

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 294**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2009 PCT/CN2009/000411**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2010 WO10118559**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2009 E 09843193 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2420578**

54 Título: **Método de detección de cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.10.2017**

73 Titular/es:  
**NATIONAL DEFENSE MEDICAL CENTER  
(100.0%)  
No. 161, Sec. 6, Minquan E. Road Neihu District  
Taipei City 114, CN**

72 Inventor/es:  
**LAI, HUNG-CHENG**

74 Agente/Representante:  
**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 638 294 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

Método de detección de cáncer

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

## 1. CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 [0001] La invención se refiere al método de detección de cáncer, al biomarcador de detección de cáncer, y al uso de los mismos. En particular, al método de detección de cáncer usando ADN metilado como biomarcador.

## 2. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 [0002] El cáncer de cuello de útero ha sido una de las causas de muerte principales en mujeres a nivel mundial y en Taiwán. Basándose en la encuesta estadística llevada a cabo por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2002, el cáncer de cuello de útero fue la segunda enfermedad principal responsable de la muerte de mujeres a nivel mundial, después del cáncer de mama. La detección regular de cáncer de cuello de útero es la mejor forma de prevenir el cáncer de cuello de útero. La detección convencional de cáncer de cuello de útero incluye dos métodos: la prueba de Papanicolau, usada más frecuentemente, y el análisis de virus del papiloma humano (análisis de VPH). La prueba de Papanicolau consiste en tomar muestras de secreciones del cuello del útero, examinarlas bajo microscopio para ver si hay algún cambio patológico cancerígeno en la célula epitelial exfoliada, para detectar pronto el cáncer de cuello de útero. Por otro lado, el análisis de VPH consiste en examinar si el virus del papiloma humano (VPH) está presente en la muestra usando una reacción en cadena de polimerasa (PCR) o una captura híbrida.

20 [0003] Existen, sin embargo, muchas propiedades no deseadas en la prueba de Papanicolau. Para empezar, requiere que un médico tome muestras, y que un examinador/patólogo médico las analice, lo cual conlleva un alto coste de mano de obra y ello hace que sea difícil promover la prueba en muchos países en vías de desarrollo. Asimismo, la prueba de Papanicolau tiene un alto índice negativo falso, lo cual retrasa el diagnóstico y el tratamiento apropiado antes de que se produzca un cambio patológico cancerígeno. En cuanto al análisis de VPH, aunque es altamente sensible, tiende a crear un alto índice positivo falso, que no solo hace que los pacientes se preocupen en vano, sino que también desperdicia muchos recursos médicos en los exámenes de seguimiento de dichos pacientes positivos falsos. Por consiguiente, uno de los temas importantes al promover el examen del cáncer de cuello de útero se basa en aumentar la exactitud y la conveniencia del método de examen de cáncer de cuello de útero.

30 [0004] Las deleciones genómicas se han considerado durante mucho tiempo como un factor importante en la tumorigénesis. Durante mucho tiempo, nos hemos acostumbrado a la idea de que el potencial de codificación del genoma se encuentra en la disposición de las cuatro bases A, T, G, C. La teoría de doble mutación propuesta ya en los años 1970 indica que las mutaciones concomitantes o las deleciones de algunos genes supresores tumorales homólogos pueden causar o predisponer el desarrollo de cáncer. Sin embargo, se puede almacenar información adicional que afecta al fenotipo en la 5-metilcitosina de base modificada. La 5-metilcitosina se encuentra en mamíferos en el contexto de la secuencia palindrómica 5'-CpG-3'. Muchos pares de dinucleótidos CpG se metilan en células mamíferas excepto algunas áreas llamadas "islas CpG". Las islas CpG son áreas ricas en GC y CpG de aproximadamente 1 kb, normalmente situadas cerca de genes y frecuentemente se encuentran cerca del promotor de genes altamente expresados. La metilación de citosina ocurre después de la síntesis de ADN, por transferencia enzimática de un grupo metilo desde el donador de metilo S-adenosil metionina a la posición del carbono 5 de la citosina. La reacción enzimática se realiza por metiltransferasas de ADN (DNMTs). La DNMT1 es la metiltransferasa principal en mamíferos, y es responsable de la restauración postreplicativa de las zonas hemimetiladas a la metilación completa, referida como metilación de mantenimiento, mientras que se piensa que la DNMT3A y la DNMT3B están implicadas principalmente en la metilación de nuevas zonas, un proceso llamado metilación *aislada*.

45 [0005] La pérdida de metilación en los dinucleótidos CpG, es decir, la hipometilación general, fue la primera anomalía epigenética identificada en células cancerosas. Sin embargo, durante los últimos años, se ha hecho cada vez más evidente que la hipermetilación de zonas específicas, por ejemplo, algunos genes supresores tumorales, se asocia con la pérdida de actividad, lo cual puede proporcionar ventajas selectivas durante la carcinogénesis. La metilación densa de islas CpG en regiones promotoras puede desencadenar la remodelación de cromatina a través de modificaciones de histona con el consiguiente silenciamiento genético. Por lo tanto, además de las deleciones cromosómicas o las mutaciones genéticas, el silenciamiento epigenético de genes supresores tumorales por hipermetilación promotora se ve comúnmente en el cáncer en humanos.

[0006] Estudios epidemiológicos han demostrado recientemente la correlación del nivel de folato de suero, una gran fuente de grupo metilo, con la infección y la depuración de VPH. También se ha informado de que los polimorfismos genéticos de enzimas en el metabolismo del ciclo de metilo se asocian también con el desarrollo de lesiones intraepiteliales del cuello del útero. Conforme evoluciona el concepto de epigenética, aumentan también los estudios que exploran la asociación entre la metilación de ADN y el cáncer de cuello de útero. Están aumentando los estudios de metilación de ADN en el cáncer de cuello de útero, lo cual mostró el potencial del uso de la metilación como marcadores en la detección del cáncer de cuello del útero. Con la naturaleza de la interfaz entre genética y ambiente, la prevalencia de la metilación en genes supresores tumorales varía en genes diferentes y poblaciones diferentes. El concepto de fenotipos metiladores con comportamientos en enfermedades diferentes se propuso con controversia. Todavía se desconoce el fenotipo metilador del cáncer de cuello de útero y su interacción con genotipos del VPH. Qué genes se metilan en concreto en el cáncer de cuello de útero y cuántos genes se requieren para conseguir una aplicación clínica seguirá siendo un tema que se desarrolle en el futuro.

[0007] San Jose-Eneriz E et al., "Downregulation of DBC1 expression in acute lymphoblastic leukaemia is mediated by aberrant methylation of its promoter", British Journal of Haematology, vol. 134, 2006, páginas 137-144 explica la disminución del número de DBC1 en la leucemia por metilación aberrante de su región promotora, al establecer el índice de metilación de DBC1 como criterio de diagnóstico para la leucemia.

[0008] Izumi Hiroyuki et al., "Frequent silencing of DBC1 is by genetic or epigenetic mechanisms in non-small cell lung cancers" Human Molecular Genetics, Oxford University Press, Surrey, vol. 14, n.º 8, 15 de abril de 2005, páginas 997-1007 explica el silenciamiento de DBC1 en cánceres uroteliales y tumores de pulmón a través de la hipermetilación de una región CpG definida de DBC1, y propone que el estado de metilación de DBC1 es adecuado para la prognosis del cáncer.

[0009] Groenbaek et al., "Frequent hypermethylation of DBC1 in malignant lymphoproliferative neoplasms", MOD PATHOL., vol. 21, n.º 5, 2008, páginas 632-638 explica la hipermetilación de la región promotora de DBC1 en varios linfomas y neoplasias linfoproliferativas, lo que hace que la DBC1 sea adecuada como marcador de diagnóstico para esos cánceres.

[0010] El inventor de la presente solicitud ha presentado solicitudes de patente relativas en Taiwán (TW Pat. N° Pub. 200831900), China (CN Sol. N° 200810094659.2), Malasia (UI20085354) y América (Pat. estadounidense N° Pub. 20080311570) (de ahora en adelante referidas como solicitudes previas). Al comparar con las solicitudes previas, el inventor ha descubierto algún biomarcador nuevo de detección de cáncer y un método de detección de cáncer que lo usa.

## RESUMEN DE LA INVENCION

[0011] Un objetivo de la invención es proporcionar un método de detección de cáncer de cuello de útero como la detección de primera línea de cáncer de cuello de útero.

[0012] Otro objeto de la invención es proporcionar un método de detección de cáncer de cuello de útero, caracterizado por el hecho de que dicho método se puede usar no solo como detección de primera línea de cáncer de cuello de útero, sino también como detección de segunda línea de cáncer de cuello de útero para ayudar en el análisis de VPH o en un resultado de la prueba de Papanicolau incierto para conseguir un efecto de detección de cáncer de cuello de útero más preciso.

[0013] Sin embargo, otro objetivo de la invención es proporcionar un método de detección de cáncer, caracterizado por el hecho de que dicho método se puede usar en la detección de cáncer de cuello de útero al igual que en la detección de otro cáncer (por ejemplo: cáncer de ovario, cáncer de colon y similares) para ayudar en el diagnóstico de muestras anormales.

[0014] Otro objeto de la invención es proporcionar el biomarcador de detección de cáncer, o un juego que contiene dicho biomarcador para reconocer el riesgo de tener cáncer. El método de detección de cáncer que puede conseguir los objetivos de la invención anteriormente mencionados comprende detectar el índice de metilación del gen objetivo (biomarcador) de la muestra de prueba y usar el resultado de la prueba como un índice de detección para indicar el riesgo de tener cáncer, y dicho método comprende los pasos siguientes:

paso 1: proporcionar una muestra de prueba aislada;  
 paso 2: detectar el índice de metilación de la secuencia CpG en al menos un gen objetivo en el ADN genómico de dicha muestra de prueba, donde dicho gen objetivo comprende DBC1, PDE8B, PTPRR y ZNF582 y

paso 3: determinar si hay cáncer o cambio patológico precanceroso o no en la muestra basándose en el índice de metilación en el gen objetivo, o usar dicho índice de metilación del gen objetivo como marcador de la prognosis;

5 donde dicha muestra de prueba comprende un raspado cervical, un tejido de cáncer de ovario, ascitis, sangre, orina, heces, esputo, célula de membrana mucosa oral, jugos gástricos, bilis, célula epitelial de cuello de útero y tejido de cáncer postquirúrgico;  
 donde los métodos de análisis para el estado de la metilación de la secuencia CpG en dicho gen objetivo comprenden la reacción en cadena de polimerasa específica de metilación (MSP), la reacción en cadena de polimerasa específica de metilación cuantitativa (QMSP), la secuenciación por bisulfito (BS), las micromatrices, la espectrometría de masas, la cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (DHPLC);  
 10 donde el gen objetivo DBC1 tiene la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID N.º 1;  
 donde el gen objetivo PDE8B tiene la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID N.º 2;  
 donde el gen objetivo PTPRR tiene la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID N.º 3; y  
 15 donde el gen objetivo ZNF582 tiene la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID N.º 4.

[0015] Además, el índice de detección descrito anteriormente y el método de detección se pueden usar en la detección de cáncer de cuello de útero, y cáncer de colon.

20 [0016] La invención proporciona además un método de detección de cáncer de ovario, caracterizado por el hecho de que dicho método analiza el estado de metilación del gen objetivo de la muestra de prueba, y usa dicho estado de metilación como un índice de detección para determinar el riesgo de tener cáncer de ovario, y dicho método comprende los pasos siguientes:

paso 1: proporcionar una muestra de prueba aislada;  
 paso 2: detectar el índice de metilación de la secuencia CpG en al menos un gen objetivo en el ADN genómico de dicha muestra de prueba, donde dicho gen objetivo comprende DBC1, PDE8B, PTPRR y ZNF582; y,  
 25 paso 3: determinar si hay cáncer de ovario o cambio patológico precanceroso o no en la muestra basada en el índice de metilación en el gen objetivo, o usar dicho índice de metilación del gen objetivo como marcador de la prognosis;

30 donde dicha muestra de prueba comprende tejido de cáncer de ovario, ascitis, sangre, orina, y tejido de cáncer postquirúrgico;  
 donde los métodos de análisis para el estado de la metilación de la secuencia CpG en dicho gen objetivo comprenden la reacción en cadena de polimerasa específica de metilación (MSP), la reacción en cadena de polimerasa específica de metilación cuantitativa (QMSP), la secuenciación por bisulfito (BS), las micromatrices, la espectrometría de masas, la cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (DHPLC) y la pirosecuenciación.  
 35 donde el gen objetivo DBC1 tiene la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID N.º 1;  
 donde el gen objetivo PTPRR tiene la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID N.º 3; y  
 40 donde el gen objetivo ZNF582 tiene la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID N.º 4.

45 [0017] El término "muestra de prueba" se refiere en el presente documento a una muestra de prueba aislada, y dicha muestra de prueba aislada comprende el raspado uterino descrito anteriormente, ascitis, sangre, orina, heces, esputo, célula de membrana mucosa oral, jugos gástricos, bilis, célula epitelial de cuello de útero, tejido de cáncer postquirúrgico, u otra muestra adecuada. El método de detección de cáncer de la invención es útil para analizar el estado de metilación de genes objetivo en dichas muestras de prueba aisladas, y usa dicho estado de metilación del biomarcador como un índice de detección de varios tipos de cáncer. El método de detección de cáncer y el índice de detección del biomarcador proporcionado por la invención se puede emplear por el investigador para realizar la prueba en el laboratorio.

50 [0018] Donde, "el riesgo de tener cáncer" se refiere en el presente documento al porcentaje de tener cáncer, el riesgo de desarrollar un cáncer en el futuro, o la presencia o no de cáncer.

[0019] Donde, cuando el estado de metilación del gen objetivo (biomarcador) es más alto comparado con control adecuado, el riesgo de tener cáncer sería más alto.

55 [0020] Según dicho método de detección, la invención proporciona además el biomarcador de detección de cáncer o un juego que contiene dicho biomarcador para detectar el estado de la metilación del gen objetivo (biomarcador) en la muestra de prueba aislada para determinar el riesgo de tener cáncer.

[0021] Estas características y ventajas de la presente invención se entenderán y apreciarán completamente a partir de la siguiente descripción detallada de los dibujos anexos.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

[0022]

La Figura 1A muestra el resultado obtenido al llevar a cabo el análisis de la secuenciación por bisulfito (BS) en varias muestras de cuello de útero usando un gen objetivo PTPRR en el método de detección de cáncer de la invención;

La Figura 1B muestra el resultado obtenido al llevar a cabo el análisis de la secuenciación por bisulfito (BS) en varias muestras de cuello de útero usando un gen objetivo ZNF582 en el método de detección de cáncer de la invención;

La Figura 1C muestra el resultado obtenido al llevar a cabo el análisis de la secuenciación por bisulfito (BS) en varias muestras de cuello de útero usando un gen objetivo PDE8B en el método de detección de cáncer de la invención; y

La Figura 1D muestra el resultado obtenido al llevar a cabo el análisis de la secuenciación por bisulfito (BS) en varias muestras de cuello de útero usando un gen objetivo DBC1 en el método de detección de cáncer de la invención.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA FORMA DE REALIZACIÓN PREFERIDA**

[0023] La invención se ilustrará en más detalle con los ejemplos siguientes, pero la invención no está limitada a ellos.

**Ejemplo 1 Materiales y métodos****1. Materiales**

[0024] Los materiales de la prueba comprenden una serie de muestras de lesiones de cuello de útero completas, incluidos: carcinoma de células escamosas (SCC, n = 20), adenocarcinoma (CA, n = 20), y muestra de cuello de útero normal (n = 10). Todas estas muestras de cuello de útero, muestras ováricas, y muestras de cáncer de colon se obtuvieron del Tri-service General Hospital, Taipéi, ROC. Cada muestra se sometió a una extracción de ADN genómico mediante QIAamp DNA Kit (QIAGEN), y se usó en la comparación y análisis de la condición de la metilación de ADN dentro de la metilación de ADN del genoma completo. Antes del análisis, la calidad del ADN genómico se comprobó mediante Bioanalyzer (Agilent). En este ejemplo, 10 µg de ADN fragmentado se sometieron a un ensayo de MeDIP (Inmunoprecipitación metilada de ADN).

**2. Análisis de metilación de ADN por MeDIP y matrices de CpG island-Plus-Promoter**

[0025] El ADN genómico fue fragmentado a un tamaño que varía de 300 a 1.000 bp mediante Bioruptor™ UCS-200 (Diagenode). Se inmunoprecipitó durante toda la noche a 4 °C con 30 µl de anticuerpo de citosina Anti-5'-metil policlonal (Abcam) en un volumen final de 100 µl de disolución de tampón de inmunoprecipitación (0,15 % SDS, 1 % Tritón X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM Tris y 0,1 % BSA). Se incubó la mezcla con 120 µl de proteína G sefarosa (Amersham) durante 2 h a 4 °C y se lavó dos veces con 1 ml de disolución de tampón baja en sal, alta en sal, cloruro de litio y disolución de tampón TE. Después se trató dos veces la proteína G con disolución de tampón de elución (1 % SDS, 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>) durante 15 min a temperatura ambiente y se recuperó el ADN metilado por extracción de fenol-cloroformo seguida de precipitación de etanol. El ADN metilado enriquecido y el ADN aportado fueron amplificados mediante Whole Genome Amplification Kit (Sigma). El ADN enriquecido y el total fue marcado con Cy5 y Cy3, respectivamente, y cohibridado con las matrices de CpG island-Plus-Promoter, diseñado y sintetizado por NimbleGen Systems, Inc. Esta matriz contenía 385.000 50-75 bp de oligonucleótidos teselados cada 100 bp en los 24.659 promotores HG18 RefSeq (800 bp en dirección ascendente a 200 bp en dirección descendente) y 28.226 islas CpG, presentes por duplicado.

[0026] Cada característica de la matriz tiene una proporción log<sub>2</sub> estandarizada correspondiente. La proporción log<sub>2</sub> es la norma para centrar los datos de la proporción alrededor de cero. A partir de los datos de la proporción log<sub>2</sub> estandarizada, una ventana de longitud fija (500 bp) se coloca alrededor de cada sonda consecutiva y se lleva a cabo la prueba unilateral de Kolmogorov-Smirnov (KS) para determinar si las sondas se extraen de una distribución significativamente más positiva que aquellas en el resto de la matriz. La puntuación resultante para cada sonda es el valor P -log<sub>10</sub> de la prueba KS con ventana alrededor de dicha sonda (Scacheri et al, 2006). Se detectaron picos enriquecidos al buscar al menos 2 sondas por encima de un corte mínimo (-log<sub>10</sub>) del valor P de 2. Los picos a 300 bp de cada uno se mezclan. Se seleccionaron las regiones de metilación diferencial entre el cuello de útero SCC/AC y el normal a 2.500 bp dirección ascendente del inicio de la transcripción para una validación futura. Finalmente, se vieron los datos del valor P utilizando SignalMap (NimbleGen).

**3. Modificación por bisulfito, reacción en cadena de polimerasa específica de metilación (MSP) y secuenciación por bisulfito (BS)**

[0027] Se usó un juego de modificación de ADN (Chemicon, Ternecula, CA) según las recomendaciones del fabricante para convertir 1 µg de alícuotas de ADN genómico con bisulfito sódico para preservar las citosinas metiladas. El precipitado final fue eluido con 70 µl de disolución de tampón TE precalentado (55 °C) para MSP.

[0028] Se tomó ADN normal de sangre humana periférica y se sometió a modificación por bisulfito, que se usó como el grupo de control con secuencia promotora de desmetilación.

[0029] La MSP se llevó a cabo según la técnica anterior. En resumen, se amplificó 1 µl de ADN modificado utilizando los cebadores de la MSP (tabla 1) que reconocieron específicamente las secuencias de gen metilado presentes en el ADN convertido por bisulfitos. La PCR específica de metilación se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl que contenía 1 µl de una plantilla modificada de ADN, 1,5 pmol de cada cebador, 0,2 mmol/L de trifosfatos de desoxinucleótido y 1 unidad de polimerasa de ADN Gold Taq (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las reacciones de la MSP fueron sometidas a una incubación inicial a 95 °C durante 5 min, seguidos de 35 ciclos a 95 °C durante 30 s, y de templado a la temperatura apropiada durante 30 s y a 72 °C durante 30 s. La extensión final se hizo a 72 °C durante 5 min. Los productos de amplificación fueron visualizados en 2,5 % de gel de agarosa que contenía bromuro de etidio y que estaba iluminado con luz UV.

Tabla 1. Las secuencias de cebadores de MSP

Gen	Cebador	Secuencia	
DBC1	M	Forward (F')	5' gtttctgctgttttctgctcgagatc 3' (SEQ ID N.º 5)
		Reverse (R')	5' gctctcgctctcgctattactcgct 3' (SEQ ID N.º 6)
PDE8B	M	Forward (F')	5' tgtgatgctgctgttttctgctc 3' (SEQ ID N.º 7)
		Reverse (R')	5' acctatatatccgccctccctc 3' (SEQ ID N.º 8)
PTPRR	M	Forward (F')	5' cggcgttggtgatgttagtagtc 3' (SEQ ID N.º 9)
		Reverse (R')	5' aattacgaataaaaaaacaacacgctc 3' (SEQ ID N.º 10)
ZNF582	M	Forward (F')	5' tgacggtttttgtttattcgttattc 3' (SEQ ID N.º 11)
		Reverse (R')	5'cgaacgcaaactacacctacgc 3' (SEQ ID N.º 12)

M: Los cebadores pueden reconocer específicamente las secuencias de gen metilado presentes en el ADN convertido por bisulfitos.

[0030] Todos los datos de la MSP procedieron de al menos dos modificaciones independientes de ADN. La ausencia de señal en experimentos por duplicado se marcó como metilación negativa. El producto de la PCR obtenido usando el cebador de la MSP (M) que puede reconocer específicamente la secuencia de genes de metilación se convirtió en un vector pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). 5 clones independientes fueron seleccionados y fueron sometidos a secuenciación por bisulfito (BS). Los cebadores usados en la secuenciación por bisulfito (BS) se enumeran en la Tabla 2. La secuenciación por bisulfito se efectuó usando 377 Auto-sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los resultados secuenciados se muestran en la lista de secuencias. Los números de secuencia en la secuenciación por bisulfito fueron: DBC1\_BS (SEQ ID N.º 21), PDE8B\_BS (SEQ ID N.º 22), PTPRR\_BS (SEQ ID N.º:23) y ZNF582\_BS (SEQ ID N.º 24), respectivamente.

Tabla 2. Las secuencias de cebadores de secuenciación por bisulfito

Gen	Cebador	Secuencia	
DBC1	Forward (F')	5'ggttaagtttttttgyggytagtt 3' (SEQ ID N.º 13)	
	Reverse (R')	5'tactcctctacctccrctctc 3' (SEQ ID N.º 14)	
PDE8B	Forward (F')	5'tgtggygtagaggattattagttggt 3' (SEQ ID N.º 15)	
	Reverse (R')	5'ctaaaaacraaccatccctc 3' (SEQ ID N.º 16)	
PTPRR	Forward (F')	5'ggaattttatttgaattttttgtt 3' (SEQ ID N.º 17)	

Tabla 2. Las secuencias de cebadores de secuenciación por bisulfito

Gen	Cebador	Secuencia	
ZNF582	Reverse (R')	5'ccccacttcaaataaaatactattaaaaaaac 3'	(SEQ ID N.º 18)
	Forward (F')	5'tagtgaygggtttttgtttattattattatt 3'	(SEQ ID N.º 19)
	Reverse (R')	5'taaacrtaaaacaacaaccrcracct 3'	(SEQ ID N.º 20)

### Ejemplo 2 Detección de gen objetivo metilado en cáncer de cuello de útero

[0031] Después del reconocimiento mediante matrices de CpG island-Plus-Promoter, se reconocieron cuatro genes objetivo que pueden haber sido altamente metilados en la célula de cáncer de cuello de útero, es decir, DBC1 (SEQ ID N.º 1), PDE8B (SEQ ID N.º 2), PTPRR (SEQ ID N.º 3) y ZNF582 (SEQ ID N.º 4), respectivamente. Su información detallada se muestra en la Tabla 3. En la Tabla 3 se puede ver que, entre estos cuatro genes, excepto el DBC1 que se sabía que estaba asociado con el cáncer de vejiga, pocos estudios hasta la fecha han mostrado la relación de dichos genes con el cáncer de cuello de útero.

Tabla 3. Características de los genes metilados en el cáncer de cuello de útero que fueron identificadas utilizando una micromatriz de CpG island-Plus-Promoter.

Gen	UniGene	Ubicación cromosómica	Nombre completo	SEQ ID N.º
DBC1	NM_014618	9q32-q33	eliminado en el cáncer de vejiga 1	SEQ ID N.º 1
PDE8B	NM_003719	5q14.1	fosfodiesterasa 8B	SEQ ID N.º 2
PTPRR	NM_002849	12q15	proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, R	SEQ ID N.º 3
ZNF582	NM_144690	19q13.43	proteína de dedos de cinc 582	SEQ ID N.º 4

### Ejemplo 3 El análisis del estado de metilación del gen objetivo en la muestra de lesión de cuello de útero mediante secuenciación por bisulfito (BS)

#### 10 Gen objetivo: PTPRR

[0032] Grupos de muestra de la prueba:

1. HeLa\_0: línea celular de cáncer de cuello de útero HeLa;
2. HeLa\_10D: línea celular de cáncer de cuello de útero HeLa (HeLa\_0) tratada con 10 µM de inhibidor de metiltransferasa de ADN 5'-aza-2'-deoxicitidina (AZC);
- 15 3. HeLa\_DT: línea celular de cáncer de cuello de útero HeLa (HeLa\_0) tratada con 10 µM de inhibidor de metiltransferasa de ADN 5'-aza-2'-deoxicitidina (AZC) y 0,33 µM de TSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO);
4. AC: muestra de adenocarcinoma de cuello de útero;
5. SCC: muestra de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero;
- 20 6. Grupo de control (normal): ADN de sangre de cuello de útero normal como grupo de control sin metilación.

[0033] Cada una de las muestras de la prueba anteriormente descritas se sometieron a modificación por bisulfito, y luego a secuenciación por bisulfito (BS) para analizar si el gen objetivo (PTPRR) en cada muestra de la prueba ha sido hipermetilado o no. El resultado se muestra en la Fig. 1, donde la región de metilación se indica en negro, y la región sin metilación se indica en blanco. El gen objetivo PTPRR no ha sido metilado en el grupo de control y en el adenocarcinoma, mientras que el gen objetivo PTPRR ha sido hipermetilado en la línea celular de cáncer cervical HeLa (HeLa\_0) y en la muestra de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero (SCC). En consecuencia, el índice de metilación de PTPRR podría usarse como biomarcador para detectar si había cáncer de cuello de útero o no.

[0034] Además, para averiguar si el índice de metilación del gen objetivo en la muestra de cáncer de cuello de útero se podría regular a través de la metilación de ADN, se trató la línea celular de cáncer de cuello de útero HeLa con 10 µM de inhibidor de metiltransferasa de ADN 5'-aza-2'-deoxicitidina (AZC) (Sigma Chemical Co.). La muestra de ADN extraída de dicha célula se sometió a modificación por bisulfito y luego a secuenciación por bisulfito (BS). El resultado mostrado en la Fig. 1A indica que, comparado con la muestra de carcinoma de célula

escamosa de cuello de útero (SCC) y la línea celular de cáncer de cuello de útero HeLa (HeLa\_0), el gen objetivo PTPRR en la línea celular de cáncer de cuello de útero HeLa tratada con AZC (HeLa\_10D) tenía una parte de la región desmetilada.

5 [0035] La tricostatina A (TSA) es inhibidora de histona deacetilasa (HDAC), y puede utilizarse para reducir o degradar el índice de metilación. La línea celular de cáncer de cuello de útero HeLa (HeLa\_DT) ha sido tratada con AZC y TSA. El resultado mostrado en la Fig. 1 indica que, comparado con la muestra de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero (SCC) y la línea celular de cáncer de cuello de útero HeLa (HeLa\_0), el gen objetivo PTPRR en la línea celular de cáncer de cuello de útero HeLa tratada con AZC y TSA (HeLa\_DT) ha sido altamente desmetilado.

10 [0036] En resumen, los resultados descritos anteriormente han confirmado que el gen objetivo PTPRR en la muestra de cáncer de cuello de útero fue metilado a través de metilación de ADN.

**Gen objetivo: ZNF582**

[0037] Grupos de muestra de la prueba:

- 15 1. HeLa\_0: línea celular de cáncer de cuello de útero HeLa;  
 2. HeLa\_10D: línea celular de cáncer de cuello de útero HeLa (HeLa\_0) tratada con 10 µM de inhibidor de metiltransferasa de ADN 5'-aza-2'-desoxicitidina (AZC);  
 3. HeLa\_DT: línea celular de cáncer de cuello de útero HeLa (HeLa\_0) tratada con 10 µM de inhibidor de metiltransferasa de ADN 5'-aza-2'-desoxicitidina (AZC) y 0,33 µM de TSA;  
 20 4. SCC 1: muestra 1 de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero;  
 5. SCC 2: muestra 2 de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero;  
 6. El grupo de control (normal): ADN de sangre de cuello de útero normal como grupo de control sin metilación;

25 [0038] Donde las muestras 1 y 2 de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero fueron muestras obtenidas de distintos pacientes.

[0039] Dichas muestras de la prueba mencionadas anteriormente fueron sometidas a secuenciación por bisulfito (BS) para analizar si el gen objetivo (ZNF582) en cada muestra de la prueba fue hipermetilado o no. El resultado mostrado en la Fig. 1B indica que, comparado con el grupo de control, el gen objetivo ZNF582 en la muestra 1 de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero (SCC), la muestra 2 de carcinoma de célula escamosa de  
 30 cuello de útero (SCC) y la línea celular de cáncer de cuello de útero HeLa (HeLa\_0) fue hipermetilado. En consecuencia, el gen objetivo ZNF582 en las muestras de cáncer de cuello de útero sería altamente metilado.

**Gen objetivo: PDE8B**

[0040] Grupos de muestra de la prueba:

- 35 1. SiHa\_0: línea celular de cáncer de cuello de útero SiHa;  
 2. SiHa\_10D: línea celular de cáncer de cuello de útero SiHa (SiHa\_0) tratada con 10 µM de inhibidor de metiltransferasa de ADN 5'-aza-2'-desoxicitidina (AZC);  
 3. SiHa DT: línea celular de cáncer de cuello de útero SiHa (SiHa\_0) tratada con 10 µM de inhibidor de metiltransferasa de ADN 5'-aza-2'-desoxicitidina (AZC) y 0,33 µM de TSA;  
 40 4. SCC 1: muestra 1 de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero;  
 5. SCC 2: muestra 2 de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero;  
 6. El grupo de control (normal): ADN de sangre de cuello de útero normal como grupo de control sin metilación;

45 donde las muestras 1 y 2 de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero fueron muestras obtenidas de distintos pacientes.

[0041] Dichas muestras de la prueba mencionadas anteriormente fueron sometidas a secuenciación por bisulfito (BS) para analizar si el gen objetivo (PDE8B) en cada muestra de la prueba fue hipermetilado o no. El resultado mostrado en la Fig. 1C indica que, comparado con el grupo de control, el gen objetivo PDE8B en la muestra 1 de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero (SCC 1), la muestra 2 de carcinoma de célula escamosa de  
 50 cuello de útero (SCC 2) y la línea celular de cáncer de cuello de útero SiHa (SiHa\_0) fue hipermetilado. En consecuencia, el gen objetivo PDE8B en las muestras de cáncer de cuello de útero sería altamente metilado.

**Gen objetivo: DBC1**

[0042] Grupos de muestra de la prueba:

1. SiHa\_0: línea celular de cáncer de cuello de útero SiHa;
2. SiHa\_10D: línea celular de cáncer de cuello de útero SiHa (SiHa\_0) tratada con 10  $\mu\text{M}$  de inhibidor de metiltransferasa de ADN 5'-aza-2'-desoxicitidina (AZC);
3. SiHa DT: línea celular de cáncer de cuello de útero SiHa (SiHa\_0) tratada con 10  $\mu\text{M}$  de inhibidor de metiltransferasa de ADN 5'-aza-2'-desoxicitidina (AZC) y 0,33  $\mu\text{M}$  de TSA;
4. SCC 1: muestra 1 de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero;
5. SCC 2: muestra 2 de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero;
6. El grupo de control (normal): ADN de sangre de cuello de útero normal como grupo de control sin metilación;

donde las muestras 1 y 2 de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero fueron muestras obtenidas de distintos pacientes.

- [0043] Dichas muestras de la prueba mencionadas anteriormente fueron sometidas a secuenciación por bisulfito (BS) para analizar si el gen objetivo (DBC1) en cada muestra de la prueba fue hipermetilado. El resultado mostrado en la Fig. 1D indica que, comparado con el grupo de control, el gen objetivo DBC1 en la muestra 1 de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero (SCC 1), la muestra 2 de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero (SCC 2) y la línea celular de cáncer de cuello de útero SiHa (SiHa\_0) fue hipermetilado. En consecuencia, el gen objetivo DBC1 en las muestras de cáncer de cuello de útero sería altamente metilado.

**Ejemplo 4 Análisis de metilación del gen objetivo en las muestras de cáncer de cuello de útero**

- [0044] La PCR específica de metilación (MSP) se usó para analizar el estado de metilación de dichos cuatro genes objetivo en las muestras de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero (SCC). El resultado del análisis del estado de metilación mostrado en la Tabla 4 indica que, en la muestra de cuello de útero normal, la frecuencia de metilación del DBC1, PDE8B, PTPRR y ZNF582 fue del 11 %, 0 %, 9 % y 6 %, respectivamente; en la muestra de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero, la frecuencia de metilación del DBC1, PDE8B, PTPRR y ZNF582 fue del 100 %, 47 %, 100 % y 97 %, respectivamente. De estos resultados se puede extraer que, en las muestras de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero, dichos cuatro genes fueron altamente metilados. En consecuencia, el índice de metilación del DBC1, PDE8B, PTPRR y ZNF582 podría usarse de hecho como el índice de detección en detección del cáncer de cuello de útero.

Tabla 4 Análisis del estado de metilación del gen objetivo en las muestras de carcinoma de célula escamosa de cuello de útero

	Índice de metilación CGI de genes objetivo (%)	
	Normal (n = 54)	Tejido SCC (n = 30)
DBC1	11 %	100 %
PDE8B	0 %	47 %
PTPRR	9 %	100 %
ZNF582	6 %	97 %

**Ejemplo 5 Análisis de metilación del gen objetivo en la muestra de tumor de ovario**

- [0045] La PCR específica de metilación (MSP) se usó para analizar el estado de metilación del gen objetivo en las muestras de tumor de ovario. Los resultados del análisis del estado de metilación de la Tabla 5 muestran el análisis de los estados de metilación de tres genes, DBC1, PTPRR y ZNF582, en la muestra de tumor maligno de ovario y muestra de tumor benigno de ovario. Los resultados indican que, la frecuencia de metilación del DBC1, PTPRR y ZNF582 en la muestra de tumor maligno de ovario fue del 50,3 %, 50,0 % y 56,3 %, respectivamente; la frecuencia de metilación del DBC1, PTPRR y ZNF582 en la muestra de tumor benigno de ovario fue del 2,5 %, 0,0 % y 12,5 %, respectivamente. El nivel de metilación diferencial fue del 53,8 %, 50,0 % y 43,8 %, respectivamente. En consecuencia, comparado con la muestra de tumor benigno de ovario, los niveles de metilación de dichos tres genes en la muestra de tumor maligno de ovario fueron notablemente más altos. Por lo tanto, el índice de metilación de DBC1, PTPRR y ZNF582 podría usarse de hecho como el índice de detección en la detección de cáncer de ovario.

Tabla 5 Análisis del estado de metilación del gen objetivo en las muestras de tumor de ovario

	Ov_Maligno (n=28)	Ov_Benigno (n=28)	Nivel_metilación diferencial
DBC1	56,3 %	2,5 %	53,8 %
PTPRR	50,0 %	0,0 %	50,0 %
ZNF582	56,3 %	12,5 %	43,8 %

**Ejemplo 6 Análisis de metilación del gen objetivo en la muestra de cáncer de colon**

[0046] La PCR específica de metilación (MSP) se usó para analizar el estado de metilación del gen objetivo en la muestra de cáncer de colon. El resultado del análisis del estado de metilación de la Tabla 6 muestra el estado de metilación de cuatro genes, DBC1, PDE8B, PTPRR y ZNF582, en la muestra de cáncer de colon. El resultado indica que, las frecuencias de metilación del DBC1, PDE8B, PTPRR y ZNF582 en la muestra de cáncer de colon fueron del 100,0 %, 100,0 %, 100,0 % y 100,0 %, respectivamente; mientras que las frecuencias de metilación del DBC1, PDE8B, PTPRR y ZNF582 en la muestra de tejido de colon normal fueron del 25,0 %, 25,0 %, 25,0 % y 25,0 %, respectivamente. En consecuencia, comparado con la muestra de tejido de colon normal, los niveles de metilación de dichos cuatro genes en la muestra de cáncer de colon fueron notables más altos. Por lo tanto, los índices de metilación del DBC1, PDE8B, PTPRR y ZNF582 podrían usarse de hecho como el índice de detección en la detección de cáncer de colon.

Tabla 6 Análisis del estado de metilación del gen objetivo en la muestra de cáncer de colon

	Índice de metilación CGI de genes objetivo (%)	
	Muestra de tejido de colon normal (n = 24)	Muestra de cáncer de colon (n = 20)
DBC1	25 %	100 %
PDE8B	25 %	100 %
PTPRR	25 %	100 %
ZNF582	25 %	100 %

[0047] El método de detección de cáncer proporcionado por la invención tiene las siguientes ventajas respecto a las técnicas convencionales descritas anteriormente:

1. El método de detección de cáncer, el biomarcador y el uso de los mismos, proporcionado por la invención, usa el índice de metilación de un gen particular en una muestra aislada como el biomarcador que determina el riesgo de tener cáncer, y comparado con métodos convencionales tales como el raspado uterino y el análisis del virus del papiloma humano (análisis de VPH), tanto la sensibilidad como la especificidad del método de detección de cáncer de la invención son mayores que en los dos métodos descritos anteriormente.
2. El método de detección de cáncer, el biomarcador y el uso de los mismos, proporcionado por la invención, se puede usar no solo como detección de cáncer de cuello de útero de primera línea, sino también en combinación o como ayuda al análisis del virus del papiloma humano (análisis de VPH) como detección de cáncer de cuello de útero de segunda línea, para conseguir que la detección de cáncer de cuello de útero sea más precisa.
3. El método de detección de cáncer, el biomarcador y el uso de los mismos, proporcionado por la invención, se puede aplicar en no solo la detección de cáncer de cuello de útero, sino también en la detección de otro cáncer (por ejemplo: cáncer de ovario, cáncer de colon y similar) para ayudar con el diagnóstico de la muestra anormal.

[0048] Muchos cambios y modificaciones en la forma de realización descrita anteriormente de la invención pueden, por supuesto, efectuarse sin alejarse de su alcance. Por consiguiente, para promover el progreso en la ciencia y las artes útiles, se describe la invención y se pretende que esté limitada solo por el alcance de las reivindicaciones anexas.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0049]

<110> Hung-Cheng Lai

<120> Método de detección de cáncer

<130>

<140>

5 <141>

<160> 24

<210> 1

<211> 5000

<212> DNA

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 638 294 T3

ggtcttcacc	tgaagttgcc	tgactacgtt	gtctcagatt	gatttcagaa	ctgcattatc	60
agcagggcag	ctgttgccta	ctaacagtca	tggaagtaga	tctcagctgg	gggatgatgg	120
ggaacaaaag	agaaagatag	ggacgaataa	aggaaggaat	ggggcacaga	cagaaagaga	180
gagagagaaa	agaaagaaaag	gaggagaggg	aagagatagt	gacctggggg	ttcataccgc	240
ggtgggtggg	agaaggagtg	tgtgtggtgg	gcgtatttct	tcgtggtcag	aatcaaagtc	300
agaactgacc	tggggaacct	gtgttcaaga	cctgaacctg	gaccagaagc	caagggaaaag	360
agaaagttgc	ccaagaaaaa	agggagaaat	ttccaccagg	cgaaaataga	aatcgctgac	420
tgggtttgtg	gctggagagc	tgtccgtggt	gctgactcct	cctcattggg	attccagtga	480
aggctgagaa	gctctgcact	ggctgctcct	cctctccctt	tcctctcccc	tcagtctctga	540
ccttctgaga	cccaggatca	ttctgggatc	ctcgatgtct	tctcctctct	ttctcccttt	600
ctctttgtcg	attaaataat	ttttcccagag	ttcccagttc	atcactcaaa	cattttctctt	660
ccattttggt	tcaagactcc	tcttctctca	attagttcac	tggctcctag	attgttctag	720
gcctccctgg	tggtcacatc	tctctcttat	catcctttga	attaaaaaac	aaacaaaaaa	780
catacaatgg	caatcataaa	agcagacaac	atgcaactgag	cactcactag	gtgtcagggga	840
gcagtctaag	tgcctttgca	tacattaact	catgagcagt	ctaagtgcct	ttgcatatat	900
taactcatta	caattccaca	tcaaccctat	tagatgggta	gatataattat	tattctatta	960
aacagacaag	gaattgaggc	ttaaggggta	agtgatttca	ccaagaccag	acagctacag	1020
gactccaacc	tctctggagc	ctgcacttct	actgaatctg	gctcttttac	atattccaac	1080
accttttct	atgacttctt	gcccctccat	ctggtagcct	taatgctttc	tattcttgcc	1140
taatcttcag	gggactaggg	atctgcattg	ctgatttggg	ttaaatacaga	agggaagcaa	1200
agtaaacaaa	cataccaaat	gtgcgctgtg	tgggaattat	catacgaggg	ctttattttc	1260
tgcttcagga	agagggccta	tgttagcagc	cccagctgc	attcaggctg	attgcagagt	1320
atcttgcttt	ttatcttcat	gtcttagtcc	ctgtaccctc	gccccttccc	cgctctggt	1380
ggtctccaga	gaacttcgtg	tcccctcagc	ttctccctcc	tacatcctgc	ctacgtagag	1440
aagctcttgc	ttcattctg	gaggttacgt	gggctctcgc	ctacacaccg	agagaaacaa	1500
acagtgtcaa	acactcacag	agagacgcgc	agacacaaac	ggaccacac	gggcaactcc	1560
cgagacaaaa	cccacactcg	atggatccac	gcgcccggtg	aaacacctgc	cgccccagaa	1620
acactcaggt	actcgcgaca	cacacagtac	agtacgcctt	aagggcacca	ggattccggg	1680
tttgccgcta	tgcgcggtcc	ctttggatgc	tcgtgcgcat	agacacaaca	ccctacacgc	1740
cccagaccca	cgaaactccc	tacggctcag	cccagccca	cccgggccc	ccttccctcg	1800
aggcggcctc	ccgtctctcc	tctctctcct	tctctctctc	ctccgcctaa	agatgtacaa	1860
aacactcctc	ggaagcaacc	ccggcgctca	gctctctcct	ccccgcccc	cgcccgccgc	1920
tccccattc	atcttcggcc	gtcgcggct	aagtccctcc	cccggcgtag	cccggcctcc	1980
gccgctcccc	gcccggagac	cgccggcgac	ttggacttcc	ctctccattc	gccagccgc	2040
tcgctccccg	accccacggc	tgcaaactga	tctggcgcg	ggggaggagg	agagcgagag	2100
cgagcgaacc	cgcgagagag	ggagagagcg	agcgagcaac	agcgagagcg	agagcgagag	2160
agccgggagg	cagagggagt	agtgaccgcc	ttccggagcc	gggattcatg	cctgtcctcg	2220
ggaccagcga	aggggacttt	acggctgagt	atgagccagg	ctgctaggag	ccaggtacct	2280
ccacgcctgc	agtccccg	ccgtgcccgg	aatgcgagct	gcacgcaggg	ctctcccaag	2340
ttcccaccga	gccgaataaa	aagcgtcctc	ccgcagctct	ccgccaaaga	cggacattga	2400
ctccaggtaa	ggcggcgccg	ggtgcagcgc	cccgcagccc	cgctgccctt	ggaccgggce	2460
ccgggcccga	ttcggggcgt	ccccgcgctc	ctctgcccct	ccccctaccg	gcacccttgt	2520
ccgtcttca	cctggccgcc	ccgccgcctc	caagtcttct	ccagttctag	ggaggggggtt	2580
cctgtgcctg	gggctcaaa	ggctaattgc	gggtttgagt	gagtggcgtg	tgtgtccccg	2640
cgcgctccc	acgtgtgcac	catggtggga	acttgatgtg	gtgctagtgt	gtttgcgtgt	2700
gcccgcgtc	ttgcgtttga	tgcgtgtgtt	cgtgggtgtg	gtgtgtgtcc	gtgtgtgtaa	2760
gggaggggtg	aagagagaga	ggtcctataa	cctacttacg	gcgcgatgtg	tgtgtgcatg	2820
tttgtacgta	tgtgtttgta	tgtgtgccct	cgtgtgtctt	tttaattagg	tctctccagc	2880

ES 2 638 294 T3

ttacacggaa	tgggaccctt	actataggat	cacgtagtca	ccgggaaacc	cgctgtggac	2940
ttcctcttgg	ggctctgggc	ttggggtttg	gggaggatta	tggggctgta	gatggcacct	3000
tatttagccc	aatgttggta	cgcttgaagg	aaaattcctc	caaacggtgg	aatcctgcta	3060
cactgggacc	cacagcttaa	tatgaaagag	acatggccaa	ccccgaggc	aatgagacg	3120
ctgtcacttt	aaattctaca	ctgggcagac	tccaagattc	tgatgggaat	ttggagacac	3180
tggatagtgg	gtgacagaga	aagggggaag	tcagcggtag	gctccttata	tggggcttgg	3240
aaagtctggg	atagggattt	accctgcatc	cccgtttgca	atcaacagag	cccctccggc	3300
ttctgttggg	tttggggagg	atctggcaag	tttgcattga	tccccctcag	gggaaaggag	3360
aaagcgtcct	cggggacttg	ctcatccatc	acagttgcaa	agggtctcag	aggaaatttc	3420
atctggggcg	gctgtgggat	atatggaagg	agatggatgg	ggcactttcc	taagacagat	3480
tcgtctttct	ttccccattt	caggcgggga	agccccaga	gagtctctcc	ctaaatatgc	3540
ctctccatgg	ctcccctgga	gttaggggga	tattgagaga	aggcagagag	gtggagaggg	3600
agagagagag	agcaagagcg	agagagaggg	agacagagag	agagagtgtt	tcagtactga	3660
gggagatcta	caatttgaaa	aggggctgtg	agtgtggaac	ccatgacaga	atgtggcagt	3720
aattgactta	aactgctgtc	ggtttgacc	tcgcgtctct	cacttggctc	caaaatactg	3780
ccaagggcag	gggggagggt	gaggaatctc	agccagggaag	gtagtttggg	tcaaggccct	3840
ctttcttctt	tcctccatct	cctgggaggg	tcttttaggta	ggtcccttgg	ccaccctggc	3900
ttggtactgt	tgggcttggg	ctctggggcc	agccattgat	ttgattccca	gctgcctctt	3960
aaaggcttgc	cctactcagc	aaaaatgctg	agttttactg	ctgtagcat	ggcttcagga	4020
ctcggcagct	gttactttct	caaggtaagc	ggcagccgtt	ctgctctcag	gcaggagggc	4080
taggagaaga	caagggctgt	gacgctggga	cacagcctct	tgtctagctc	agcagggagg	4140
ggccgctgaa	aagccctctt	aggggaaaaa	agtagaaata	tatttggcct	aaaaaatgta	4200
cacatatatt	ctaggaagat	atatatatat	atatatatat	caatcacaca	cacacacaca	4260
cacacacatg	tgttcatatt	ctggggagag	ataaaagcaa	acatgtattt	gtaggaacct	4320
gccctagtgg	gtgggttcta	cctgcaggca	cttgcagaca	taccattctc	tgtccagagg	4380
ctgatacctc	aggctgaagc	cttcacatag	ccacagagaa	tctcctcag	gaaactcatg	4440
tcagggcaga	gctccctgga	ttatcttggg	tagggggtag	tagggccaag	gaggagacct	4500
atTTTTGGGA	actgcctcat	tttctctctt	tcctaattca	cagacgatcg	aaactggaag	4560
gaatattaaa	gagcagaaag	gcaggactct	gtggcctaaa	gagggaatga	gaattccccca	4620
acattcagta	gtgggttagt	ggcatgcca	ggactagaat	ctaggcttat	caatcagcta	4680
gatcaatacc	ctttccactc	ctcccagcaa	tatacactct	aggactgtat	attgctcccc	4740
cccctatctt	gccaacctgc	caccatgacc	cctaccaaga	caatcgcttg	tcttccctca	4800
tcaaacttca	cattttcaga	gatgcatttc	agggtttttc	tatctggaaa	catggccctg	4860
aagagaaaag	atccaatgcc	tcaatcacta	ttcccgaag	acacacacac	acacacacac	4920
acacacacac	acacacacac	acacacacac	acacacacgg	tggtgggggg	aggactgaga	4980
gagagacaga	gagagaacat					5000

<210> 2  
 <211> 5000  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

ES 2 638 294 T3

agaacaactc	tgaagcatca	tcccaccttc	agaatcctcc	ctgcagggat	gcctgaggct	60
tggtaaat	ctccctctgc	tcaagcttgc	ctccctccat	tccctccctt	tatttcctcc	120
cacaaatggt	gactacaaga	gcacttccta	aaaagcctcc	ctctgcctgc	taaacacccat	180
ctcagaatct	gcttctagga	ggacccaacc	tgtgcagaaa	ttttatgagc	aatttgccctg	240
tccattaaaa	aatacagcat	agactttttc	caggttagct	ggagatggag	tttttttgta	300
tcaaaaaaag	agagctaaac	tgagaagaga	agcaaaggta	gaagaataag	gtagactct	360
ccctgtataa	ctgaatthgg	gattgggaat	gatatcttgc	ttctctatga	aatttagaaa	420
ctgtcttttg	aagtcttcat	ccagtcacat	ccaagagtgg	tccaggaaga	aaaaggaaaa	480
taagaatgaa	aaaaaaaaaa	aaaacaaacc	ttaaaattgg	atacttcttt	gtgccttgca	540
ttaagcctct	atgttactgc	ccttgtccgt	ataagcaact	ctagataaaa	tcctttctta	600
gaccatctaa	tttatctccc	cgtgccattg	tgaaaatcgg	gcaggaatta	ctgcgggaac	660
cagtactga	atgggcagtg	gtgtctcgca	gctgtaactc	agagtttaca	aggaaggat	720
gaacagcagc	catccttcta	aaggcattct	tcctctcctc	cagcacagct	cagtctgtgc	780
atgcctcacc	aaggagaatg	aggaaggcc	ttgttgactg	cccagcccag	agtgtgagga	840
acagcagttg	acatgggcgg	ctggacggga	tagaaaccag	catgaacatt	tagtgacacc	900
taaggaagag	gtgaaaatgg	gggagaaaagc	caagaacccat	cagacagctt	ctttctgttc	960
ttgccttgga	tcttagggga	acgtatgtgt	tcaaggggtgc	cttcctccgc	agggcctccc	1020
atcccttggc	acaaacttcc	aaacgatgag	tagacatgga	atgggcttct	tctgaagact	1080
gggtcaccat	ccaactcagc	cttcggagta	ggcgggtggg	ctgggggaag	aggacggaac	1140
catgaggtct	ctccatcact	tcccgggtgt	gttgagaggc	aagcaaatgc	ggtgggtggg	1200
cctgggctgt	agggccctg	ccatttcggg	aggggcctcc	tggtgtttag	ctctgggatg	1260

tgtgaaaatg	tgttggtgaa	aagcgagagg	cttacacage	ccttcagggg	aagaggggct	1320
ggggcgctgg	gggcggcgctc	gggatgagtg	cagaagagac	gaggcctctg	gacagcgggag	1380
gaggagggga	gggcgccgag	gcgcggtgcc	agctgccgcg	cacagggggcc	ccgcgggcggg	1440
gcccagccgc	gggcacgctc	tgccctgtcg	ggagagctcc	gggagcggcg	ggagggggcgg	1500
aggggcgag	tggggcccgg	gcggtgctcg	ccgcgagacc	ggggcacctg	aggaggaagg	1560
aggggtgggag	cgaggggagg	aggggacggg	cgagaccga	aagtggggaa	agaaggtgca	1620
ggcagggcggg	cagggcggcg	ggcgccctgg	cccagggcgg	cgggtgcggg	agcccggcga	1680
ggtcgagctg	ggcgccggcg	ggggccgccc	cgagggagga	ggggaaggcg	gaggcgcggg	1740
gagcgtgttt	ggggcgccgc	ggcggggagg	gtggcgcccg	ctggtgcgcg	cggggcgctg	1800
tgtatgcgcg	ctccccgct	cggggaggaa	gatggcccaa	aagggaagt	tggggtgacg	1860
cgcgcggtcc	ccggaggctc	ggcggggggc	accgcgcca	gcccagcga	gcggcggaca	1920
cacagggccg	ggggcgcgca	gtccggggcg	cgccgcgccc	gccccctcac	tgcaggtggc	1980
agcgggtgcg	ctgggtcccg	gcgcccgccg	gcgcgggcgg	gcgcgcgggg	gagcccggcc	2040
gagggatggg	ctgcgcccc	agcatccatg	tctcgagag	cggcgtgatc	tactgccggg	2100
actcggacga	gtccagctcg	ccccgccaga	ccaccagcgt	gtcgagggc	ccggcggcac	2160
ccctgccccg	cctcttcgct	cagaccgacg	ccgcccagc	catcccccg	agccgcgct	2220
cgggaccccc	cagcgtagcc	cgcgtccgca	gggcccgcac	cgagctgggc	agcggtagca	2280
gcgcggggtc	cgcagcccc	gcccgcagca	ccagcagggg	cgggagggcg	cactgctgca	2340
gacagccgca	ggccgagact	cagaccgtct	acaccagcgt	gaaggtaaat	gccccgcgct	2400
ggcacacgcc	gtggggggccg	tccgccccgt	cggcggggct	cgcacgggta	gggggctccg	2460
gcgaggttgg	gtgaccgtga	ggcggttgg	ttggagaggt	tgtactaag	gaggagtta	2520
cttttcattt	gtggagatga	tgggagccca	ggaaatgtgg	tcagaaaaag	gcccctggag	2580
gggtcctgga	agcgtcctta	gctgggtcctg	ggggactggg	cggggaaggg	agcgcagaag	2640
gaagcaggtg	ggctggcctg	ttcctccttg	agggcaggaa	ggctgtggct	tggtttatgc	2700
aggaagaggg	gtggggacca	ttgagagcat	tccgtggcca	gtcctgttga	atgaaatctg	2760
agcactgagc	tggatttgcg	tgcctttag	gtgactggg	cagttgcagc	accaggatag	2820
atagtgcccc	atattccgat	ttttacctgg	gattaccagc	caggctggag	tctcagcaca	2880
ggaaccagagc	gtagggatgt	gtgaatgaat	gagtgttcgt	gttttaagag	atgtgggaac	2940
ggagcagagt	ggaaacctgt	gtttgtcact	gtaacgtttc	tctgggttgg	ctgcatccta	3000
gacagaattg	agagaaccgg	gccatgagtt	cggagtgtca	gcagagccac	cgtgagggga	3060
cgtggtttcc	agtgcagtac	agctgtctga	ggatgattct	gcacatacaa	ctgatcttcc	3120
cagagagtg	gattttgagg	aagtggaaaa	aattgtttag	atggttaaag	cagtcgctaa	3180
atatttattt	cttaaagaca	gaagaaaaat	aattatttaa	atagtgtcct	cccgtatgtt	3240
ctcaaagtac	cgttaaatcc	aagaggcttt	tcatgtgtga	aatctgggca	ctgggtcttt	3300
tttcctttca	gcaaacaaga	taacaatggc	atatectatt	gtacagagag	aaaaaaatac	3360
tcctaattgtc	agatagaate	acagccttta	cctgggtcaat	aggttaccaa	gaaccattcc	3420
atggattatt	tgtcaaagac	acatttgtat	ttttaatagt	taaaaacttg	gtcttcattg	3480
gatgaaggca	gcccacagtg	gaggagtgag	gagaaggata	acatgttttg	gcttcaatct	3540
ggaagtccaa	aagtttttta	atgaacctat	tttttttta	acagcatctg	attgtttaac	3600
atgaagcttg	actgatgttt	gcttgtgggt	gcagtgttcc	tctggcagta	atcataatca	3660
ccattatagt	aaaaacatcg	tttattgagc	acctaactatg	tgccaggagt	aagctttctc	3720
tcctaactat	tgaatgttaa	cagtgtgatc	ttagcatagc	atgtctgaag	actagagtct	3780
aggatttatg	acagtacaaa	cctaccagtt	gcccattcgt	tacagaggca	tgtgctgaac	3840
getatacttt	gcttttgtca	agctctctct	ctctccccct	ccctgttcac	acaaagttag	3900
ctttaggagc	aattttcagg	gatgaaaatg	ttaaatttgg	tgaaaatatt	aagttgggat	3960
attatcagta	aagaccatcc	ttttgcctga	cggttgaaga	cctgaagcag	tagttcaaaa	4020
ttgtgacagc	tcatgaactt	tgtgatactt	tttttgggtg	ctccagagaa	attgtgaatt	4080
tttgttttct	agaatatcta	taatctcagt	ttagtacttg	gcaactctag	ctactccatg	4140
tttgttcagt	agaagaaaga	atactgaatg	aaccttctct	gtacattttt	aatacttccc	4200
tcaagaggct	gcttagagac	caaatgaagt	aaaaactgaa	gggacaatga	gccccaatga	4260
ttagcagctt	gtataaaact	gtattaatct	cattgctact	tggcttaagt	attaaaaggc	4320
ttgacctggg	taggagttta	actcattttg	ctttatcaag	aagattccca	aataagagct	4380
taattcactc	taaccatta	ctgggaatgt	tggaaatgaa	accctgggt	cattgactta	4440
acactacttt	gcattgtgtg	gatctcagaa	agtatatatt	tgaagtgaaa	tttgagacca	4500
gagttattta	tgcaaatctt	acagaattat	tatcacagaa	ctgcccta	atatttaata	4560
gtatcctttt	aggcctgtga	ctcggtgttg	tattgtcttt	tctcaatcgt	aaagttcaca	4620
tgttctgtgc	cctttttgtg	ctgagataat	tttataaaaa	ctttacattc	atttttttgt	4680
agactaagca	ttcttttttt	cccgtaagag	tttgagatag	ttgctaggca	cgtgggtgtg	4740
ccccaccctt	ttccaaagca	cacaggtgga	aaaataaaat	ctttaccatt	tggctctgtt	4800
tacagtggtg	gaaggttgta	atagtttcca	ccccctcccc	ctggccattt	tacatcaatt	4860
atgaagtgtg	tctcatttat	ctacttggcc	tctggtatct	cccagagtgc	aaaaatgtgt	4920
gcttgatctc	tctctctctc	ttttctagca	ataattcatc	tcattaagct	tttagaatga	4980
tgaggcatta	tgatgtcaaa					5000

<210> 3  
<211> 5000  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

5 <400> 3

ES 2 638 294 T3

aagaaaaata	gacctattgt	aagtgggata	caattatfff	tcctaacct	ccagccctgc	60
agcatttcta	gtaacagatg	ttagatgaga	agagttattc	ttctaagctt	tacagaatgc	120
taaataaatt	atctcaaagg	ttgactcagt	aagaatttca	aagagttaat	tgtcagtatt	180
gaactttgtc	aactatcatt	ttcatttatt	cattttttgag	tatctatfff	gcatgaggca	240
ttgctctagg	gagttgggac	atatcaataa	agtcacaaa	gttcttcaac	attggagctc	300
aaattctggt	ttgcgggggg	gagtagggaa	atagatacta	aacaatagat	tttataagta	360
attatfffgg	tttgttagaa	agtgatacgg	gaaaagcaaa	ctggaggaca	gtgaatcagg	420
aataggagaa	gaggttgca	cttagagtgg	tttgggatga	aatgatagt	ccacagaaat	480
ggagtgtgcc	acacgcatgg	gggagtagg	ggtggagcac	gttgctagag	aggggctaga	540
catggagata	tgtctctatt	ttcagcagag	aaggcctgtc	aagatattaa	aagtacatct	600
cattgtcccc	ttctcccact	tgttggagt	cttctggcc	ttgtctctca	gagctgaaga	660
tgacataaat	cataaaaagaa	ataaatggta	ccgcctgggc	tctctgatct	tataaggtcc	720
cacctaatff	aagctctggt	ggatagccta	tttcccatta	gttgtctcaa	ttcacagagg	780
atggagaaa	aaagcactga	atgagatgtg	cagctcaact	caatgggcac	ttgtagccc	840
caattatffg	gctaggacaa	ctttattcaa	gttaatggaa	tacaaaactc	agcagttctt	900
atggagactt	caatgtgctg	tagaacaaac	cacagataaa	tgaactgtct	gaaagaataa	960
tatgaggcac	ggctaaaaca	gtgttgtgga	agagaaagat	caactgtaatc	tagagttagt	1020
tagagttagg	gctttctgga	aaagtggagac	caacattaca	ccttcgaaaa	ctagtgtggt	1080
ggtggtgcaa	gtggaggaaa	atgggaaaga	ggcaacagt	tcataaaga	cacagaggca	1140
gaaagggcag	aggccctggg	atagttaaaa	gagaagtcta	gctgagggac	ttcttgactt	1200
gactagcagc	aattagccat	gactaataag	gctttccaca	ctccaaagac	ttagatggag	1260
ggataaaaaa	ccatctaata	gcagactgtg	gtagcctccc	tagagacaca	gagctgggccc	1320
ggatgagtcc	aggcactgac	gtgatccatt	atctttcacc	ttaaagagta	aaagggaaac	1380
taaagttaat	tacctccacg	aaacaaaaag	gtgccttctt	gtgcttcaat	tacatggata	1440
tattctacta	gtctaaaagt	atcttctcac	ttctttctgt	caactgtgagg	acttgagtca	1500
gaagaaagtt	taaatacagt	cattgagctg	gaaagagtgg	aaagagaagc	aaagaggggg	1560
aagctgtagg	aaggacgaag	tcacccccaa	gatacatggt	tactgcttac	accaagcaag	1620
ctgccttggg	aacgcttccc	ccgagcagcc	agaatgctca	gcagtggaag	acacctctat	1680
tcctgtaggc	gagtcctggg	aaagctggtca	atctgcaaat	gccaatccc	agcagtggagc	1740
tcggtccacg	tgtaaatcaa	gatttgggga	aagagtggg	tgggtggcat	ggttgacaat	1800
gtcatcagct	ccctcctctg	actcctgtgg	tcgtgcccc	atctactctc	actcagctac	1860
accccactt	cggatttgtg	atggacgctg	ggtccctagt	aaccacagca	agtgtctccc	1920
ccgcacttcc	ccctccccca	ccccacccc	cacccccaac	caccaccca	gcgatggagc	1980
ctactctgct	ccaagccgcc	gctaagaccc	ggagaagcgg	aatttcactt	tgaaattccc	2040
ttgcctcgtg	agggccggcg	ctgggcatgc	tcagtagccg	cggcgctgct	gctgggctgc	2100
tgggctggcg	cggagtccac	cctgccgtct	ccgccttggc	ttctgggctg	ccagaaggcc	2160
aggcatttgc	cgcctctgag	cgttctgtt	ccccttacc	gcaacctcct	actgctcttc	2220
ctctctccct	ctcttaggga	ggttgaagct	ggtgctggtt	tctgtcggcg	ccacagactg	2280
actgctctgc	aaaccccagc	cgaggacctg	aatcccggag	actagaagac	ccttggcggt	2340
ggctctttct	aatagcactt	tacctgaagt	ggggtcgtgg	tggagtttct	cctccacctc	2400
tcaatgcaaa	cactatgctg	agagcagtct	gcttccctgc	gctgtgctctg	ctccttaatc	2460
ttcacgctgc	aggtaagggg	ttgccagget	tagagccgga	gctgtgcatg	agatgggaaa	2520
ctgcacatgc	ttaaggactc	taggaaaagc	ttgccttgcg	aagaaagcct	ttctaaaaag	2580
gtaaaaacag	acagtacctg	acagggaggg	ggtgagggag	tcgtgcacct	ggtgaaaac	2640
tgaggccgaa	aacttaacct	aaaattagct	cctgattttt	ctttacttta	tacgaaaata	2700
gtgaacattt	tcaatatgaa	tacaggtttg	ctccccctt	cgcctcccct	ccgtctagat	2760
tcctgctct	tgtttctagg	ctatgcactt	aactgtcaat	ttttcaggag	agggataaga	2820
catcctgcta	gatgtaacct	tttctactgc	agcggctact	acattcataa	ggtctcttgg	2880
tctagcgagc	gctcatagga	aggcattggc	tgtaacctga	tggaccacat	ctccgcccac	2940
aagatcgaaa	tacatggttc	acattagtga	tgctgcacca	ggctcctttg	gcccctgctc	3000
ttgtcactcg	aatfffctaa	gccaaataaga	ggaagaaaag	gtttcaataa	gaatcctctt	3060
gtctctttca	gcaccgtggc	tagcgtccgc	tggcatatta	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	3120
aaaaaaaaaa	acaattacag	ttccaaagct	gacaaccctg	ggttaggcac	tgtccctcgg	3180
acagatttga	taaggtgtaa	ccaagagtaa	cagtggagct	gctcccaaat	ataaatagat	3240
ttgagggacc	agaatcaata	tcaagctctg	tgaggaagca	aaccttggga	agtacctgag	3300
agatattata	tgtggtgtcc	ctgctttttg	catacatagc	acctctatff	aatgcagaca	3360
gacttgctag	gctgaattcc	ttatcattgt	cacacacaca	tgaacccaaa	taaaataggg	3420
cagggagatt	ttagaaaccc	tactgtgaca	gcagttgtcc	atgcagtagt	cctgtaacaa	3480
ccagagacga	ggcattttcc	ctgagtgctc	ttctcatcca	atcacacata	tccattcatt	3540

ES 2 638 294 T3

ccttcaagca	acatttgctg	agtgatact	atggtctagg	ggtaatgagt	aaaaataatt	3600
gttctgaaat	tacaatcctt	gcagtatcct	ttttaaaaga	gtgggtgaat	tttattctct	3660
gtgtacaata	gtaggagtga	aatatgggtac	tttcttattc	cagctaacgc	tattatttaa	3720
atgtatcatg	aatcttttga	gcaaataatg	cataggatta	ttaaagctat	tattaataac	3780
acatgttaat	tgttataaatt	atgatgttat	attgtggagt	tttcaatagt	tctttggcac	3840
attttgagaa	gtagaaaata	gctatgactt	gattattaaa	ttatttgcaa	acagctgtag	3900
tgaattatth	cgttaccaca	tacaattcct	caatgctgaa	atgtgggatg	aaaacataca	3960
cattgggttg	agttttatth	atagtattgc	ttaataatag	actgacacaa	acattcatta	4020
cagaaaaatc	tcaattctta	ctaaggtagc	aatgatttag	ctggtctgcc	aacaatatca	4080
gtgtagtcat	tttttcaaaa	ctaacatata	aaaaagttta	aagatcacat	ttgatacatc	4140
ttgagtaatt	atatctttaa	agttataaat	aaactgaagc	atgtgaaaaa	catgtcttga	4200
tttactgtag	atgaatattc	gggatgagaa	aatgaggac	ttttgctcat	cagatgagaa	4260
acctagaagc	ctgtagccct	agattttacc	tggagttctg	ccaaagggtg	tattaccaa	4320
gccaatccaa	tccatctcta	cttcaacttt	ttaatttgca	aaacaaagat	aaaaagtaag	4380
attaatcaac	caattttaat	ttaataagaa	aatgcattta	aggacatttt	tatatttcaa	4440
ttgcaagata	ctattcattg	tattcatatt	taatatagta	aaatacattg	gtgttttatc	4500
acagcagatt	gtaagtthaa	tattatagtt	ctcttgccaa	tttcatttta	aatgcatttt	4560
aattttaaac	agcaatttgt	gggtcacaa	ctgtcatcag	attaaaattt	atcacagtta	4620
tctaataaca	ttgttagggc	ttttcatcag	aactaaaaca	aacacagctc	cttgggtctaa	4680
gcttctatac	atthggagat	taagaaaata	agtggatggg	atgacaaaga	tcaagaaatc	4740
aagatattaa	tctctacttg	ttgaagggtg	gagtttgtha	cttttatgga	agacttttct	4800
ctcagaacag	aggctgactt	cataaagaag	ggaaatgaat	tctatacatt	caggcctctt	4860
taactgtaaa	gctaattgat	ccattttggt	tacgcccagg	gtatcagcaa	ctgctttatg	4920
ctggtggaac	tgatgacacc	ttataatgct	ttagagatgg	gaggaatgtg	ctaacgggat	4980
gtaagtgttc	tttttagcta					5000

<210> 4

<211> 5000

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 638 294 T3

gacgaccctg	aatgatccct	gcctcctagt	acttatactc	ttgtgtagcc	tccacctact	60
tagactcaca	gctgattttg	tgaccaagag	tataatggtg	tatgacttca	gaggcttggg	120
tcagagtcag	aagtggccat	ttcatcatcc	tctaaatttc	tctttggcag	attaatgaat	180
gtgagaaagt	aaaaatggta	tagaagaaag	ttagcctgag	agatggctgg	ctttgtacct	240
gtttgggtctt	tttccttcct	ttcctccata	agcaaatact	gacgcatgta	catatagaca	300
cactcaacac	agtgggatgt	taaagggaaa	ctagagccac	tgcgcccttc	ccaagatcag	360
agaacatagg	aaagatgatg	actttttgca	tctaccctct	cctcttgaac	tcgcaacctt	420
gtcttgaacc	acaaataagg	tcaagtagga	taaatctaca	actgtctcct	caactgtccg	480
ctcacaagtg	tgaaattcaa	ccatccttgc	tgaagttgtc	ttttaatatc	agtaatcagc	540
aataaccaac	ctctgagctt	tgcttatatt	attaaatcat	tttatttgac	cctcaggaca	600
aagctgcaag	cccagcatta	cattcttcct	tttatggaca	aaaaaaaaaa	aacaaaacaa	660
aaccgagata	ggcacgaaga	aactaataaa	tggctgaaat	gctatttgaa	tccacatctg	720
tctaattcta	aaagtgtgct	ttccaccaca	tcaccgcacc	tacaaggaaa	atgcagcctc	780
taccctctcc	tgaagaatgt	gtaaagaggc	aatatggtgt	gttttggaaa	aagcatcttt	840
gcagaaagaa	agcattagct	tcagtcatat	tagcatcctt	atccagcagc	agtagcatta	900
ttttacatat	cagttactcc	tccccaaaca	ctcaatgaat	tagatgccac	aatcatcctc	960
actttcaaat	gtggagaccg	aggcacatct	ctaagactgg	agttcaggca	ttctggctcc	1020
agtcttagag	atggttaagg	gttcacactc	ttaaccatit	attacaccat	agagctcacc	1080
aggtttgagg	gaaacaggat	caaatcaaaa	gagtcactca	ggactccagt	cctcactcaa	1140
ggacaaaactg	ttccacctcg	gacagggaga	gtttccgcat	tctgagacct	agcataacag	1200
gtcctgaccg	gcatctggca	ctcggactcc	caatcatact	ggatcacact	ggctcgggat	1260
gtgtaaagtc	cagggcttct	cacatttgat	gacaccaaag	ccgcctaaaa	acaagagaga	1320
attaacaact	acctacggcg	gtctgatatt	tgcccaagag	atgccgcccc	ataaaaactcc	1380
tttacatctt	tataacgttt	ttattttgcg	ttctccttca	taaccacat	ttaactcacc	1440
atagatgtaa	tgttttaaata	tagttaccag	ataaactctt	acgcttccaa	actttaaggt	1500
tccttcgaaa	ccttctggta	aaactgttgt	tccacggaaa	tgggaacgta	acggatgagg	1560
caatcttcca	cagccgcaca	cagttgtgta	tccaccgcta	aacgggtcca	gtcatacatt	1620
caacgaccca	cgcgaggatca	gaagctacca	ccacacactg	tcaaaatcac	gcacacacag	1680
tgacggcccc	ttgccactc	ggtcactcgc	ccacaatctc	tcgctagaga	atcacacgca	1740
gatagcacac	ccagcaccac	agaccccagg	aagcaacca	gggactcgaa	cacacgaaca	1800
gcactcctcc	gcgcactgcg	caggcacgcc	tgcgtccggc	tcaccctgaa	acatcgcgag	1860
atccggcttc	aaggccgggc	tgctgccttt	acgcctaaag	actatgtttc	ccggaagaca	1920

ctgcggcgcc	ggccctatca	tggcgcagca	tcggtgtgct	ttgtgcgtct	gcgccatctt	1980
ccggctgcgc	acggcgaatc	caccgggtacc	gtgggtggaag	cgcgccctgg	gctgccgggg	2040
gcgcgccgc	ggtggcactt	ggacccgagg	aggcggcagg	tgagagggtc	cggagctttc	2100
caggcgctct	ggggtccagc	aggagctggt	gcccgggccc	gttgggtctc	aggcctgaga	2160
agaacgcaga	cgtctcgcct	catcgtcgc	ctgtggcttt	accggcgtga	gactacattt	2220
cccgccggcc	ctcgcggcgt	gcgctttctg	gcgccccctt	tctgcttcca	gcctcatagc	2280
ccagggtgat	ggacccctta	ggtgggtgcg	caggggtctc	cgacccccctg	aaattgcgga	2340
tgttttgcat	tactgttat	gcgtgccttt	tttttttttt	aatctgagag	gaaatcttgt	2400
ttcatgaggt	tctcagagag	ttacaagacc	ccagaagact	tagaacctgt	agtttagaaa	2460
aaacttact	tgggaacatt	ttatatgttc	aaattctatg	tccagcaatg	gggaaacact	2520
tgagtggatc	acaggccatc	ctttgtaaat	aggatatcgt	gcagttaata	caaataatgc	2580
ttataaaagt	ggtcataata	aggaaaagct	gcctattaca	tcatattaag	caacattcat	2640
aattatttca	cttacacggt	acttagaacc	aatgtttgt	aatgcagtag	gcaccttata	2700
tactccttta	cagagtactt	cttgtttaac	agtgagctca	agaactgggt	aatgacaac	2760
actgcgaata	cttgggtggt	ttttcttcca	atTTTTTgt	tttgtttgt	ttttagcctg	2820
tgtgttagtg	agtttgactt	ctttttgctg	aatgttctca	aaggattcag	tagttaatat	2880
ctttgcttgt	cagtttttga	tagtcatttt	tgatagtcac	ttggcatccc	attatatggc	2940
tgtgccaaaa	atgattcaac	ctcttggcta	cttgtggact	tgccacttta	cgtactaatt	3000
ttcagttctc	ctatttagca	aatattattg	gacatgcagc	tttgtgcact	gctgtgtctc	3060
tatggaagga	cacatttatg	tgctgataat	ggagcactgg	gcgtgctgtg	tgtaatTTgt	3120
ctcttactgt	tcttcccaac	tctatcccac	ttgttgatgc	aaggcatgct	ccatgaagtg	3180
gcatgcacaa	agcctcagtt	tgggctgtag	agctttttgt	atatttggcg	gttgggaaaa	3240
gagccaggta	gactttcaaa	ggtgttatat	ttgctgcagg	agagagttaa	atggcctagt	3300
cctggaaaagg	ctttattcta	ggctggggct	atgcaaatga	tgaggcctt	ctatgctccc	3360
tggcttgagg	gaagccctcc	ttgtccttga	ggtaacatgt	gggtctcagt	cactagaaca	3420
gccctcagca	tccctgtctt	agacttgcac	ttgcagcaaa	acagaaccac	tggatgttta	3480
ggggaaatgg	gagggaaagg	accactgggt	cccctttgcc	ttgcagcagc	taaagctggt	3540
ttcctggggg	tgggtgagga	tccctttgcc	tccccctcct	tctcattttc	ttggtgggca	3600
gagggcaagc	aggtggggac	ttgtaacttg	gcattctagg	aactgtgagg	caagcctagc	3660
ctctcatggt	tgccttttcc	tccccagct	ctaccgtcgc	aggactctgc	ccttccccaa	3720
gagaggaacc	agaaggagga	cctatcagcc	cttgaatttc	taaaagtcat	gtcccttgtg	3780
agtttttaa	tcccataaat	atTTgctttc	cttatcttga	aactttccac	ctgggttcca	3840
tccagaaatt	tggttctcag	actttcccac	tttagggaat	aaaaggacca	ggcaggagtc	3900
tccctctcca	ttgtcctctc	ccctctgaca	aatgcccaca	gatttattct	ctatagcatt	3960
ctgcatctcc	tgatggtttt	cgtctgctag	gaggagaaac	tattttccct	gtatgaaatg	4020
agagcatcct	ttgtaagaac	tgaagtttga	agagatggaa	tgaatgctta	ggagcaatca	4080
catatagaaa	agcaggggag	gtgggtgttg	ttggtttcag	tttcagcgc	tggtagcagtg	4140
tccctgctttg	ggaatgatta	atgattggat	atgtaattga	ggtttggctg	ggaatccatc	4200
aaaaatttga	tgccagaatt	aaagtctagt	ttgacgttgg	acagagcatt	tgaatctggg	4260
acatcctcca	ttagtttctt	tagcttaaga	ggaagaaaag	tacagagctg	aggatggtga	4320
gcgatgtagc	aagtgagatg	atcatctagg	tgggtgagtg	gtcagggctt	ggaaaagcct	4380
tagagatctg	atccaacctc	gggatccaaa	ataagaggat	gtttgagtca	gttgtttcac	4440
ttgatagaaa	attgtgcact	caataaaagt	tatctccatg	gtttttccca	tgaagaaaaa	4500
tgcttgtgtt	atgttccaac	ataatgatga	actttcatct	ccaagaaatt	cttgacttac	4560
atgaaaatcc	tgtatctaag	atagaaaaca	tgtttccata	atTTtaaaaa	ataaaatatt	4620
tggggaaaat	ccatcagaaa	tattttttgt	tgttattggt	attccaaaag	atagaagtga	4680
taggtctcac	cttgagaatt	tattgtatgc	caagtataga	gtgggcagtg	tgctttatta	4740
cactgtttct	taacaataag	gaaaactcca	tttagcttga	ttttaatttt	catcccagac	4800
ctgtacacag	agcattgatt	tgacgttaaa	aggaatggtt	gagaacaatt	tgatcattct	4860
gttttactca	tccccatttc	ttctgtcacc	tttcacattc	agtcccaccc	ttcttgttca	4920
acaaaacaac	ccccctccc	gcaaagacct	gccccatctc	ctttcatccc	actgtgaacc	4980
attgaaatac	atatatatca					5000

<210> 5  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> forward primer

5

<400> 5  
 gtttcgctg ttttcgctc ggagatc 27

<210> 6  
 <211> 25  
 5 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> reverse primer

<400> 6  
 10 **gctctcgctc tcgctattac tcgct**  
**25**

<210> 7  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

15 <220>  
 <223> forward primer

<400> 7  
 tgtgtatgcg cgtttttcg ttc 23

20 <210> 8  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> reverse primer

25 <400> 8  
 acctatatat cgcgctcc gtc 23

<210> 9  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 30 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> forward primer

<400> 9  
 cggcgttggg tatgttagt agtc 24

35 <210> 10  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<220>  
 40 <223> reverse primer

<400> 10  
 aattacgaat aaaaaaaca aaaacgctc 29

<210> 11  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

5 <220>  
 <223> forward primer

<400> 11  
 tgacggtttt ttgttattc ggttattc 28

10 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> reverse primer

15 <400> 12  
 cgaacgcaaa cgtacctacg c 21

<210> 13  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 20 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> forward primer

<400> 13  
 ggtaagttt tttttyggy gtagtt 26

25 <210> 14  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<220>  
 30 <223> reverse primer

<400> 14  
 tactccctct acctcccrac tctctc 26

<210> 15  
 <211> 28  
 35 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> forward primer

<400> 15  
 40 ttgtggygta gaggattatt agtttggt 28

<210> 16  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> reverse primer  
  
 <400> 16  
 ctaaaaacrc aacctatccc tc            22  
  
 5    <210> 17  
      <211> 27  
      <212> DNA  
      <213> artificial sequence  
  
 <220>  
 10   <223> forward primer  
  
      <400> 17  
      ggaatttat ttgaaatt tttggt        27  
  
      <210> 18  
      <211> 33  
 15   <212> DNA  
      <213> artificial sequence  
  
      <220>  
      <223> reverse primer  
  
 20   <400> 18  
      cccactca aataaaatac tattaaaaa aac        33  
  
      <210> 19  
      <211> 30  
      <212> DNA  
      <213> artificial sequence  
  
 25   <220>  
      <223> forward primer  
  
      <400> 19  
      tagtgayggt ttttgttta tyyggttatt        30  
  
 30   <210> 20  
      <211> 26  
      <212> DNA  
      <213> artificial sequence  
  
      <220>  
      <223> reverse primer  
  
 35   <400> 20  
      taaacrtaaa aacaacaacc cracct        26  
  
      <210> 21  
      <211> 5000  
      <212> DNA  
 40   <213> unknown  
  
      <220>  
      <223> bisulfite sequencing of DBC1  
  
      <400> 21

ES 2 638 294 T3

ggtttttatt	tgaagttggt	tgattayggt	gtttttagatt	gatttttagaa	ttgtattatt	60
agtagggtag	ttgttgttta	ttaatagtta	tggaagtaga	tttttagttgg	gggatgatgg	120
ggaaataaag	agaaagatag	ggaygaataa	aggaaggaat	ggggtataga	tagaaagaga	180
gagagagaaa	agaaagaaa	gaggagaggt	aagagatagt	gattttggggg	tttatatygy	240
ggtgggtggg	agaaggagt	tgtgtggtgg	gygtattttt	tygtggttag	aattaaagtt	300
agaattgatt	tggggaattt	gtgtttaaga	tttgaatttg	gattagaagt	taagggaaa	360
agaaagttgt	ttaagaaaa	aggagaaa	ttttattagg	ygaaaataga	aatygttgat	420
tgggtttgtg	gttggagagt	tgttygtggt	gttgattttt	ttttattggg	attttagtga	480
aggttgagaa	gttttgtatt	ggttgttttt	tttttttttt	tttttttttt	ttagttttga	540
ttttttgaga	tttaggatta	ttttgggttag	tttgatggtt	tttttttttt	tttttttttt	600
ttttttgtyg	attaaataat	tttttygag	tttttagttt	attatttaa	tatttttttt	660
ttattttggt	ttaagatttt	ttttttttta	attagtttat	tggtttttag	attgtttttag	720
gtttttttgg	tggttatatt	ttttttttat	tattttttga	attaaaaaat	aaataaaaaa	780
tatataatgg	taattataa	agtagataat	atgtattgag	tatttattag	gtggttaggga	840
gtagtttaag	tgtttttgta	tatattaatt	tatgagtagt	ttaagtgttt	ttgtatatat	900
taatttatta	taattttata	ttaattttat	tagatgggta	gatataattat	tattttatta	960
aatagataag	gaattgaggt	ttaaggggta	agtgatttta	ttaagattag	atagttatag	1020
gattttaatt	tttttgaggt	ttgtattttt	attgaatttg	gtttttttat	atattttaat	1080
attttttttt	atgatttttt	gtttttttat	ttggtagttt	taatgttttt	tatttttggt	1140
taatttttag	gggattaggg	atttgtattg	ttgatttggt	ttaaattaga	agggaggtaa	1200

agtaataaaa	tatattaata	gtgygttgtg	tgggaattat	tataygaggg	ttttattttt	1260
tgtttagga	agaggtttta	tgtagtagt	tttagttgt	attaggtt	attgtagagt	1320
attttgtttt	ttatttttat	gttttagttt	ttgtattttt	gttttttttt	ygtttttggg	1380
ggtttttaga	gaatttygtg	tttttttagt	tttttttttt	tatattttgt	ttaygtagag	1440
aagtttttgt	tttatttttg	gaggttaygt	gggttttygt	ttatataty	agagaaataa	1500
atagtgttaa	atatttatag	agagaygygt	agatataaay	ggatttatay	gggtaatttt	1560
ygagataaaa	tttatattty	atggatttay	gyggygtgg	aaatatttgt	ygtttttagaa	1620
atatttaggt	attygygata	tataatagat	agttaygttt	aagggtatta	ggatttyggg	1680
ttgygygta	tygygyggtt	tttggatgt	tygtgygtat	agatataata	ttttataygt	1740
tttagattta	ygaaattttt	tayggtttag	tttagttta	tygggtygt	tttttttyg	1800
aggyggtttt	tygttttttt	tttttygtt	tttttttttt	tttygttaa	agatgtataa	1860
aatattttty	ggaagtaatt	tyggygttta	gttttttttt	tttygttttt	yggygttygt	1920
ttttttattt	attttyggyt	gygttyggtt	aagttttttt	tyggygtag	ttyggtttty	1980
gtygtttttt	gttyggagat	ygyggygtat	ttggattttt	ttttttatty	gttagtygtt	2040
tygttttygg	attttayggt	tgtaaattga	tttgggygy	ggggaggagg	agagygtagg	2100
ygagygaatt	ygygagagag	ggagagagy	agygagtaat	agygagagy	agagygagag	2160
agtygggagg	tagagggagt	agtgatytgt	tttyggagty	gggatttatg	tttgttttyg	2220
ggattagyga	aggggatttt	ayggttgagt	atgagttagg	ttgtaggag	ttaggtattt	2280
ttaygtttgt	agtttttygy	tygtgttygg	aatgygagtt	gtaygtaggg	tttttttaag	2340
tttttatyga	gtygaaataa	aagygttttt	tygtagtttt	tygttaaaga	yggatttga	2400
tttaggtaa	ggygygytyg	gggtgagygt	tygtagtttt	yggtgttttt	ggatttygggt	2460
tygggygta	tygggygygt	tttygygttt	ttttgttttt	ttttttatyg	gtatttttgt	2520
tygtttttta	tttggtygtt	tygttygtttt	taagtttttt	ttagttttag	ggagggggtt	2580
tttgtgtttg	gggttttaag	ggtaattgy	gggtttgagt	gagtgygytg	tgtgttttyg	2640
ygygttttyg	aygtgtgtat	tatggtggga	atgtgatgtg	gtgttagtgt	gtttgygtgt	2700
gygygytygt	ttgygtttga	tgygtgtgtt	ygtggtgtgt	gtgtgtgtty	gtgtgtgtaa	2760
gggaggggtg	aagagagaga	ggttttataa	tttatttayg	gygygatgtg	tgtgtgtatg	2820
tttgtaygta	tgtgtttgta	tgtgtgtttt	ygtgtgtttt	tttaattagg	tttttttagt	2880
ttataygga	tgggattttt	attataggat	taygtagtta	tygggaaatt	yggtgtggat	2940
tttttttgg	ggttttgggt	ttggggtttg	gggaggatta	tggggttga	gatggatttt	3000
tatttagttt	aatgttggta	ygtttgaagg	aaaatttttt	taaaygggtg	aattttgtta	3060
tattgggatt	tatagtttaa	tatgaaagag	atatggttaa	tttygaggt	aaatgagayg	3120
ttgttatttt	aaattttata	ttggtagat	tttaagattt	tgatgggaat	ttggagatat	3180
tggatagtgg	gtgatagaga	aagggggaag	ttagygggtg	gttttttatt	tggggtttgg	3240
aaagtttggg	atagggattt	attttgtatt	tygttttga	attaatagag	tttttygggt	3300
ttttgttggg	tttggggagg	atttggtaag	tttgtatgga	tttttttag	gggaaaggag	3360
aaagygtttt	yggggatttg	tttatttatt	atagttgtaa	agggttttag	aggaaatttt	3420
atttgggygy	gttgtggatg	atatggaagg	agatggatgg	ggattttttt	taagatagat	3480
tygttttttt	tttttttttt	taggygggga	agttttttaga	gagttttttt	ttaaatatgt	3540
tttttttgg	tttttttggg	gttaggggga	tattgagaga	aggtagagag	gtggagaggg	3600
agagagagag	agtaagagy	agagagaggg	agatagagag	agagagtgtt	ttagtattga	3660
gggagattta	taatttgaaa	aggggttgtg	agtgtggaat	ttatgataga	atgtggtagt	3720
aattgattta	aattgttgyt	ggtttgtatt	tygygttttt	tatttgggtt	taaaatattg	3780
ttagggttag	gggggyggtg	gaggaatttt	agttaggaag	gtagtttggg	ttagggtttt	3840
tttttttttt	ttttttattt	tttgggaggt	tttttaggta	ggttttttgg	ttattttggg	3900
ttggatttgt	tgggtttggg	ttttggggtt	agttattgat	ttgattttta	gttgtttttt	3960
aaaggtttgt	tttatttagt	aaaaatgtt	agttttattg	ttgttagtat	ggtttttaga	4020
tttyggtagtt	gttatttttt	taaggtaagy	ggtagtygtt	ttgttttttag	gtagggaggt	4080
taggagaaga	taagggttgt	gaygttggga	tatagttttt	tgttttagttt	agtayggagg	4140
ggygttgaa	aagttttttt	aggggaaaaa	agtagaaata	tatttgggtt	aaaaatgta	4200
tatatatatt	ttaggaagat	atatatatat	atatatatat	taattatata	tatatatata	4260
tatatatag	tgtttatatt	ttggggagag	ataaaagtaa	atatgtattt	gtaggaattt	4320
gttttagtgg	gtgggtttta	tttgtaggta	tttgtagata	tattattttt	tgtttagagg	4380
ttgatatttt	aggttgaagt	ttttatatag	ttatagagaa	tttttttttag	gaaatttatg	4440
ttagggtaga	gttttttggg	ttattttggg	tagggggtat	tagggttaag	gaggagattt	4500
atttttggga	attgttttat	tttttttttt	ttttaattta	tagaygatyg	aaattggaag	4560
gaatattaaa	gagtagaaag	gtaggatttt	gtggtttaaa	gagggaatga	gaatttttta	4620
atatttagta	gtgggttagt	ggtagtttta	ggattagaat	ttaggtttat	taattagtta	4680
gattaatatt	ttttttattt	tttttagtaa	tatatatttt	aggattgtat	attgttttta	4740
tttttttttt	gttaattttgt	tattatgatt	tttattaaga	taatygtttg	ttttttttta	4800
ttaaatttta	tatttttaga	gatgtatttt	agggtttttt	tatttggaaa	tatgggtttg	4860
aagagaaaag	atttaatgtt	tttaattatta	tttygaaaag	atatatatat	atatatatat	4920
atatatatat	atatatatat	atatatatat	atatataygg	tggtgggggg	aggattgaga	4980
gagagataga	gagagaatat					5000

<210> 22  
<211> 5000  
<212> DNA  
<213> unknown

5 <220>  
<223> bisulfite sequencing of PDE8B

<400> 22

agaataat	ttt	agaat	ttgtagg	gtttgag	60
tggttaat	ttttttt	ttaagtt	tttttttat	ttttttttt	120
tataaat	gattata	gtatttt	aaaagtt	ttttgttt	180
tttaga	gttttt	ggattta	tgtgtag	ttttatg	240
tttatta	aatatag	agatttt	taggttag	ggagatg	300
ttaaaaa	agagttaa	tgagaag	agtaaag	gaagaata	360
ttttgtat	ttgaatt	gattggg	gatatttt	ttttttat	420
ttgttttt	aagtttt	ttagttat	ttagagtg	tttagga	480
taagaat	aaaaaata	aaaataa	ttaaaatt	atatttt	540
ttaagtt	atgtatt	ttttgtty	ataagta	ttagata	600
gattatt	tttatttt	ygtgttat	tgaaaaty	gtaggaat	660
tagtgatt	atgggtag	gtgttt	gttgta	agagttat	720
gaatag	tatttttt	aaggtatt	tttttttt	tagtatag	780
atgtttt	aaggaga	agggagg	ttgttgat	tttagtt	840
atagtag	atatggg	ttggayg	tagaaatt	tatgaat	900
taagga	gtgaaa	gggagaa	taagaatt	tagatag	960
ttgtttg	ttttagg	aygtatg	ttaaggg	tttttt	1020
atttttg	ataaatt	aaaygat	tagatat	atgggt	1080
gggttatt	ttaattt	tttyggag	ggyggtg	ttggggg	1140
tatgagg	ttttatt	tttygggt	gttgagag	aagtaaat	1200
tttgggt	agggttt	ttatthy	aggggt	tggtgtt	1260
tgtgaaa	tgttgg	aagygag	tttatat	tttttag	1320
gggyg	gggygy	gggatg	tagaagay	gaggttt	1380
gaggag	gggyty	gygygt	agttgty	tatagg	1440
gtygag	gggtay	tgtttg	ggagagt	gggagy	1500
aggggy	tgggtty	gyggtg	tygygag	gggtatt	1560
agggg	ygaggag	aggggag	ygtagat	aagtggg	1620
ggtaggy	taggygg	ggygttt	tttaggg	ygggtgy	1680
ggytag	ggygyg	gggtygy	ygaggag	ggggaag	1740
gagygt	gggyty	ggyggg	gtggggy	ttggtgy	1800
tgtatgy	ttttty	ygggag	gatggt	aagggaa	1860
ygygyg	tyggagt	ggygggg	atygygt	gttygay	1920
tatagg	gggygy	gttygg	ygtgygy	gttttt	1980
agyggg	ttgggt	gyggyg	gygygg	gygygy	2040
gagggat	ttgygt	agtatt	tttygt	ygygtg	2100
attyyg	gtttag	tttygt	tttagy	gtytagg	2160
ttttgt	ttttty	tagaty	tygtgy	tatttt	2220
ygggatt	tagytag	ygygt	gggtty	ygagtt	2280
gygygg	ygtagtt	gtygyg	ttagtag	tyggagy	2340
gtagygt	ggytag	tagatt	atattag	gaagtaa	2400
ggtatay	gtgggg	tttygt	ygggggt	ygtaygg	2460
gyggagt	gtgatyg	ggyggt	ttggag	tgtatta	2520
tttttatt	gtggag	tgggagt	ggaaat	ttagaaa	2580
gggtttg	agygttt	gttggtt	gggatt	ygggaa	2640
gaagtag	ggttgg	tttttt	agggtag	ggttgt	2700
aggaag	gtgggg	ttgagag	tyggtg	gtttgt	2760
agtattg	tggatt	tgtttg	gtgatt	tagttg	2820
atagtgt	atattty	tttatt	gattatt	taggtg	2880
ggaaty	gtaggat	gtgaat	gaggtty	gtttta	2940
ggagtag	ggaatt	gttgtat	gtaaygt	ttgggt	3000
gataga	agagaat	gttatg	yggagt	gtagagt	3060
ygtgg	agttag	agttgt	ggatgat	gtatat	3120
tagagag	gatttt	aagtgg	aattgt	atggtaa	3180
atattt	tttaaag	gaagaaa	aattatt	atagtgt	3240
tttaaag	ygtaa	aagaggt	ttattgt	aatttgg	3300
tttttt	gtaaa	taaatg	atatttt	gtatag	3360

ES 2 638 294 T3

ttttaatggt	agatagaatt	atagttttta	tttggttaat	aggttattaa	gaattatfff	3420
atggattatt	tgttaaagat	atatttgtat	ttttaatagt	taaaaatttg	gtttttattg	3480
gatgaaggta	gtttatagt	gaggagtgag	gagaaggata	atatgttttg	gttttaattt	3540
ggaagtttaa	aagtttttta	atgaatttat	ttttttttta	atagtatttg	attgtttaat	3600
atgaagtttg	attgatgttt	gtttgtgggt	gtagtgtttt	tttggtagta	attataatta	3660
ttattatagt	aaaaataty	tttattgagt	atftattatg	tgtaggagt	aagttttttt	3720
ttttaattat	tgaatgtaa	tagtgtgatt	ttagtatagt	atgtttgaag	attagagttt	3780
aggatttatg	atagtataaa	tttattagtt	gtttatttygt	tatagaggta	tgtggtgaay	3840
gttatatfff	gtttttgtta	agtftttttt	tttttttttt	ttttgtttat	ataaagttag	3900
ttttaggagt	aatttttagg	gatgaaaatg	ttaaaatttg	tgaaaatatt	aagttgggat	3960
attattagta	aagattatft	ttttgtttga	yggttgaaga	tttgaagtag	tagtttaaaa	4020
ttgtgatagt	ttatgaattt	tgtgatattt	tttttggttg	ttttagagaa	attgtgaatt	4080
tttgtttttt	agaatattta	taatttttagt	ttagtatttg	gtaatttttag	ttattttatg	4140
tttgtttagt	agaagaaaga	atattgaatg	aatttatttt	gtatattttt	aatatttttt	4200
ttaagagggt	gttttagagat	taaatagaat	aaaaattgaa	gggataatga	gttttaatta	4260
ttagtagttt	gtataaattt	gtattaattt	tattgttatt	tggtttaagt	attaaaagg	4320
ttgatttggg	taggagttta	atftattttg	ttttattaag	aagattttta	aataagagtt	4380
taatttattt	taatttatta	ttgggaatgt	tggaaatgaa	atftttgggt	tattgattta	4440
atattatfff	gtattgtgtg	gattttagaa	agtatatatt	tgaagtgaaa	tttgagatta	4500
gagttattta	tgtaaatttt	atagaattat	tattatagaa	ttgttttaat	atatttaata	4560
gtattttttt	aggtttgtga	ttyggtgttg	tattgttttt	ttttaatygt	aaagtttata	4620
tgttttgtgt	ttttttgttg	ttgagataat	tttataaaaa	ttttatattt	atftttttgt	4680
agattaagta	tttttttttt	gtygtaagag	tttgagatag	ttgttaggta	ygtgggtggtg	4740
ttttatfttt	ttttaaagta	tatagggtgga	aaaataaaat	ttttattatt	tggttttgtt	4800
tatagtgggtg	gaaggttgta	atagttttta	tttttttttt	ttggttattt	tatattaatt	4860
atgaagtgta	tttttattat	ttatttgggt	tttggtattt	tttagagtg	aaaaatggt	4920
gtttgatfff	tttttttttt	tttttttagta	ataatttatt	ttattaagtt	tttagaatga	4980
tgaggтата	tgatgttaa					5000

<210> 23  
 <211> 5000  
 5 <212> DNA  
 <213> unknown

<220>  
 <223> bisulfite sequencing of PTPRR

<400> 23

ES 2 638 294 T3

aagaaaaata	gattttattgt	aagtgggata	taattatntt	tttttaattt	ttagtnttgt	60
agtatntt	gtaatagatg	ttagatgaga	agagtatntt	ttttaagntt	tatagaatgt	120
taaataaatt	atnttaagg	ttgatttagt	aagaatntt	aagagttaat	tgtagtatt	180
gaatnttgt	aattattatt	tttatttatt	tattnttgag	tattatntt	gtatgaggta	240
ttgnttagg	gagttgggat	atattaataa	agttattaaa	gtntnttaat	attggagntt	300
aaatnttgt	ttgyggggg	gagtagggaa	atagatatta	aataatagat	tttataagta	360
attatnttgg	tttgtagaa	agtgataygg	gaaaagtaa	ttggaggata	gtgaattagg	420
aataggagaa	gaggtttag	tttagagtgg	tttgggatga	aatgatagtg	ttatagaaat	480
ggagtgtgt	ataygtatgg	gggagtagg	ggtggagtay	gtttagtag	aggggttaga	540
tatggagata	tgntnttatt	tttagtagag	aaggtntgt	aagatatta	aagtatntt	600
tattgntt	ttntnttatt	tgntggagt	ttntntggt	ttgntntta	gagttgaaga	660
tgatataaat	tataaaagaa	ataaatggta	tygnttgggt	ttnttgatt	tataagntt	720
tatttaatt	aagntntgg	ggatagntt	ttntntatta	gntgntntta	tttatagagg	780
atggagaaag	aaagtattga	atgagatgtg	tagnttaatt	taatgggtat	ttgtagntt	840
taattatntg	gtaggataa	tttattntaa	gntaatggaa	tataaaatnt	agtagntnt	900
atggagatt	taatgtgtg	tagaataaat	tatagataaa	tgaattgnt	gaaagaataa	960
tatgaggtay	gnttaataa	gtgntgtgga	agagaaagat	tattgtaatt	tagagnttagt	1020
tagagnttag	gntntntgga	aaagtgagat	taatattata	ttntygaaa	ttagtgtggt	1080
ggtggtgtaa	gtggaggaaa	atgggaaaga	gntaatagt	tttataaaga	tatagaggta	1140
gaaagggtag	aggtnttggg	atagntaaa	gagaagntta	gntgagggat	ttnttgatt	1200
gattagtagt	aattagntat	gattaataag	gntntntata	ttntaaagat	ttagatggag	1260
ggataaaaa	ttatttaatg	gtagattgtg	gtagntntnt	tagagatata	gagntggty	1320
ggatgagnt	aggtattgay	gtgatttatt	atntntntt	ttaaagagta	aaagggaaat	1380
taaagntta	tattnttayg	aaataaaaag	gtgntntnt	gtgntntta	tatatggata	1440
tattntnta	gntntaaagt	atntntntat	ttntntntgt	tattgtgagg	atntgagnta	1500
gaagaaagnt	taaataatag	tattgagntg	gaaagagtgg	aaagagaagt	aaagggggg	1560
aagntgtagg	aaggaygaag	ttatntntaa	gatataggt	tattgntnt	attaagntaag	1620

ttgttttggg	aaygtttttt	tygagtagtt	agaatgttta	gtagtggaag	atatttttat	1680
ttttgtaggy	gagttttggg	aagttgggta	atttgtaa	gttaattttt	agtagtgagt	1740
tyggtttayg	tgtaaattaa	gatttgggga	aagagtaggg	tggttggtat	ggttgataat	1800
gttattagtt	tttttttttg	atttttgtgg	tygtgttttt	atttattttt	atthagttat	1860
atttattttt	yggtttgtg	atggaygttg	ggtttttagt	aattatagta	agtgtttttt	1920
tygtattttt	ttttttttta	ttttattttt	tattttta	tattatttta	gygatggagt	1980
ttattttggt	ttaagtygty	gttaagatty	ggagaagygg	aattttat	tgaatttttt	2040
ttgttttytg	agggytgyg	ttgggtatgt	ttagtagtyg	yygygttgtt	gttgggttgt	2100
tggttgggyg	yggttttat	ttgttygttt	tygttttggg	ttttgggygt	ttagaaggtt	2160
aggattttgt	ygtttttgag	ygtttttggg	ttttttatty	gtaatttttt	attgtttttt	2220
tttttttttt	tttttaggga	ggttgaagtt	ggtgttgggt	tttgytgyg	ttatagattg	2280
attgttttgt	aaattttagt	ygaggatttg	aatttyggag	attagaagat	ttttggyggt	2340
ggtttttttt	aatagatatt	tatttgaagt	ggggytgg	tggagttttt	ttttattttt	2400
ttaatgtaa	tattatgygg	agagtagttt	gttttttgy	gttgtgtttg	tttttaatt	2460
tttaygttgt	aggtaagggg	ttgttaggtt	tagagtygga	gttgtgtatg	agatgggaaa	2520
ttgtatatgt	ttaaggattt	taggaaaagt	ttgttttgyg	aagaaagttt	tttaaaaag	2580
gtaaaatagg	atagatattg	ataggggaag	ggtgaggag	tygtgtat	gttggaaaat	2640
tgaggytgaa	aatttaattt	aaaattagtt	tttgattttt	ttttatttta	taygaaaata	2700
gtgaatattt	ttaatatgaa	tataggtttg	tttttttttt	ygtttttttt	tygttttagat	2760
tttttgtttt	tgttttttagg	ttatgtat	aattgtta	tttttaggag	agggataaga	2820
tattttgtta	gatgtaattt	ttttattgt	agygttatt	atatttata	ggttttttgg	2880
tttagygagy	gtttatagga	aggatttggg	tgtaatttga	tggattatat	tttygtttaa	2940
aagatygaaa	tatatggttt	atattagtta	gtttgtatta	ggtttttttg	gtttttgttt	3000
ttgttattyg	aattttttta	gttaataaga	ggaagaaaag	gtttttaata	gaattttttt	3060
gtttttttta	gtatygtggt	tagygttygt	tggtatatta	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3120
aaaaaaaa	ataattatag	ttttaagtt	gataattttg	ggttaggtat	tgttttygg	3180
atagatttga	taaggtgtaa	ttaagagtaa	tagtgagatt	gtttttaa	ataaatagat	3240
ttgaggtatt	agaattaata	ttaagtttyg	tgaggaagta	aattttggga	agtatttgag	3300
agatattata	tgtggtggtt	ttgttttttg	tatatatagt	atttttat	aatgtagata	3360
gatttgttag	gttgaatttt	ttattattgt	tatatatata	tgaattaaaa	taaaatattg	3420
tagggagatt	ttagaaaatt	tattgtgata	gtagttggtt	atgtagtagt	tttgaataa	3480
ttagagayga	ggtatttttt	ttgagtggt	ttttatttta	attatatata	tttatttatt	3540
tttttaagta	atatttgttg	agtgtatatt	atgttttagg	ggtaatgagt	aaaaataatt	3600
gttttgaaat	tataattttt	gtagtatttt	ttttaaaaga	gtgggtgaat	tttatttttt	3660
gtgtataata	gtaggagtga	aatatggtat	ttttttat	tagttaaygt	tattatttaa	3720
atgtattatg	aattttttga	gtaaatatg	tataggatta	ttaaagttat	tattaaatat	3780
atatgttaat	tgttataatt	atgatgttat	attgtggagt	ttttaatagt	ttttgggtat	3840
attttgagaa	gtagaaaata	gttatgattt	gattattaaa	ttattttaa	atagttgtag	3900
tgaattattt	ygttattata	tataattttt	taatgtttaa	atgtgggatg	aaaatatata	3960
tattgggttg	agttttattt	atagatttgt	ttaataatag	attgatata	atatttatta	4020
tagaaaaatt	ttaattttta	ttaaggtagt	aatgatttag	ttgggttgtt	aataatatta	4080
gtgtagttat	ttttttaaaa	ttaatata	aaaaagtta	aagattatat	ttgatata	4140
ttgagtaatt	atatttttaa	agttataaat	aaattgaagt	atgtgaaaa	tatgttttga	4200
tttattgtag	atgaatatty	gggatgagaa	aatgaggat	ttttgtttat	tagatgagaa	4260
attagaagt	ttgtagtttt	agattttatt	tggagttttg	ttaaagggtta	tattattaaa	4320
gttaatttaa	tttattttta	ttttaatttt	ttaatttga	aaataaagat	aaaaagtaag	4380
attaattaat	taattttta	ttaataagaa	aatgtattta	aggatatttt	tatattttta	4440
ttgtaagata	ttatttattg	tatttatatt	taatataagta	aaatatattg	gtgttttatt	4500
atagtagatt	gtaagtttta	tattatagtt	ttttgttaa	ttttatttta	aatgtatttt	4560
aattttaaat	agtaatttgt	gggttataag	ttgttattag	attaaaattt	attatagtta	4620
tttaataata	ttgttagggg	ttttatttag	aattaaaata	aatatagttt	tttggtttaa	4680
gtttttatat	atttggagat	taagaaaata	agtggatggg	atgataaaga	ttaagaaatt	4740
aagatattaa	tttttatttg	ttgaaggtgt	gagtttgtta	tttttatgga	agattttttt	4800
tttagaatag	aggttgattt	tataaagaag	ggaaatgaat	tttatatatt	taggtttttt	4860
taattgtaa	gttaattgat	ttattttggt	taygtttagg	gtattagtaa	ttgttttatg	4920
ttggtggaat	tgatgatatt	ttataatggt	ttagagatgg	gaggaatgtg	ttaaygggat	4980
gtaagtgttt	tttttagtta					5000

<210> 24  
 <211> 5000

<212> DNA  
<213> unknown

<220>  
<223> bisulfite sequencing of ZNF582

<400> 24

gaygattttg	aatgattttt	gttttttagt	atztatattt	ttgtgtagtt	tttatttatt	60
tagatttata	gttgattttg	tgattaagag	tataatgggtg	tatgatttta	gaggtttgg	120
ttagagttag	aagtggttat	tttattattt	tttaaatttt	tttttggtag	attaatgaat	180
gtgagaaagt	aaaaatggta	tagaagaaag	ttagtttgag	agatggttgg	ttttgtattt	240
gtttgggttt	tttttttttt	tttttttata	agtaaatatt	gaygtatgta	tatatagata	300
tatttaatat	agtgggatgt	taaagggaaa	ttagagttat	tygttttttt	ttaagattag	360
agaatatagg	aaagatgatg	attttttgta	tttatttttt	ttttttgaat	tygtaatatt	420
gttttgaatt	ataaataagg	ttaagtagga	taaatttata	attgtttttt	taattgttyg	480
tttataaagt	tgaattttaa	ttatttttgt	tgaagttggt	ttttaatatt	agtaattagt	540
aataattaat	ttttgagttt	tgtttatatt	attaaattat	tttatttgat	ttttaggata	600
aagttgtaag	tttagtatta	tatttttttt	tttatggata	aaaaaaaaa	aataaaataa	660
aatygagata	ggtaygaaga	aattaataaa	tggttgaaat	gttatttgaa	tttatatttg	720
tttaatttta	aaagtgtggt	ttttattata	ttatygtatt	tataaggaaa	atgtagtttt	780
tatttttttt	tgaagaatgt	gtaaagaggt	aatatgggtg	gttttggaat	aagtattttt	840
gtagaaagaa	agtattagtt	ttagttatat	tagtattttt	atttagtagt	agtagtatta	900
ttttatataat	tagttatttt	tttttaataa	tttaatgaat	tagatgttat	aattattttt	960
attttttaaat	gtggagatyg	aggtatattt	ttaaagtgg	agtttaggta	ttttggtttt	1020
agtttagag	atgggttaagg	gtttatattt	ttaatattt	attatattat	agagtttatt	1080
aggtttgagg	gaaataggat	taaattaaaa	gagttattta	ggattttagt	ttttatttaa	1140
ggataaattg	ttttatttyg	gatagggaga	gttttygtat	tttgagattt	agtataatag	1200
gttttgatyg	gtatttggtt	tttyggatttt	taattatatt	ggattatatt	ggttygggat	1260
gtgtaaagtt	taggggtttt	tatatattgat	gatattaaag	tygtttaaaa	ataagagaga	1320
attaataaatt	atttayggyg	gtttgatatt	tgtttaagag	atgygtttt	ataaaatttt	1380
tttatatttt	tataaygttt	ttattttgyg	ttttttttta	taatttataat	ttaatttatt	1440
atagatgtaa	tgtttaaaat	tagttatttag	ataaattttt	aygtttttta	attttaaggt	1500
tttttygaaa	tttttggtt	aaattgttgt	tttayggaaa	tgggaaygta	ayggatgagg	1560
taatttttta	tagtygtata	tagttgtgta	ttatygtta	aayggtttta	gttatatatt	1620
taaygattta	ygyggagtta	gaagttatta	ttatatattg	ttaaaattay	gtatatatag	1680
tgayggtttt	ttgtttatty	ggttatttygt	ttataatttt	tygttagaga	attataygta	1740
gatagtatat	ttagtattat	agatttttagg	aagtaattta	gggattygaa	tataygaata	1800
gtattttttty	gygtattgyg	taggtayggt	tyggttyggt	ttattttgaa	atatygygag	1860
attygggttt	aaggtygggt	tgttgttttt	aygtttaaag	attatgtttt	tyggaagata	1920
ttgyggygty	ggttttatta	tgyygtagta	tyggtgtggt	ttgtgygttt	gygttatttt	1980
tyggttgygt	ayggygaatt	tatyggaty	gtggtggaag	ygygttttg	gttgytyggg	2040
gygyggytyg	ggtggtattt	ggattygagg	aggyggtagg	tgagaggttt	yggagttttt	2100
taggygtttt	ggggtttagt	aggagttggt	gttyggtyg	gttgggtttt	aggtttgaga	2160
agaaygtaga	ygttttygtt	tatygtyggt	ttgtggtttt	atygygtga	gattatattt	2220
tttygtyggt	tttyggyggt	gygttttttt	gygttttttt	ttgtttttta	gttttatagt	2280
ttaggtgtat	ggattttttt	ggtgggtgyg	taggggtttt	ygattttttg	aaattgygga	2340
tgttttgtat	ttattgttat	gygtgttttt	tttttttttt	aatttgagag	gaaattttgt	2400
tttatgaggt	tttttagagag	ttataagatt	ttagaagatt	tagaatygtt	agtttagaaa	2460
aatttatatt	tgggaatatt	ttatatgttt	aaattttatg	tttagtaatg	gggaaatatt	2520
tgagtggatt	ataggttatt	ttttgtaaat	aggatatygt	gtagttaata	taaataatgt	2580
ttataaaaagt	ggttataata	aggaaaagtt	gtttattata	ttatattaag	taatatttat	2640
aattatttta	tttatayggt	atttagaatt	aatgtttgt	aatgtagtag	gtattttata	2700
tattttttta	tagagtattt	tttgtttaat	agtgagttta	agaattggtt	aaatgtaaat	2760
attgygaata	tttgggtggt	ttttttttta	atttttttgt	ttgtttttgt	tttttagttg	2820
tgtgttagtg	agtttgattt	ttttttgttg	aatgtttttt	aaggatttag	tagttaatat	2880
ttttgtttgt	tagttttttga	tagttattttt	tgatagttat	ttggtatttt	attatatggt	2940
tgtgttaaaa	atgatttaat	tttttggtta	tttgtggatt	tgtttattta	ygtattaatt	3000
tttagttttt	ttatttagta	aatattattg	gatatgtagt	ttgtgtatt	gttgtgtttt	3060
tatggaagga	tatatattatg	tgttgataat	ggagtattgg	gygtgttggt	tgtaatttgt	3120
tttttattgt	tttttttaat	tttattttat	ttgttgatgt	aaggtatggt	ttatgaagtg	3180
gtatgtataa	agtttttagtt	tgggttgtag	agttttttgt	atatttgggy	gttgggaaa	3240
gagttaggta	gattttttaa	ggtgttatat	ttgttgtagg	agagagttaa	atggtttagt	3300
tttggaaaagg	ttttatttta	ggttgggggt	atgtaaatga	tgtaggtttt	ttatgttttt	3360
tggtttgagg	gaagtttttt	ttgtttttga	ggtaaatatgt	gggttttagt	tattagaata	3420
gttttttagta	tttttgtttt	agatttgat	ttgtagtaaa	atagaattat	tggatgttta	3480
ggggaaatgg	gagggaaagg	attattgggt	tttttttgtt	ttgtagtagt	taaagttggt	3540
tttttgggg	tgggtgagga	tttttttgtt	tttttttttt	ttttattttt	ttggtgggta	3600
gagggtaagt	aggtggggat	ttgtaatttg	gtatttttagg	aattgtgagg	taagtttagt	3660
tttttatggt	tgtttttttt	tttttttagtt	ttatygtygt	aggattttgt	ttttttttaa	3720
gagaggaatt	agaaggagga	tttatttagtt	tttgaaattt	taaaagttat	gttttttgtg	3780

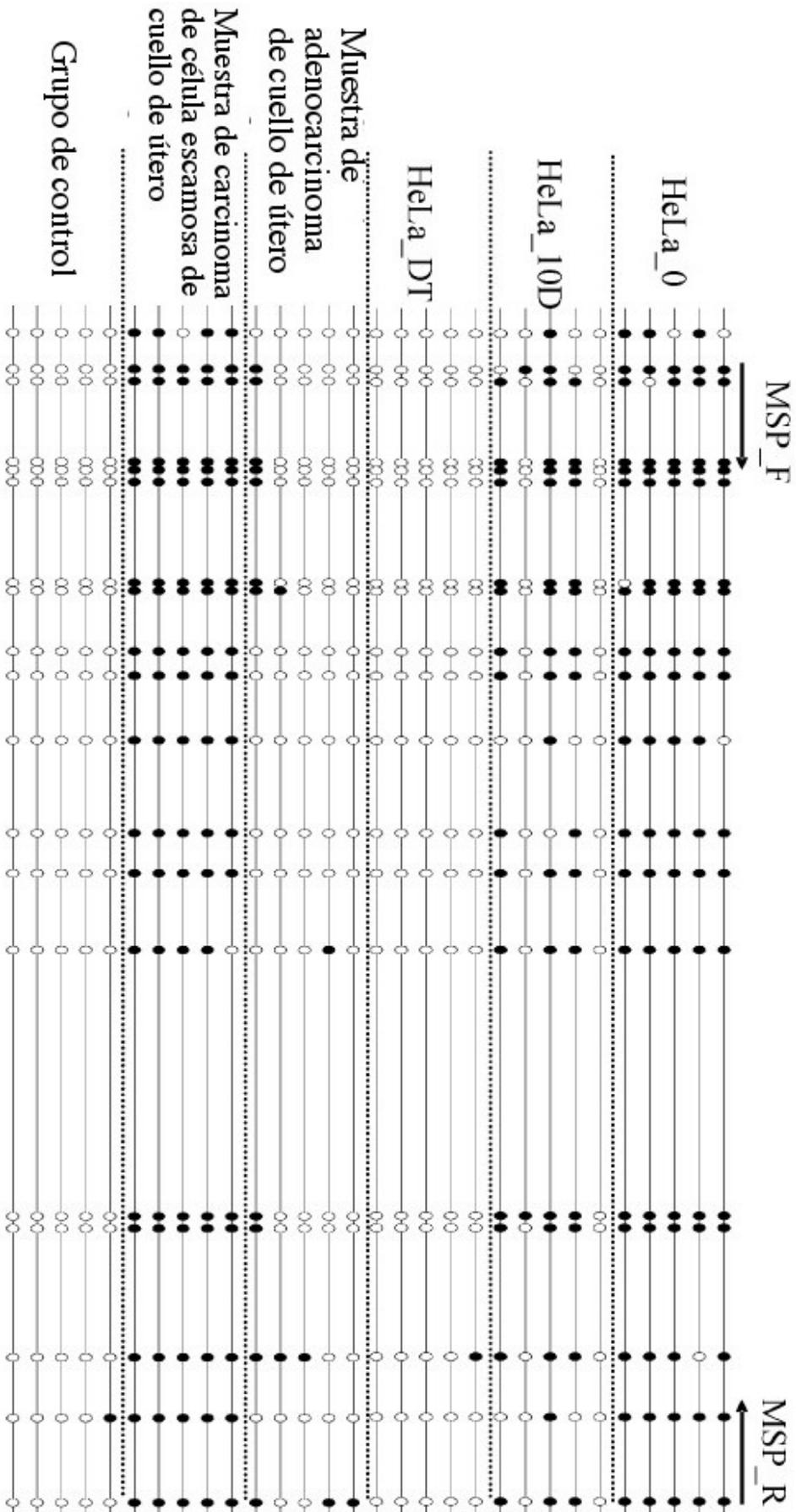
ES 2 638 294 T3

agtttttaaa	ttttataaat	atgtgttttt	tttattttga	aattttttat	ttgggtttta	3840
tttagaaatt	tggttttttag	atgtttttat	tttaggggaat	aaaaggatta	ggtaggagtt	3900
ttttttttta	ttgttttttt	ttttttgata	aatgtttata	gattttatttt	ttatagtatt	3960
ttgtattttt	tgatggtttt	ygtttgttag	gaggagaaat	ttattttttt	gtatgaaatg	4020
agagtatttt	ttgtaagaat	tgaagtttga	agagatggaa	tgaatgttta	ggagttaatta	4080
tatatagaaa	agtaggggag	gtgggtgttg	ttgggttttag	ttttagygtta	tggtatagtg	4140
ttttgttttg	ggaatgatta	atgattggat	atgtaattga	ggtttgggtt	ggaatttatt	4200
aaaaatttga	tgttagaatt	aaagtttagt	ttgaygttgg	atagagtatt	tgaatttggg	4260
atatttttta	ttagtttttt	tagtttaaga	ggaagaaaag	tatagagtgt	aggatgggtga	4320
gygatgtagt	aagtgagatg	attatttagg	tgggtgagtg	gttagggttt	ggaaaagttt	4380
tagagatttg	athtaattty	gggatttaaa	ataagaggat	gtttgagtta	gttgttttat	4440
ttgatagaaa	attgtgtatt	taataaaaag	tatttttatg	gtttttttta	tgaagaaaaa	4500
tgtttgtggt	atgttttaat	ataatgatga	atttttattt	ttaagaaatt	tttgatttat	4560
atgaaaattt	tgtatttaag	atagaaaata	tgtttttata	attttaaaaa	ataaaatatt	4620
tggggaaaat	ttattagaaa	tattttttgt	tgttattggt	attttaaaaag	atagaagtga	4680
taggttttat	tttgagaatt	tattgtatgt	taagtataga	gtgggtagtg	tgttttatta	4740
tattgttttt	taataataag	gaaaatttta	tttagtttga	ttttaatttt	tatttttagat	4800
ttgtatatag	agtattgatt	tgtagttaaa	aggaatgttt	gagaataatt	tgattatttt	4860
gttttattta	tttttatttt	ttttgttatt	ttttatattt	agttttattt	tttttgttta	4920
ataaaaataat	ttttttttty	gtaaagattt	gttttatttt	tttttatttt	attgtgaatt	4980
attgaaatat	atatatatta					5000

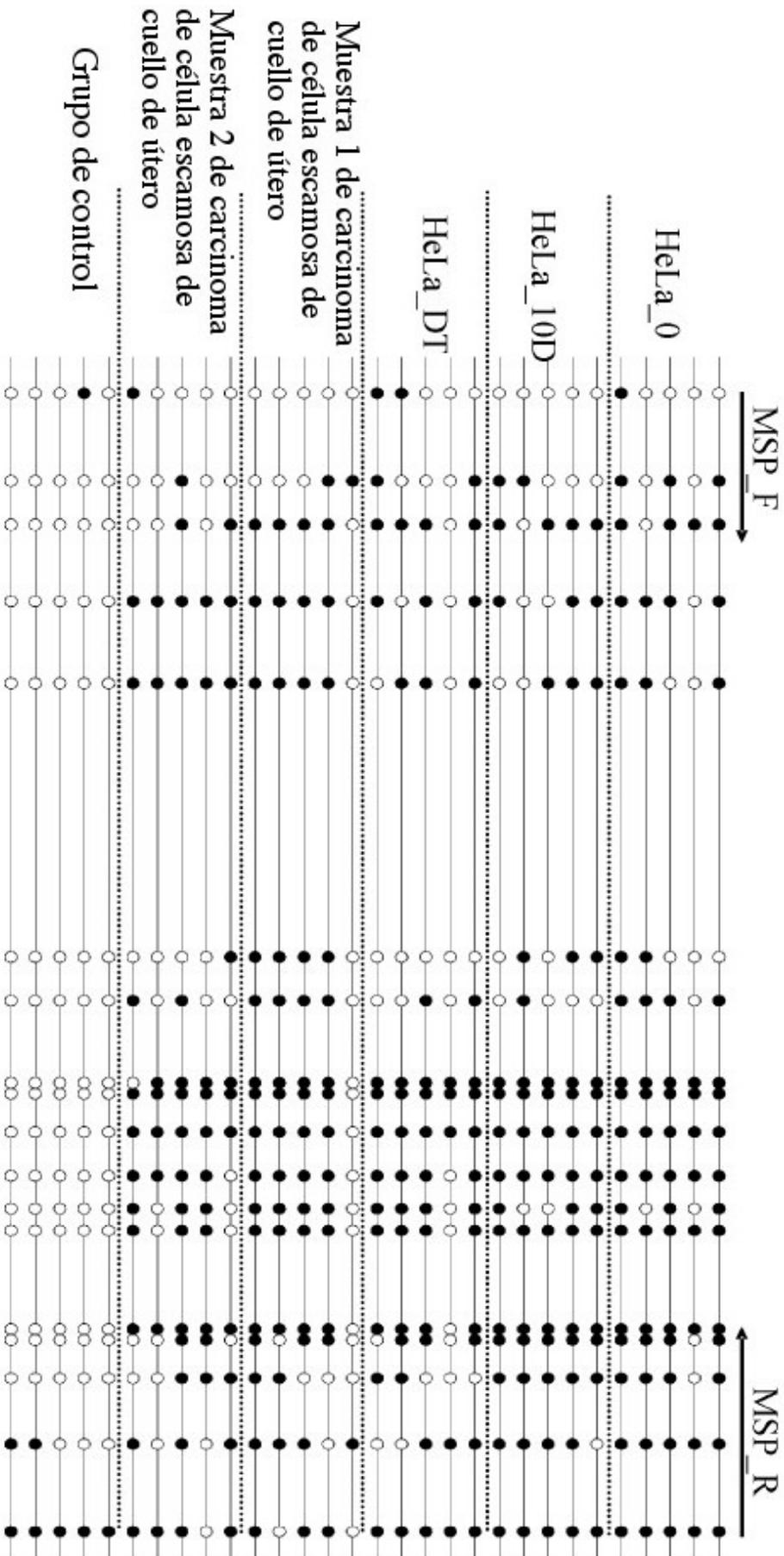
**REIVINDICACIONES**

1. Método de detección de cáncer, basado en detectar el índice de metilación de un gen objetivo en una muestra de prueba, y utilizar el índice de metilación como el índice de detección para determinar el riesgo de tener cáncer, y dicho método comprende los pasos siguientes:
  - 5            paso 1: proporcionar una muestra de prueba aislada;
  - paso 2: detectar el índice de metilación de la secuencia CpG en al menos un gen objetivo de dicha muestra de prueba, donde el gen objetivo comprende al menos uno del grupo que consiste en DBC1, PTPRR y ZNF582 y
  - 10            paso 3: determinar si hay cáncer o no en la muestra basándose en el índice de metilación en el gen objetivo,

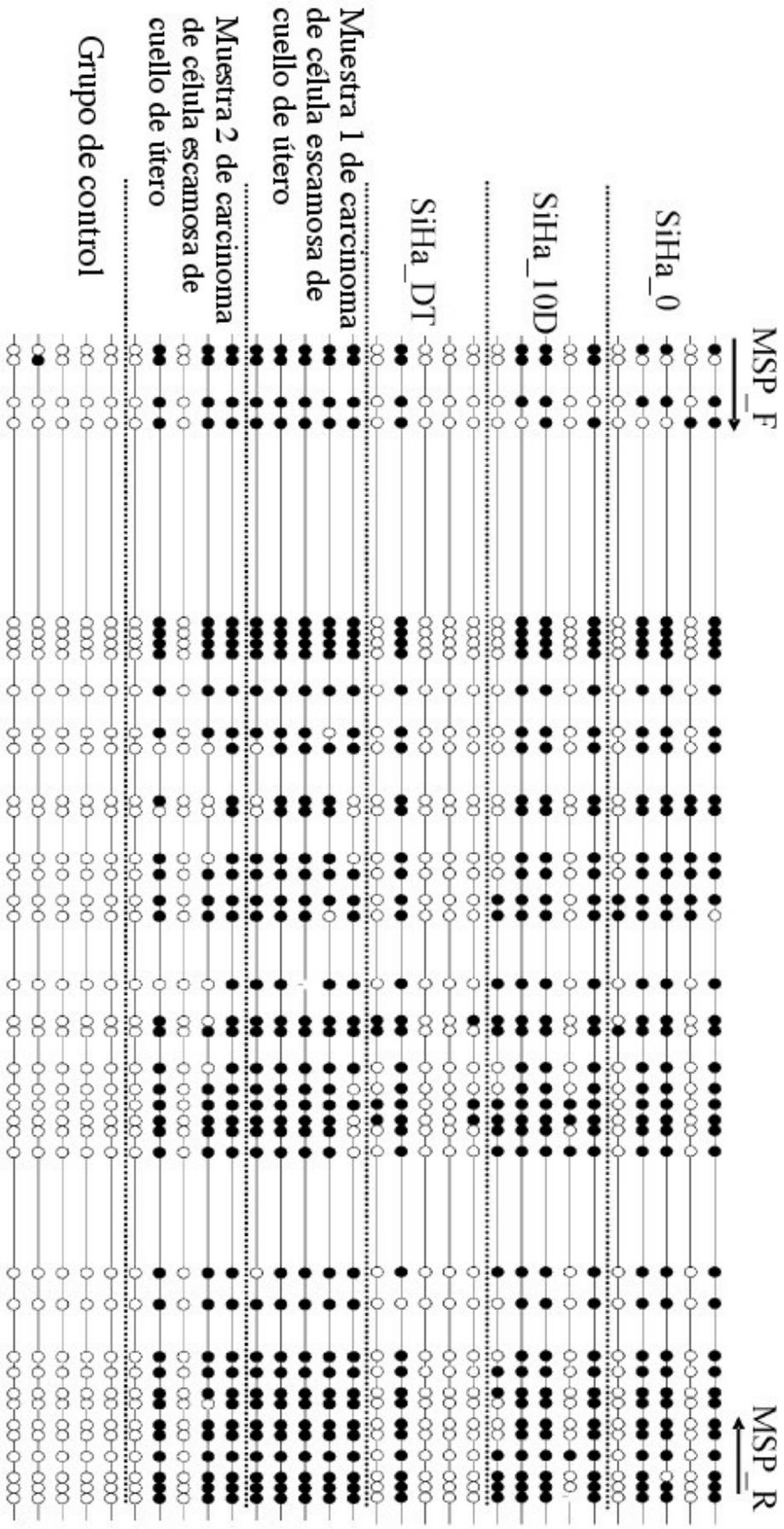
donde el cáncer es seleccionado del grupo consistente en cáncer de cuello de útero, cáncer de colon y cáncer de ovario.
- 15            2. Método de detección de cáncer como se explica en la reivindicación 1, donde la muestra de prueba es una muestra aislada seleccionada del grupo que consiste en muestras de lesión cervical completa, incluidos el carcinoma de célula escamosa y el adenocarcinoma.
- 20            3. Método de detección de cáncer como se explica en la reivindicación 1, donde el método de análisis para el estado de metilación de la secuencia CpG del gen objetivo comprende la reacción en cadena de polimerasa específica de metilación (MSP), la reacción en cadena de polimerasa específica de metilación cuantitativa (QMSP), la secuenciación por bisulfito (BS), las micromatrices, la espectrometría de masas, la cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (DHPLC) y la pirosecuenciación.
- 25            4. Método de detección de cáncer como se explica en la reivindicación 1, donde el gen objetivo DBC1 tiene la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID N.º 1, el gen objetivo PTPRR tiene la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID N.º 3, y el gen objetivo ZNF582 tiene la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID N.º 4.
5. Método de detección de cáncer como se explica en la reivindicación 4, donde la secuenciación por bisulfito metilada del gen objetivo DBC1 se reconoce mediante cebadores como se representa en SEQ ID N.º 13, 14, el gen objetivo PTPRR tiene la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID N.º 17, 18, y el gen objetivo ZNF582 tiene la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID N.º 19, 20.
- 30            6. Método de detección de cáncer como se explica en la reivindicación 1, donde el gen objetivo DBC1 se reconoce mediante cebadores como se representa en SEQ ID N.º 5, 6, el gen objetivo PTPRR tiene la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID N.º 9, 10, y el gen objetivo ZNF582 tiene la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID N.º 11, 12.
- 35            7. Método de detección de cáncer como se explica en la reivindicación 1, donde en el caso de cáncer de cuello de útero la muestra de prueba es la muestra de célula de cuello de útero positiva en VPH (virus del papiloma humano).
8. Método de detección de cáncer como se explica en la reivindicación 1, donde en el caso de cáncer de ovario la muestra de prueba es tejido canceroso de ovario.



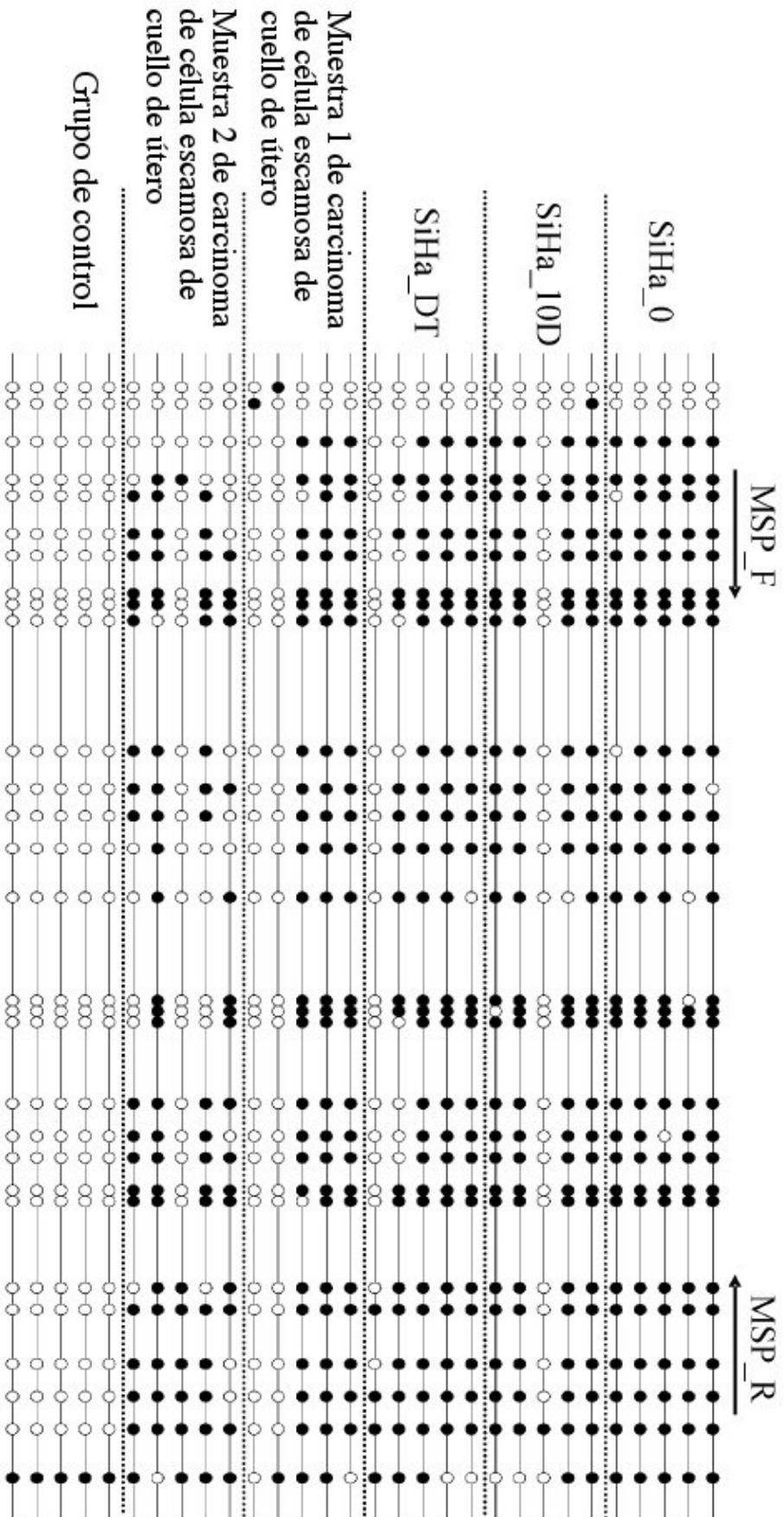
**FIG.1A**



**FIG.1B**



**FIG.1C**



**FIG.1D**