		27
55	<210> 169		
	<211> 21		

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 169		
	gacttttgcc cgctaccttt c		21
10	<210> 170		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 170		
	gccactaact gcttcagtat gaagag		26
20	<210> 171		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 171		
	acagctcatt gttgtcacgc cgga		24
30	<210> 172		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 172		
	tgatggtcct atgtgtcaca ttca		24
40	<210> 173		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 173		
	tgggacagga aacacaccaa		20
50	<210> 174		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 174		
	caggtttcat accaacacag gcttcagcac		30

5	<p><210> 175 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético</p>	
10	<p><400> 175 cgctcagcca gatgcaatc</p>	19
15	<p><210> 176 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético</p>	
20	<p><400> 176 gcactgagat cttcctattg gtgaa</p>	25
25	<p><210> 177 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido</p>	
30	<p><400> 177 tgccccagtc acctgctggt a</p>	21
35	<p><210> 178 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético</p>	
40	<p><400> 178 gtgaaatgaa acgcaccaca</p>	20
45	<p><210> 179 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético</p>	
50	<p><400> 179 gaccctgctc acaaccagac</p>	20
55	<p><210> 180 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido</p>	

	<400> 180 cagccctttg gggaagctgg	20
5	<210> 181 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 181 ccaacgcttg ccaaatcct	19
15	<210> 182 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 182 acggtagtga cagcatcaaa actc	24
25	<210> 183 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 183 aaccagctct ctgtgacccc aatt	24
35	<210> 184 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 184 tgattaccat catggctcag a	21
45	<210> 185 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 185 cttgtgaaaa tgccatccac	20
55	<210> 186 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 186		
5	tcccaattgt cgcttcttct gcag		24
	<210> 187		
	<211> 19		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223>Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 187		
15	ccgccctcac ctgaagaga		19
	<210> 188		
	<211> 22		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223>Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 188		
25	ggaataagtt agccgcgctt ct		22
	<210> 189		
	<211> 21		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 189		
35	cccagtgtcc gccaaaggagc g		21
	<210> 190		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 190		
45	ggccaggatc tgtggtgta		20
	<210> 191		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 191		
55	ctccacgtcg tggacattga		20
	<210> 192		
	<211> 23		
	<212> ADN		

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 192	
	ctctggcctt ccgagaaggt acc	23
	<210> 193	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 193	
	ggctgtggct gaggctgtag	20
	<210> 194	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 194	
	ggagcattcg aggtcaaatc a	21
	<210> 195	
30	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 195	
	ttcccagagt gtctcacctc cagcagag	28
	<210> 196	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 196	
	gcatcaggct gtcattatgg	20
	<210> 197	
50	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 197	
	agtagttgtg ctgcccttcc	20

	<210> 198	
	<211> 28	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 198	
	tgtccttacc tgtgggagct gtaaggtc	28
10		
	<210> 199	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 199	
	ctgacacttg ccgcagagaa	20
20		
	<210>200	
	<211>20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 200	
	aggtggtcct tggctctggaa	20
30		
	<210> 201	
	<211> 26	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 201	
	ccctttctca cccacctcat ctgcac	26
40		
	<210> 202	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 202	
	cgcttgctta actcatactt tcc	23
50		
	<210> 203	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	

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

	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 209		
	ttcga tattg ccagcagcta taaa		24
5	<210> 210		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 210		
	tgctgtc ctg tcggtctcag tacgttca		28
15	<210>211		
	<211>20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 211		
	tgtggat gct ggattgattt		20
25	<210> 212		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 212		
	aagcagc act tcctgg tctt		20
35	<210> 213		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 213		
	ccactggt gc agctgctaaa tagca		25
45	<210> 214		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 214		
	agtgggag ac acctgac ctt		20
55	<210> 215		

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

	<210> 221	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 221	
10	gtgatttgcc caggaagttt	20
	<210> 222	
	<211> 24	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 222	
20	ttggatctgc ttgctgtcca aacc	24
	<210> 223	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 223	
30	cgcgagcccc tcattataca	20
	<210> 224	
	<211> 19	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 224	
40	cactcgccgt tgacatcct	19
	<210> 225	
	<211> 22	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 225	
50	ctccccacag cgcacgagg aa	22
	<210> 226	
	<211> 23	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	

	<400> 226		
	cagtggagac cagttgggta gtg		23
5	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 227		
	ccttgaagag cgtcccatca		20
15	<210> 228 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 228		
	cacacatgca gagcttgtag cgtaccca		28
25	<210> 229 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 229		
	gggctcagct ttcagaagtg		20
35	<210> 230 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
40	<220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 230		
	acatgttcag ctggtccaca		20
45	<210> 231 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
50	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 231		
	tggcagtttt cttctgtcac caaaa		25
55	<210> 232 <211> 20 <212> ADN		

ES 2 636 470 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 232	
	tcacatgccca ctttgggtgtt	20
10	<210> 233	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 233	
	cttgcaggaa gcggctatac	20
20	<210> 234	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 234	
	tcctgggaga gattgaccag ca	22
30	<210> 235	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 235	
	gcccgaaacg ccgaatata	19
40	<210> 236	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 236	
	cgtggctctc ttatcctcat gat	23
50	<210> 237	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 237	
	taccgcagca aaccgcttgg g	21
	<210> 238	

	<211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 238 gccgggaaga ccgtaattgt	20
10	<210> 239 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 239 cagcggcacc aggttcag	18
20	<210> 240 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido	
	<400> 240 caaatggctt cctctggaag gtccca	26
30	<210> 241 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
	<400> 241 tgctgttgct gagtctgttg	20
40	<210> 242 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
	<400> 242 cttgcctggc ttcacagata	20
50	<210> 243 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Sonda sintética de oligonucleótido	

	<400> 243	
	ccagtcccca gaagaccatg tctg	24
	<210> 244	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
10		
	<400> 244	
	tgtggtgagg aaggagtcag	20
	<210> 245	
	<211> 18	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
20		
	<400> 245	
	cccagagagt gggtcagc	18
	<210> 246	
	<211> 24	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido	
30		
	<400> 246	
	ctgtgactgt ctccagggct tcca	24
	<210> 247	
	<211> 21	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético	
40		
	<400> 247	
	tggcttcagg agctgaatac c	21
	<210> 248	
	<211> 24	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético	
50		
	<400> 248	
	tgctgtcgtg atgagaaaat agtg	24
	<210> 249	
	<211> 26	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 249		
5	caggcacaca caggtgggac acaaat		26
	<210> 250		
	<211> 25		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 250		
15	gtatcaggac cacatgcagt acatc		25
	<210> 251		
	<211> 22		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 251		
25	tgtcgggaatt gatactggca tt		22
	<210> 252		
	<211> 24		
	<212> ADN		
30	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda sintética de oligonucleótido		
	<400> 252		
35	ttgatgcctg tcttcgcgcc ttct		24
	<210> 253		
	<211> 20		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo de oligonucleótido sintético		
	<400> 253		
45	tttccaaaca tcagcgagtc		20
	<210> 254		
	<211> 20		
	<212> ADN		
50	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso de oligonucleótido sintético		
	<400> 254		
55	aacaggagcg cttgaaagtt		20
	<210> 255		

ES 2 636 470 T3

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

5 **<400> 255**
 acggtgcttc tccctctcca gtg 23

10 <210> 256
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon

15 **<400> 256**
 cgttccgatc ctctatactg catcccaggc atgcctacag caccctgatg tcgcagccta 60
 taaggccaac agggacct 78

20 <210> 257
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon

25 **<400> 257**
 tgcagactgt accatgctga ccattgcccc tgcctgcac acggttctag gctccgatag 60
 gattatggtg ctggcc 76

30 <210> 258
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon

35 **<400> 258**
 ctgcatgtga ttgaataaga aacaagaaag tgaccacacc aaagcctccc tggctggtgt 60
 acagggatca ggtccaca 78

40 <210> 259
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon

45 **<400> 259**
 acgaattgtc ggtgaggtct caggatacca cagtccctgga gaccctatcc aatgatttca 60
 gcatggac 68

50 <210> 260
 <211> 71
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon

55 **<400> 260**
 cgcttctatg gcgctgagat tgtgtcagcc ctggactacc tgcaactcgga gaagaacgtg 60
 gtgtaccggg a 71

ES 2 636 470 T3

<210> 261
 <211> 71
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Amplicon
 <400> 261
 tcctgccacc cttcaaacct caggtcacgt ccgaggtcga cacaaggtac ttcgatgatg 60
 aatttaccgc c 71

10 <210> 262
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Amplicon
 <400> 262
 ggacagcagg aatgtgtttc tccatacagg tcacggggag ccaatggttc agaaacaaat 60
 cgagtgggt 69

20 <210> 263
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Amplicon
 <400> 263
 gggtcagggtg cctcgagatc gggcttgggc ccagagcatg ttccagatcc cagagtttga 60
 gccgagtgag cag 73

30 <210> 264
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Amplicon
 <400> 264
 cgttgtcagc acttgggaata caagatgggt gccgggtcat gttaattggg aaaaagaaca 60
 gtccacagga agaggttgaa c 81

40 <210> 265
 <211> 83
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Amplicon
 <400> 265
 cctggaggggt cctgtacaat ctcatcatgg gactcctgcc cttaccacagg ggccacagag 60
 cccccgagat ggagcccaat tag 83

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

ES 2 636 470 T3

<220>
<223> Amplicon

<400> 266

cagatggacc tagtaccac tgagatttcc acgccgaagg acagcgatgg gaaaaatgcc 60
cttaaactcat agg 73

5

<210> 267
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Amplicon

<400> 267

gcattgtcgt ggcctctaag atgaaggaga ccatccccct gacggccgag aagctgtgca 60
tctacaccg 69

15

<210> 268
<211> 81
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Amplicon

<400> 268

cgtcaggacc caccatgtct gcccatcac gcggccgaga catggcttgg ccacagctct 60
tgaggatgtc accaattaac c 81

25

<210> 269
<211> 75
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Amplicon

<400> 269

tgtatttcaa gacctctgtg cacttatta tgaacctgcc ctgctcccac agaacacagc 60
aattcctcag gctaa 75

35

<210> 270
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Amplicon

<400> 270

agatgaagtg gaaggcgctt ttcaccgcgg ccatcctgca ggcacagttg ccgattacag 60
aggca 65

45

<210> 271
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> Amplicon

ES 2 636 470 T3

<400> 271
 gggcgtggaa cagtttatct cagacatctg cccaagaag gacgtactcg aaaccttcac 60
 cgtg 64

<210> 272
 <211>68
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon
 10

<400> 272
 tggattggag ttctgggaat gtactggccg tggcactgga caacagtgtg tacctgtgga 60
 gtgcaagc 68

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

<220>
 <223> Amplicon
 20

<400> 273
 aaacgagcag tttgccatca gacgcttcca gtctatgccg gtgaggctgc tgggccacag 60
 ccccgctgctt cggaacatca ccaac 85

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

<220>
 <223> Amplicon
 30

<400> 274
 tgacaatcag cacacctgca ttcaccgctc ggaagagggc ctgagctgca tgaataagga 60
 tcacggctgt agtcaca 77

<210> 275
 <211> 76
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon
 40

<400> 275
 ctgaaggagc tccaagacct cgctctccaa ggcgccaagg agagggcaca tcagcagaag 60
 aaacacagcg gttttg 76

<210> 276
 <211>68
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon
 50

<400> 276
 gtggccatcc agctgacctt cctgcgcctg atgtccaccg aggctccca gaacatcacc 60
 taccactg 68

ES 2 636 470 T3

<210> 277
<211> 80
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon

<400> 277
cagccaagaa ctggtatagg agctccaagg acaagaaaca cgtctggcta ggagaaacta 60
tcaatgctgg cagccagttt 80

<210> 278
<211> 81
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon

<400> 278
cgacagttgc gatgaaagtt ctaatctctt cctcctcct gttgctgcca ctaatgctga 60
tgtccatggt ctctagcagc c 81

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

<220>
<223> Amplicon

<400> 279
aacttcaagg tcggagaagg ctttgaggag gagaccgtgg acggacgcaa gtgcaggagt 60
ttagcca 67

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

<220>
<223> Amplicon

<400> 280
gtgctacgcc accctgttcg gacccaaagg cgtgaacatc gggggcgcgg gctcctacat 60
ctacgagaag ccctg 76

<210> 281
<211> 77
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon

<400> 281
ggtgcctact ccattgtggc gggcgtgttt gtgtgcctgc tggagtacc cgggggaag 60
aggaagaagg gctccac 77

<210> 282
<211> 78
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

ES 2 636 470 T3

<220>
<223> Amplicon

<400> 282

5 gggagaacgg gatcaatagg atcggaaacc tgctggtgcc caatgagaat tactgcaagt 60
ttgaggactg gctgatgc 78

<210> 283
<211>68
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon

<400> 283

15 tccaattcca gcatcactgt ggagaaaagc tgtttgtctc cccagcatac tttatcgcct 60
tcactgcc 68

<210> 284
<211> 83
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon

<400> 284

25 tgcacagagg gtgtgggtta caccaatgct tccaacaatt tgtttgcttg cctcccatgt 60
acagcttgta aatcagatga aga 83

<210> 285
<211> 75
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon

<400> 285

35 actccctcta cccttgagca agggcagggg tccttgagct gttcttctgc cccatactga 60
aggaactgag gcctg 75

<210> 286
<211> 76
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon

<400> 286

45 tgggccatcg ccagttatca catctgtatg cggaacctca aaagagtccc tgggtggaag 60
caagatcgct agaaca 76

<210> 287
<211> 81
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 636 470 T3

<223> Amplicon

<400> 287

cggttatgtc atgccagata cacacctcaa aggtactccc tcctcccggg aaggcaccct 60
 ttcttcagtg ggtctcagtt c 81

5 <210> 288
 <211> 86
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Amplicon

<400> 288

tggctcttaa tcagtttcgt tacctgcctc tggagaattt acgcattatt cgtgggacaa 60
 aactttatga ggatcgatat gccttg 86

15 <210> 289
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Amplicon

<400> 289

gtccaggtgg atgtgaaaga tccccagcag gccctcaagg agctggctaa gatgtgtatc 60
 ctggccg 67

25 <210> 290
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Amplicon

<400> 290

acggatcaca gtggaggaag cgctggctca cccctacctg gagcagtact atgacccgac 60
 ggatgag 67

35 <210> 291
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Amplicon

<400> 291

ccagcaccat tgttgaagat ccccagacca agtgtgaata catgctcaac tcgatgccca 60
 agagact 67

45 <210> 292
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Amplicon

ES 2 636 470 T3

<400> 292

gcactttggg attctttcca ttatgattct ttgttacagc caccgagaat gttgtattca 60
gtgagggctc tcttacatgc 80

<210> 293

<211> 90

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicon

<400> 293

ggctattcct cttttctct acaaagtggc ctcagtgaac atgaagaagg tagcctcctg 60
gaggagaatt tcggtgacag tctacaatcc 90

<210> 294

<211> 67

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicon

<400> 294

ccagtggagc gcttccatga cctgcgtcct gatgaagtgg ccgatttggt tcagacgacc 60
cagagag 67

<210> 295

<211> 80

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicon

<400> 295

ggataattca gacaacaaca ccatctttgt gcaaggcctg ggtgagaatg ttacaattga 60
gtctgtggct gattacttca 80

<210> 296

<211> 69

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicon

<400> 296

gaagcgcaga tcatgaagaa gctgaagcac gacaagctgg tccagctcta tgcagtgggtg 60
tctgaggag 69

<210> 297

<211> 68

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicon

<400> 297

ES 2 636 470 T3

tcagcagcaa gggcatcatg gaggaggatg aggcctgogg gcgccagtac acgctcaaga 60
 aaaccacc 68

5 <210> 298
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon

10 <400> 298
 caaaggagct cactgtggtg tctgtgttcc aaccactgaa tctggacccc atctgtgaat 60
 aagccattct gactc 75

15 <210> 299
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon

20 <400> 299
 ttgggaaata tttgggcatt ggtctggcca agtctacaat gtcccaatat caaggacaac 60
 caccctagct tct 73

25 <210> 300
 <211> 83
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon

30 <400> 300
 gcatgggaac catcaaccag caggccatgg accaacttca ctatgtgaca gagctgacag 60
 atcgaatcaa ggcaaactcc tca 83

35 <210> 301
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon

40 <400> 301
 ctccgacgtg gctttccagt ggcccacagc atctatggaa tcccatctgt catcaattct 60
 gcccaattacg 70

45 <210> 302
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon

50

ES 2 636 470 T3

<400> 302

ccatctgcat ccatcttggt tgggctcccc acccttgaga agtgcctcag ataataccct 60
ggtggcc 67

<210> 303

<211> 84

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicon

10

<400> 303

aggctgctgg aggtcatctc cgtgtgtgat tgccccagag gccgtttctt ggccgcatc 60
tgccaagact gtggccgcag gaag 84

<210> 304

<211> 73

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicon

20

<400> 304

tccatgatgg ttctgcaggt ttctgcggcc ccccggacag tggctctgac ggcgttactg 60
atggtgctgc tca 73

<210> 305

<211> 76

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicon

30

<400> 305

aacgactgct actccaagct caaggagctg gtgcccagca tccccagaa caagaagggtg 60
agcaagatgg aaatcc 76

<210> 306

<211> 83

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicon

40

<400> 306

gcatggtagc cgaagatttc acagtcaaaa tcggagattt tggtatgacg cgagatatct 60
atgagacaga ctattaccgg aaa 83

<210> 307

<211> 72

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicon

ES 2 636 470 T3

<400> 307

cctgaacctt ccaaagatgg ctgaaaaaga tggatgcttc caatctggat tcaatgagga 60
gacttgcttg gt 72

<210> 308

<211> 63

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicon

<400> 308

agccatcact ctcagtgcag ccaggtccta tcgtggcccc tgaggagacc ctgactctgc 60
agt 63

10

<210> 309

<211> 74

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicon

<400> 309

ccacagctca ccttctgtca ggtgtccatc ccagctccag ccagctccca gagaggaaga 60
gactggcact gagg 74

20

<210> 310

<211>68

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicon

<400> 310

agagatcgag gctctcaagg aggagctgct cttcatgaag aagaaccacg aagaggaagt 60
aaaaggcc 68

30

<210> 311

<211> 76

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicon

<400> 311

tgagtggaaa agcctgacct atgatgaagt catcagcttt gtgccaccac cccttgacca 60
agaagagatg gagtcc 76

40

<210> 312

<211> 75

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicon

ES 2 636 470 T3

<400> 312
gacttttggc cgctaccttt cattccggcg tgacaacaat gagctgttgc ttttcatact 60
gaagcagtta gtggc 75

<210> 313
<211> 82
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon

10

<400> 313
tgatggtcct atgtgtcaca ttcacacag gtttcatacc aacacaggct tcagcacttc 60
ctttggtgtg tttcctgtcc ca 82

<210> 314
<211> 71
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon

20

<400> 314
cgctcagcca gatgcaatca atgccccagt cacctgctgt tataacttca ccaataggaa 60
gatctcagtg c 71

<210> 315
<211> 69
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon

30

<400> 315
gtgaaatgaa acgcaccaca ctggacagcc ctttggggaa gctggagctg tctggttgtg 60
agcagggtc 69

<210> 316
<211> 78
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon

40

<400> 316
ccaacgcttg ccaaatcctg acaattcaga accagctctc tgtgaccca atttgagttt 60
tgatgctgtc actaccgt 78

<210> 317
<211> 82
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon

ES 2 636 470 T3

<400> 317
 tgattaccat catggctcag attggctcct atgttcctgc agaagaagcg acaattggga 60
 ttgtggatgg cattttcaca ag 82

<210> 318
 <211> 77
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon
 10

<400> 318
 ccgccctcac ctgaagagaa acgcgctcct tggcggacac tgggggagga gaggaagaag 60
 cgcggtaac ttattcc 77

<210> 319
 <211> 71
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon
 20

<400> 319
 ggccaggatc tgtggtggta caattgactc tggccttccg agaaggtacc atcaatgtcc 60
 acgacgtgga g 71

<210> 320
 <211> 73
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon
 30

<400> 320
 ggctgtggct gaggctgtag catctctgct ggaggtgaga cactctggga actgatttga 60
 cctcgaatgc tcc 73

<210> 321
 <211> 85
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon
 40

<400> 321
 gcatcaggct gtcattatgg tgtccttacc tgtgggagct gtaaggtctt cttaagagg 60
 gcaatggaag ggcagcacia ctact 85

<210> 322
 <211> 68
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicon
 50

ES 2 636 470 T3

<400> 322
ctgacacttg ccgcagagaa tccctttctc acccacctca tctgcacctt ccagaccaag 60
gaccacct 68

<210> 323
<211> 81
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon
10

<400> 323
cgcttgccta actcatactt tcccgttgac acttgatcca cgcagcgtgg cactgggacg 60
taagtggcgc agtctgaatg g 81

<210> 324
<211> 78
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon
20

<400> 324
gcgacagctc ctctagttcc accatgtccg cgggcggaga cttcgggaat ccgctgagga 60
aattcaagct ggtgttcc 78

<210> 325
<211> 84
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon
30

<400> 325
ggtgtcagat ataaatgtgc aaatgccttc ttgctgtcct gtcggtctca gtacgttcac 60
tttatagctg ctggcaatat cgaa 84

<210> 326
<211> 67
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon
40

<400> 326
tgtggatgct ggattgattt caccactggt gcagctgcta aatagcaaag accaggaagt 60
gctgctt 67

<210> 327
<211> 69
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Amplicon
50

ES 2 636 470 T3

<400> 327

agtgggagac acctgacctt tctcaagctg agattgagca gaagatcaag gagtacaatg 60
cccagatca 69

<210> 328

<211> 68

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Amplicon

<400> 328

cccgttcggt ctgaggaagg ccgggacatg gcgaaccgga tcagtgctt tggctacctt 60
gagtgctc 68

<210> 329

<211> 69

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Amplicon

<400> 329

aacagagaca ttgccaacca tattggatct gcttgctgctc caaaccagca aacttcctgg 60
gcaaatcac 69

<210> 330

<211> 86

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Amplicon

<400> 330

cgcgagcccc tcattataca ctggggcagcc tccccacagc gcatcgagga atgcgtgctc 60
tcaggcaagg atgtcaacgg cgagtg 86

<210> 331

<211> 77

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Amplicon

<400> 331

cagtgagagac cagttgggta gtggtgactg ggtacgctac aagctctgca tgtgtgctga 60
tgggacgctc ttcaagg 77

<210> 332

<211> 81

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Amplicon

ES 2 636 470 T3

<400> 332

gggctcagct ttcagaagtg ctgagttggc agttttcttc tgtcaccaaa agaggtctca 60
atgtggacca gctgaacatg t 81

<210> 333

<211> 70

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Amplicon

<400> 333

tcacatgcca ctttgggtgtt tcataatctc ctgggagaga ttgaccagca gtatagccgc 60
ttcctgcaag 70

<210> 334

<211> 65

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Amplicon

<400> 334

gcccgaaacg ccgaatataa tcccaagcgg tttgctgcgg taatcatgag gataagagag 60
ccacg 65

20 <210> 335

<211> 84

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Amplicon

<400> 335

gccgggaaga ccgtaattgt ggctgcactg gatgggacct tccagaggaa gccatttggg 60
gccatcctga acctggtgcc gctg 84

30 <210> 336

<211> 74

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Amplicon

<400> 336

tgctgttgct gagtctgttg ccagtcccca gaagaccatg tctgtgttga gctgtatctg 60
tgaagccagg caag 74

40 <210> 337

<211> 66

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Amplicon

<400> 337

tgtggtgagg aaggagtcag agagctgtga ctgtctccag ggcttccagc tgaccactc 60
tctggg 66

<210> 338

ES 2 636 470 T3

<211> 89
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Amplicon

<400> 338
tggcttcagg agctgaatac cctcccaggc acacacaggt gggacacaaa taagggtttt 60
ggaaccacta ttttctcatc acgacagca 89

10 <210> 339
<211> 75
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Amplicon

<400> 399
gtatcaggac cacatgcagt acatcggaga aggcgcgaag acaggcatca aagaatgcca 60
gtatcaattc cgaca 75

20 <210> 340
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Amplicon

<400> 340
tttccaaaca tcagcgagtc cacactggag agggagaagc accgtaactt tcaagcgctc 60
ctggt 65

30

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir la probabilidad de respuesta a la quimioterapia de un paciente humano diagnosticado de cáncer de mama, comprendiendo;
- 5 medir el nivel de expresión de un transcrito de ARN de GBP1 en una muestra comprendiendo células cancerosas obtenidas de dicho paciente antes de la quimioterapia, y normalizar el nivel del transcrito de ARN de GBP1 para obtener un nivel de expresión de GBP1 normalizado,
- 10 donde el nivel de expresión de GBP1 normalizado del paciente va asociado a una mayor probabilidad de respuesta a la quimioterapia, si el nivel de expresión de GBP1 normalizado del paciente es mayor comparado con el nivel de expresión de GBP1 normalizado en pacientes con cáncer de mama, de muestras sin posterior respuesta patológica a la quimioterapia .
2. El método, como se expone en la reivindicación 1, donde el cáncer es cáncer de mama invasivo.
3. El método como se expone en la reivindicación 1 o 2, donde la quimioterapia es quimioterapia
- 15 adyuvante.
4. El método como se expone en la reivindicación 1, 2 o 3, donde la quimioterapia es quimioterapia neoadyuvante.
5. El método como se expone en la reivindicación 4, donde la quimioterapia neoadyuvante comprende la administración de un derivado del taxano.
- 20 6. El método como se expone en la reivindicación 5, donde el derivado de taxano es docetaxel o paclitaxel.
7. El método como se expone en la reivindicación 1 o 2, donde la quimioterapia comprende además la administración de un agente anticáncer adicional.
8. El método como se expone en la reivindicación 7, donde el agente anticáncer adicional es un miembro
- 25 de la clase de agentes anticáncer de las antraciclinas.
9. El método como se expone en la reivindicación 8, donde el agente anticáncer adicional es doxorubicina.
10. El método como se expone en la reivindicación 7, donde el agente anticáncer adicional es un inhibidor de la topoisomerasa.
11. El método como se expone en cualquier reivindicación precedente, donde la muestra es tejido fijado,
- 30 embebido en parafina (PET).
12. El método como se expone en cualquier reivindicación precedente, donde el nivel de expresión del transcrito de ARN es determinado por un método basado en PCR.
13. El método como se expone en la reivindicación 12, donde el nivel de expresión del transcrito de ARN es determinado por RT-PCR.
- 35

FIG. 1

