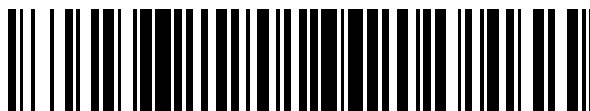


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 892**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2004** **E 15190640 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019** **EP 3059322**

54 Título: **Marcadores de expresión génica para pronosis del cáncer de mama**

30 Prioridad:

15.01.2003 US 440861 P

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

30.09.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SHAK, STEVEN;
BAKER, JOFFRE B.;
CRONIN, MAUREEN T. y
COBLEIGH, MELODY A.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 725 892 T3

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

DESCRIPCIÓN

Marcadores de expresión génica para prognosis del cáncer de mama

Antecedentes de la Invención

Campo de la Invención

- 5 La presente invención proporciona genes y series de genes cuya expresión es importante en la diagnosis y/o prognosis del cáncer de mama.

Descripción de la Técnica Afín

- 10 Los oncólogos tienen diversas opciones de tratamiento disponibles, con inclusión de diferentes combinaciones de fármacos quimioterapéuticos que están caracterizados como "patrón de atención", y cierto número de fármacos que no llevan una reivindicación indicadora de un cáncer particular, pero para los cuales se dispone de pruebas de eficacia contra dicho cáncer. La probabilidad óptima de resultados satisfactorios del tratamiento requiere que se asignen los pacientes al tratamiento óptimo disponible para el cáncer, y que esta asignación se haga lo más pronto posible después de la diagnosis.

- 15 En la actualidad, los tests de diagnóstico utilizados en la práctica clínica son de analito simple, y por tanto no capturan el valor potencial del conocimiento de relaciones entre docenas de marcadores diferentes. Además, los tests de diagnóstico frecuentemente no son cuantitativos, basándose en inmunohistoquímica. Este método proporciona a menudo resultados diferentes en laboratorios diferentes, debido en parte a que los reactivos no están normalizados, y en parte debido a que las interpretaciones son subjetivas y no pueden cuantificarse fácilmente. Tests basados en RNA no han sido utilizados con frecuencia debido al problema de la degradación del RNA a lo largo del tiempo y al
- 20 hecho de que es difícil obtener muestras de tejido recientes de los pacientes para el análisis. El tejido fijado incrustado en parafina está disponible más fácilmente y se han establecido métodos para detectar RNA en tejido fijado. Sin embargo, estos métodos no permiten típicamente el estudio de grandes números de genes (DNA o RNA) a partir de pequeñas cantidades de material. Por ello, tradicionalmente el tejido fijado ha sido utilizado raras veces para usos distintos de la detección inmunohistoquímica de proteínas.

- 25 Recientemente, varios grupos han publicado estudios concernientes a la clasificación de diversos tipos de cáncer por análisis de la expresión génica en microrredes (véase, v.g. Golub *et al.*, *Science* 286:531-537 (1999); Bhattacharjee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13790-13795 (2001); Chen-Hsiang *et al.*, *Bioinformatics* 17 (Suppl. 1):S316-S322 (2001); Ramaswamy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:15149-15154 (2001)). Ciertas clasificaciones de cánceres de mama humanos basadas en patrones de expresión génica han sido también publicadas (Martin *et al.*, *Cancer Res.* 60:2232-2238 (2000); West *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11462-11467 (2001); Sorlie *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10869-10874 (2001); Yan *et al.*, *Cancer Res.* 61:8375-8380 (2001)). Sin embargo, estos estudios están enfocados en la mayoría de los casos en la mejora y el refinamiento de la clasificación ya establecida de diversos tipos de cáncer, con inclusión de cáncer de mama, y generalmente no proporcionan ideas nuevas acerca de las relaciones de los genes expresados diferencialmente, y no relacionan los descubrimientos con estrategias de
- 35 tratamiento a fin de mejorar el resultado clínico de la terapia del cáncer.

- Aunque la biología y la bioquímica moleculares modernas han descubierto centenares de genes cuyas actividades influyen en el comportamiento de las células tumorales, el estado de su diferenciación, y su sensibilidad o resistencia a ciertos fármacos terapéuticos, con unas pocas excepciones, el estado de estos genes no ha sido aprovechado para el propósito de tomar rutinariamente decisiones clínicas acerca de los tratamientos con fármacos. Una excepción
- 40 notable es el uso de la expresión de la proteína receptora de estrógenos (ER) en carcinomas de mama para seleccionar pacientes para el tratamiento con fármacos anti-estrógenos, tales como tamoxifeno. Otro ejemplo excepcional es el uso de la expresión de la proteína ErbB2 (Her2) en carcinomas de mama para seleccionar pacientes con el fármaco antagonista de Her2 Herceptina® (Genentech, Inc., South San Francisco, CA).

- A pesar de los avances recientes, el problema del tratamiento del cáncer sigue siendo el direccionamiento de los regímenes específicos de tratamiento a tipos de tumor patológicamente distintos, y la personalización final del tratamiento del tumor a fin de maximizar el resultado. Por tanto, existe necesidad de tests que proporcionen simultáneamente información predictiva acerca de las respuestas del paciente a la diversidad de opciones de tratamiento. Esto es particularmente cierto para el cáncer de mama, cuya biología se conoce escasamente. Está claro que la clasificación del cáncer de mama en un pequeño número de subgrupos, tales como el subgrupo ErbB2⁺, y subgrupos caracterizados por expresión génica baja a inexistente del receptor de estrógenos (ER) y un pequeño número de factores de transcripción adicionales (Perou *et al.*, *Nature*, 406:747-752 (2000)) no refleja la heterogeneidad celular y molecular del cáncer de mama, y no permite el diseño de estrategias de tratamiento que maximicen la respuesta del paciente.

- WO 02/10436 A2 divulga series de genes particulares que se expresan diferencialmente en tumores caracterizados como tumores de elevado índice de actividad mitótica (MAI) o tumores de bajo MAI, donde las series de genes se pueden utilizar para discriminar entre tumores de alto y bajo MAI, así como en ensayos de diagnóstico para la clasificación de tumores, la predicción del resultado del tumor, la selección y el control de regímenes de tratamiento y el control de la progresión/regresión del tumor.
- 55

Masao Hori et al., «Overexpression of MDM2 oncoprotein correlates with possession of estrogen receptor alpha and lack of MDM2 mRNA splice variants in human breast cancer», Breast Cancer Research and Treatment., vol. 71, n.º 1, enero de 2002, páginas 77-84, divulga niveles de proteína MDM2, detectados por inmunohistoquímica, como marcador importante en la prognosis de pacientes con cáncer de mama.

5 Sumario de la Invención

La invención se define por las reivindicaciones.

La presente divulgación proporciona una serie de genes, cuya expresión tiene valor pronóstico, específicamente con respecto a la supervivencia sin enfermedad.

10 La presente descripción acomoda el uso de material de biopsia archivado incrustado en parafina para ensayo de todos los marcadores de la serie, y por consiguiente es compatible con los tipos de materiales de biopsia de mayor disponibilidad. La misma es compatible también con varios métodos diferentes de recogida de tejido tumoral, por ejemplo, por biopsia de núcleo o aspiración con aguja fina. Adicionalmente, para cada miembro de la serie de genes, la invención especifica secuencias de oligonucleótidos que pueden utilizarse en el test.

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para predecir la probabilidad de supervivencia a largo plazo de un paciente de cáncer de mama sin recurrencia del cáncer de mama, que comprende:

determinar el nivel de expresión de un transcrito de mRNA de MDM2, en una muestra de tejido de cáncer de mama obtenida del paciente, normalizada con respecto al nivel de expresión de una serie de referencia de transcritos de mRNA en la muestra de tejido de cáncer de mama;

20 donde la expresión aumentada de mRNA de MDM2 indica una probabilidad aumentada de supervivencia sin recurrencia del cáncer de mama.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para predecir la probabilidad de supervivencia a largo plazo de un paciente de cáncer de mama sin recurrencia del cáncer de mama, que consiste en determinar el nivel de expresión de uno o más transcritos de RNA de prognosis o sus productos de expresión en una muestra de tejido de cáncer de mama obtenida del paciente, normalizado con respecto al nivel de expresión de todos los transcritos de RNA o sus productos en la muestra de cáncer de mama, o de una serie de referencia de transcritos de RNA o sus productos de expresión, donde el transcrito de RNA de prognosis es el transcrito de uno o más genes seleccionados del grupo compuesto por: TP53BP2, GRB7, PR, CD68, Bcl2, KRT14, IRS1, CTSL, EstR1, Chk1, IGFBP2, BAG1, CEGP1, STK15, GSTM1, FHIT, RIZ1, AIB1, SURV, BBC3, IGF1R, p27, GATA3, ZNF217, EGFR, CD9, MYBL2, HIF1a, pS2, ErbB3, TOP2B, MDM2, RAD51C, KRT19, TS, Her2, KLK10, (β-Catenina, γ-Catenina, MCM2, PI3KC2A, IGF1, TBP, CCNB1, FBX05, y DR5, donde la expresión de uno o más de GRB7, CD68, CTSL, Chk1, AIB1, CCNB1, MCM2, FBX05, Her2, STK15, SURV, EGFR, MYBL2, HIF1α, y TS indica una probabilidad reducida de supervivencia a largo plazo sin recurrencia del cáncer de mama, y la expresión de uno o más de TP53BP2, PR, Bcl2, KRT14, EstR1, IGFBP2, BAG1, CEGP1, KLK10, β-Catenina, γ-Catenina, DR5, PI3KCA2, RAD51C, GSTM1, FHIT, RIZ1, BBC3, TBP, p27, IRS1, IGF1R, GATA3, ZNF217, CD9, pS2, ErbB3, TOP2B, MDM2, IGF1, y KRT19 indica una probabilidad aumentada de supervivencia a largo plazo sin recurrencia del cáncer de mama.

En una realización particular, se determinan los niveles de expresión de al menos dos, o al menos cinco, o al menos 10, o al menos 15 de los transcritos de RNA de prognosis o sus productos de expresión. En otra realización, el método comprende la determinación de los niveles de expresión de todos los transcritos de RNA de prognosis o sus productos de expresión.

40 En otra realización particular, el cáncer de mama es un carcinoma de mama invasivo.

En otra realización más, el RNA se aísla de una muestra de tejido de cáncer de mama del paciente fijada, incrustada en cera. El aislamiento se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo tejido de biopsia de núcleo o células aspiradas con aguja fina.

45 En otro aspecto, la divulgación se refiere a una microrred que comprende polinucleótidos que se hibridan con dos o más de los genes siguientes: α-Catenina, AIB1, AKT1, AKT2, β-actina, BAG1, BBC3, Bcl2, CCNB1, CCND1, CD68, CD9, CDH1, CEGP1, Chk1, CIAP1, cMct.2, Contig 27882, CTSL, DR5, EGFR, EIF4E, EPHX1, ErbB3, EstR1, FBX05, FHIT1, FRP1, GAPDH, GATA3, G-Catenina, GRB7, GR01, GSTM1, GUS, HER2, HIF1A, HNF3A, IGF1R, IGFBP2, KLK10, KRT14, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5, Maspina, MCM2, MCM3, MDM2, MMP9, MTA1, MYBL2, P14ARF, p27, P53, PBK2A, PR, PRAME, pS2, RAD51C, 3RB1, RIZ1, STK15, STMY3, SURV, TGFA, TOP2B, TP53BP2, TRAIL, TS, upa, VDR, VEGF, y ZNF217.

50 En realizaciones particulares, la microrred comprende polinucleótidos que se hibridan con al menos 3, o al menos 5, o al menos 10, o al menos 15, o al menos 20, o todos los genes anteriormente enumerados.

En otra realización específica, la microrred comprende polinucleótidos que se hibridan con los genes siguientes: TP53BP2, GRB7, PR, CD68, Bcl2, KRT14, IRS1, CTSL, EstR1, Chk1, IGFBP2, BAG1, CEGP1, STK15, GSTM1, FHIT, RIZ1, AIB1, SURV, BBC3, IGF1R, p27, GATA3, ZNF217, EGFR, CD9, MYBL2, HIF1a, pS2, RIZ1, ErbB3, TOP2B, MDM2, RAD51C, KRT19, TS, Her2, KLK10, β-Catenina, γ-Catenina, MCM2, PI3KC2A, IGF 1, TBP, CCNB1, FBX05 y DR5.

Los polinucleótidos pueden ser cDNAs, u oligonucleótidos, y la superficie sólida en la que se despliegan puede ser, por ejemplo, vidrio.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para predecir la probabilidad de supervivencia a largo plazo de un paciente al que se le ha diagnosticado un cáncer de mama invasivo, sin recurrencia del cáncer de mama, que comprende los pasos siguientes:

(1) determinar los niveles de expresión de transcritos de RNA o los productos de expresión de genes o una serie de genes seleccionados del grupo compuesto por:

- (a) TP53BP2, Bcl2, BAD, EPHX1, PDGFR β , DIABLO, XIAP, YB1, CA9, y KRT8;
- (b) GRB7, CD68, TOP2A, Bcl2, DIABLO, CD3, ID1, PPM1D, MCM6, y WISP1;
- (c) PR, TP53BP2, FRAME, DIABLO, CTSL, IGFBP2, TIMP1, CA9, MMP9, y COX2;
- (d) CD68, GRB7, TOP2A, Bcl2, DIABLO, CD3, ID1, PPM1D, MCM6, y WISP1;
- (e) Bcl2, TP53BP2, BAD, EPHX1, PDGFR β , DIABLO, XIAP, YB1, CA9, y KRT8;
- (f) KRT14, KRT5, PRAME, TP53BP2, GUS1, AIB1, MCM3, CCNE1, MCM6, e ID1;
- (g) PRAME, TP53BP2, EstR1, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, BBC3, y VEGFB;
- (h) CTSL2, GRB7, TOP2A, CCNB1, Bcl2, DIABLO, PRAME, EMS1, CA9, y EpCAM;
- (i) EstR1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, BBC3, y VEGFB;
- (k) Chk1, PRAME, TP53BP2, GRB7, CA9, CTSL, CCNB1, TOP2A, tamaño del tumor e IGFBP2;
- (l) IGFBP2, GRB7, FRAME, DIABLO, CTSL, β -Catenina, PPM1D, Chk1, WISP1, y LOT1;
- (m) HER2, TP53BP2, Bcl2, DIABLO, TIMP1, EPHX1, TOP2A, TRAIL, CA9, y AREG;
- (n) BAG1, TP53BP2, PRAME, IL6, CCNB1, PAI1, AREG, tamaño del tumor, CA9, y Ki67;
- (o) CEGP1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, STK15, y AKT2, y FGF18;
- (p) STK15, TP53BP2, PRAME, IL6, CCNE1, AKT2, DIABLO, cMet, CCNE2, y COX2;
- (q) KLK10, EstR1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, y BBC3;
- (r) AIB1, TP53BP2, Bcl2, DIABLO, TIMP1, CD3, p53, CA9, GRB7, y EPHX1
- (s) BBC3, GRB7, CD68, PRAME, TOP2A, CCNB1, EPHX1, CTSL, GSTM1, y APC;
- (t) CD9, GRB7, CD68, TOP2A, Bcl2, CCNB1, CD3, DIABLO, ID1, y PPM1D;
- (w) EGFR, KRT14, GRB7, TOP2A, CCNB1, CTSL, Bcl2, TP, KLK10, y CA9;
- (x) HIF1 α , PR, DIABLO, PRAME, Chk1, AKT2, GRB7, CCNE1, TOP2A, y CCNB1;
- (y) MDM2, TP53BP2, DIABLO, Bcl2, AIB1, TIMP1, CD3, p53, CA9, y HER2;
- (z) MYBL2, TP53BP2, PRAME, IL6, Bcl2, DIABLO, CCNE1, EPHX1, TIMP1, y CA9;
- (aa) p27, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, STK15, AKT2, e ID1;
- (ab) RAD51, GRB7, CD68, TOP2A, CIAP2, CCNB1, BAG1, IL6, FGFR1, y TP53BP2;
- (ac) SURV, GRB7, TOP2A, PRAME, CTSL, GSTM1, CCNB1, VDR, CA9; y CCNE2;
- (ad) TOP2B, TP53BP2, DIABLO, Bcl2, TIMP1, AIB1, CA9. p53, KRT8, y BAD;
- (ae) ZNF217, GRB7, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, APC4, y β -Catenina,

en una muestra de tejido de cáncer de mama obtenida del paciente, normalizada con respecto a los niveles de expresión de todos los transcritos de RNA o sus productos de expresión en dicha muestra de tejido de cáncer de mama, o de una serie de referencia de transcritos de RNA o sus productos;

- (2) someter los datos obtenidos en el paso (1) a análisis estadístico; y
- (3) determinar si la probabilidad de dicha supervivencia a largo plazo ha aumentado o disminuido.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un método para predecir la probabilidad de supervivencia a largo plazo de un paciente al que se le ha diagnosticado un cáncer de mama invasivo positivo para receptores de estrógeno (ER-positivo), sin recurrencia del cáncer de mama, que comprende los pasos de:

- 5 (1) determinar los niveles de expresión de los transcritos de RNA o los productos de expresión de genes o una serie de genes seleccionados del grupo compuesto por CD68; CTSL; FBX05; SURV; CCNB1; MCM2; Chk1; MYBL2; HIF1A; cMET; EGFR; TS; STK15; IGFR1; Bcl2; HNF3A; TP53BP2; GATA3; BBC3; RAD51C; BAG1; IGFBP2; PR; CD9; RB1; EPHX1; CEGP1; TRAIL; DR5; p27; p53; MTA; RIZ1; ErbB3; TOP2B; EIF4E, donde la expresión de los siguientes genes en el cáncer ER-positivo es indicativa de una probabilidad reducida de supervivencia sin recurrencia del cáncer tras la cirugía: CD68; CTSL; FBX05; SURV; CCNB1; MCM2; Chk1; MYBL2; HIF1A; cMET; EGFR; TS; 10 STK15, y donde la expresión de los siguientes genes es indicativa de una mejor prognosis para la supervivencia sin recurrencia del cáncer tras la cirugía: IGFR1; Bcl2; HNF3A; TP53BP2; GATA3; BBC3; RAD51C; BAG1; IGFBP2; PR; CD9; RB1; EPHX1; CEGP1; TRAIL; DR5; p27; p53; MTA; RIZ1; ErbB3; TOP2B; EIF4E.
- (2) someter los datos obtenidos en el paso (1) a análisis estadístico; y
- (3) determinar si la probabilidad de dicha supervivencia a largo plazo ha aumentado o disminuido.

- 15 En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un método para predecir la probabilidad de supervivencia a largo plazo de un paciente al que se le ha diagnosticado un cáncer de mama invasivo negativo para receptores de estrógeno (ER-negativo), sin recurrencia del cáncer de mama, que comprende los pasos de determinar los niveles de expresión de los transcritos de RNA o los productos de expresión de genes o de la serie de genes CCND1; UPA; HNF3A; CDH1; Her2; GRB7; AKT1; STMY3; α -Catenina; VDR; GR01; KT14; KLK10; Maspina, TGF α , y FRP1, donde la expresión de 20 los siguientes genes es indicativa de una probabilidad reducida de supervivencia sin recurrencia del cáncer: CCND1; UPA; HNF3A; CDH1; Her2; GRB7; AKT1; STMY3; α -Catenina; VDR; GRO1, y donde la expresión de los siguientes genes es indicativa de una mejor prognosis para la supervivencia sin recurrencia del cáncer: KT14; KLK10; Maspina, TGF α , y FRP1.

25 En un aspecto diferente, la invención se refiere a un método para preparar un perfil genómico personalizado para un paciente que comprende los pasos siguientes:

- a) someter el RNA extraído del tejido de mama obtenido del paciente a un análisis de expresión génica;
- b) determinar el nivel de un transcrito de mRNA de MDM2, donde el nivel de expresión se normaliza con respecto a un gen o genes de control y opcionalmente se compara con la cantidad encontrada en una serie de tejidos de referencia de cáncer de mama; y
- 30 c) crear un informe en el que se resuman los datos obtenidos por el análisis de expresión génica.

El informe puede, por ejemplo, incluir la predicción de la probabilidad de supervivencia a largo plazo del paciente y/o la recomendación de una modalidad de tratamiento para dicho paciente.

- 35 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para la amplificación de un gen incluido en las Tablas 5A y B por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que comprende la realización de dicha PCR utilizando un amplicón incluido en las Tablas 5A y B y un conjunto de iniciador-sonda incluido en las Tablas 5A-F.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un amplicón de la PCR incluido en las Tablas 5A y B.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un conjunto de iniciador-sonda de la PCR incluido en las Tablas 6A-F.

La divulgación se refiere también a un método de prognosis que comprende:

- 40 a) someter una muestra que contiene células de cáncer de mama obtenidas de un paciente a análisis cuantitativo del nivel de expresión del transcrito de RNA de al menos un gen seleccionado del grupo compuesto por GRB7, CD68, CTSL, Chk1, AIB1, CCNB1, MCM2, FBX05, Her2, STK15, SURV, EGFR, MYBL2, HIF1 α , y TS, o su producto, e
- 45 b) identificar que el paciente tiene una probabilidad reducida de supervivencia de largo plazo sin recurrencia del cáncer de mama, si los niveles de expresión normalizados del gen o los genes o sus productos sobrepasan un umbral de expresión definido

En un aspecto diferente, la divulgación se refiere a un método para prognosis que comprende:

- 50 a) someter una muestra que contiene células de cáncer de mama obtenidas de un paciente a análisis cuantitativo del nivel de expresión del transcrito de RNA de al menos un gen seleccionado del grupo compuesto por TP53BP2, PR, Bcl2, KRT14, EstR1, IGFBP2, BAG1, CEGP1, KLK10, β -Catenina, γ -Catenina, DR5, PI3KCA2, RAD51C, GSTM1, FHIT, RIZ1, BBC3, TBP, p27, IRS1, IGF1R, GATA3, ZNF217, CD9, pS2, ErbB3, TOP2B, MDM2, IGF1, y KRT19, e
- b) identificar al paciente por tener una probabilidad aumentada de supervivencia de largo plazo sin recurrencia del cáncer de mama, si los niveles de expresión normalizados del gen o los genes o sus productos sobrepasan 55 un umbral de expresión definido.

La divulgación se refiere también a un kit que contiene uno o más de los elementos siguientes: (1) tampón de extracción/reactivos y protocolo; (2) tampón de transcripción inversa/reactivos y protocolo; y (3) tampón de qPCR/reactivos y protocolo, adecuados para realizar cualquiera de los métodos anteriores.

Breve Descripción de los Dibujos

- 5 La Tabla 1 es una lista de genes, cuya expresión se correlaciona con supervivencia del cáncer de mama. Resultados de una prueba clínica retrospectiva. Análisis estadístico binario.
- La Tabla 2 es una lista de genes, cuya expresión se correlaciona con la supervivencia del cáncer de mama en pacientes positivos a receptores de estrógenos (ER). Resultados de una prueba clínica retrospectiva. Análisis estadístico binario.
- 10 La Tabla 3 es una lista de genes, cuya expresión se correlaciona con la supervivencia del cáncer de mama en pacientes negativos a receptores de estrógenos (ER). Resultados de una prueba clínica retrospectiva. Análisis estadístico binario.
- La Tabla 4 es una lista de genes, cuya expresión se correlaciona con la supervivencia del cáncer de mama. Resultados de una prueba clínica retrospectiva. Análisis estadístico binario de riesgos proporcionales de Cox.
- 15 Las Tablas 5A y B muestran una lista de genes, cuya expresión se correlaciona con la supervivencia del cáncer de mama. Resultados de una prueba clínica retrospectiva. La tabla incluye números de acceso para los genes, y secuencias amplicón utilizadas para amplificación de la PCR.
- Tablas 6A-6F. La tabla incluye secuencias para los iniciadores directo e inverso (designados por "f" y "r", respectivamente) y sondas (designadas por "p") utilizadas para amplificación PCR de los amplicones enumerados en las Tablas 5A-B.
- 20

Descripción Detallada de la Realización Preferida

A. Definiciones

- 25 A no ser que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que es comprendido comúnmente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención. Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (Nueva York, NY 1992), proporcionan a un experto en la técnica una guía general para muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.
- 30 Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria, que podrían utilizarse en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita en modo alguno a los métodos y materiales descritos. Para los propósitos de la presente invención, se definen a continuación los términos siguientes.
- El término "microrred" se refiere a una disposición ordenada de elementos de red hibridables, preferiblemente sondas de polinucleótidos, sobre un sustrato.
- 35 El término "polinucleótido", tanto si se utiliza en singular como en plural, se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser RNA o DNA no modificado o RNA o DNA modificado. Así, por ejemplo, los polinucleótidos que se definen en esta memoria incluyen, sin limitación, DNA mono- y bicatenario, DNA que incluye regiones mono- y bicatenarias, RNA mono- y bicatenario, y RNA que incluye regiones mono- y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden DNA y RNA que puede ser monocatenario o, más típicamente,
- 40 bicatenario o que incluyen regiones mono- y bicatenarias. Adicionalmente, el término "polinucleótido" como se utiliza en esta memoria se refiere a regiones de triple hélice que comprenden RNA o DNA o a la vez RNA y DNA. Las cadenas en tales regiones pueden ser de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir la totalidad de una o más de las moléculas, pero más típicamente implican sólo una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región de triple hélice es a menudo un oligonucleótido. El término "polinucleótido" incluye específicamente cDNAs. El término incluye DNAs (con inclusión de cDNAs) y RNAs que contiene una o más bases modificadas. Así, DNAs o RNAs con cadenas principales modificadas por estabilidad o por otras razones son "polinucleótidos" tal como se entiende dicho término en esta memoria. Además, DNAs o RNAs que comprenden bases poco comunes, tales como inosina, o bases modificadas, por ejemplo bases tritiadas, se incluyen dentro del término "polinucleótidos" como se define en esta memoria. En general, el término "polinucleótido" abarca todas las formas
- 50 química, enzimática y/o metabólicamente modificadas de polinucleótidos sin modificar, así como las formas químicas de DNA y RNA características de virus y células, con inclusión de células simples y complejas.
- El término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido relativamente corto, que incluye, sin limitación, desoxirribonucleótidos monocatenarios, ribonucleótidos mono- o bicatenarios, híbridos RNA:DNA y DNAs bicatenarios. Oligonucleótidos, tales como oligonucleótidos sonda de DNA monocatenario, se sintetizan a menudo por métodos químicos, por ejemplo utilizando sintetizadores automáticos de oligonucleótidos que están disponibles comercialmente. Sin embargo, los oligonucleótidos pueden fabricarse por una diversidad de otros métodos, con inclusión de técnicas mediadas por DNA recombinante in vitro y por expresión de DNAs en células y organismos.
- 55

- Los términos "gen expresado diferencialmente", "expresión génica diferencial" y sus sinónimos, que se utilizan de modo intercambiable, se refieren a un gen cuya presión está activada en un nivel mayor o menor en un individuo que sufre una enfermedad, especialmente cáncer, tal como cáncer de mama, con relación a su expresión en un individuo normal o de control. Los términos incluyen también genes cuya expresión está activada en un nivel mayor o menor en diferentes etapas de la misma enfermedad. Se entiende también que un gen expresado diferencialmente puede estar activado o inhibido al nivel del ácido nucleico o al nivel de proteínas, o puede estar sometido a remodelación alternativa para dar como resultado un producto polipeptídico diferente. Tales diferencias pueden evidenciarse por un cambio en los niveles de mRNA, expresión superficial, secreción u otra distribución de un polipéptido, por ejemplo. La expresión diferencial de genes puede incluir una comparación de la expresión entre dos o más genes o sus productos génicos, o una comparación de las relaciones de la expresión entre dos o más genes o sus productos génicos, o incluso una comparación de dos productos del mismo gen procesados diferentemente, que difieren entre individuos normales e individuos que padecen una enfermedad, específicamente cáncer, o entre diversos estadios de la misma enfermedad. La expresión diferencial incluye diferencias tanto cuantitativas como cualitativas en el patrón de expresión temporal o celular en un gen o sus productos de expresión entre, por ejemplo, células normales y enfermas, o entre células que han sufrido sucesos o estadios de enfermedad diferentes. Para el propósito de esta invención, se considera que está presente "expresión diferencial de genes" cuando existe al menos una diferencia aproximada de 2 veces, de modo preferible al menos aproximadamente de 4 veces, de modo más preferible al menos aproximadamente de 6 veces, y de modo muy preferible al menos aproximadamente de 10 veces entre la expresión de un gen dado en individuos normales y enfermos, o en diversos estadios del desarrollo de la enfermedad en un individuo enfermo.
- La expresión "amplificación génica" se refiere a un proceso por el cual se forman copias múltiples de un gen o fragmento de gen en una célula o línea de células particular. La región duplicada (un tramo de DNA amplificado) se conoce a menudo como "amplicón". Usualmente, la cantidad del RNA mensajero (mRNA) producida, es decir, el nivel de expresión génica, aumenta también en la proporción del número de copias producidas del gen particular expresado.
- El término "diagnosis" se utiliza en esta memoria para hacer referencia a la identificación de un estado, enfermedad o afección molecular o patológica, tal como la identificación de un subtipo molecular de cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, u otro tipo de cáncer.
- El término "prognosis" se utiliza en esta memoria para hacer referencia a la predicción de la probabilidad de muerte atribuida al cáncer o progresión, con inclusión de recurrencia, propagación metastásica, y resistencia a los fármacos, de una enfermedad neoplásica, tal como cáncer de mama.
- El término "predicción" se utiliza en esta memoria para hacer referencia a la probabilidad de que un paciente responda favorable o desfavorablemente a un fármaco o serie de fármacos, así como el grado de dichas respuestas, o de que de un paciente sobreviva, después de eliminación quirúrgica del tumor primario y/o quimioterapia durante cierto tiempo sin recurrencia del cáncer. Los métodos predictivos de la presente invención pueden utilizarse clínicamente para tomar decisiones acerca del tratamiento por selección de las modalidades de tratamiento más apropiadas para cualquier paciente particular. Los métodos predictivos de la presente invención son instrumentos valiosos en la predicción de si un paciente tiene probabilidad de responder favorablemente a un régimen de tratamiento, tal como intervención quirúrgica, quimioterapia con un fármaco o combinación de fármacos dado(a), y/o terapia de radiación, o si es probable la supervivencia a largo plazo del paciente, después de cirugía y/o finalización de la quimioterapia u otras modalidades de tratamiento.
- El término supervivencia a "largo plazo" se utiliza en esta memoria para hacer referencia a la supervivencia durante al menos 3 años, más preferiblemente durante al menos 8 años, muy preferiblemente durante al menos 10 años después de cirugía u otro tratamiento.
- El término "tumor", como se utiliza en esta memoria, hace referencia a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos.
- Los términos "cáncer" y "canceroso" hacen referencia a o describen la afección fisiológica en los mamíferos que se caracteriza típicamente por crecimiento celular descontrolado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero sin carácter limitante, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma, y cáncer cerebral.
- La "patología" del cáncer incluye todos los fenómenos que ponen en peligro el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, crecimiento celular anormal o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de las células vecinas, liberación de citoquinas u otros productos de secreción a niveles anormales, supresión o agravación de la respuesta inflamatoria o inmunológica, neoplasia, premalignidad, malignidad, invasión de los tejidos u órganos circundantes o distantes, tales como ganglios linfáticos, etc.
- "La severidad" de las reacciones de hibridación puede ser determinada fácilmente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica, y en general es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sales. En general, las sondas más largas requieren mayores temperaturas para reasociación apropiada, en tanto que las sondas más cortas precisan temperaturas más bajas. La hibridación depende por lo general de la capacidad del DNA desnaturalizado para reasociarse cuando están presentes cadenas complementarias en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología

deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, tanto mayor es la temperatura relativa que puede utilizarse. Como resultado, se sigue que las temperaturas relativas más altas tenderían a hacer más severas las condiciones de la reacción, en tanto que las temperaturas más bajas harían lo contrario. Para detalles y explicación adicionales de la severidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers (1995).

"Condiciones severas" o "condiciones de alta severidad", como se definen en esta memoria, típicamente: (1) emplean concentración iónica baja y temperatura alta para el lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecilsulfato de sodio 0,1% a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con tampón 0,1% de seroalbúmina bovina/0,1% Ficoll/0,1% polivinilpirrolidona/fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; o (3) emplean 50% formamida, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), 0,1% pirofosfato de sodio, 5 x solución de Denhardt, DNA de esperma de salmón tratado por ultrasonidos (50 µg/ml), 0,1% SDS, y 10% sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y 50% formamida a 55°C, seguido por un lavado de alta severidad consistente en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

Las "condiciones moderadamente severas" pueden identificarse como ha sido descrito por Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (v.g., temperatura, concentración iónica y % SDS) menos severas que las arriba descritas. Un ejemplo de condiciones moderadamente severas consiste en incubación durante una noche a 37°C en una solución que comprende: 20% formamida, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, 10% sulfato de dextrano, y 20 mg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturizado cizallado, seguido por lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El profesional experto reconocerá el modo de ajustar la temperatura, la concentración iónica, etc en caso necesario para acomodar factores tales como longitud de sonda y análogos.

En el contexto de la presente invención, la referencia a "al menos uno", "al menos dos", "al menos cinco", etc de los genes enumerados en cualquier serie de genes particular significa uno cualquiera o cualquiera y la totalidad de las combinaciones de los genes enumerados.

Los términos "umbral de expresión", y "umbral de expresión definido" se utilizan intercambiamente y hacen referencia al nivel de un gen o producto génico en cuestión, por encima del cual el gen o producto génico sirve como marcador predictivo para supervivencia de un paciente sin recurrencia de cáncer. El umbral viene definido experimentalmente por estudios clínicos tales como los descritos en el ejemplo que sigue. El umbral de expresión puede seleccionarse para sensibilidad máxima, para selectividad máxima, o para error mínimo. La determinación del umbral de expresión para cualquier situación está plenamente dentro del conocimiento de los expertos en la técnica.

B. Descripción Detallada

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, métodos convencionales de biología molecular (con inclusión de métodos recombinantes), microbiología, biología celular, y bioquímica, que están dentro de la experiencia en la técnica. Dichos métodos se explican detalladamente en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental immunology", 4ª edición (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); y "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., eds., 1994).

1. Determinación del Perfil de la Expresión Génica

En general, los métodos de determinación del perfil de la expresión génica pueden dividirse en dos grandes grupos: métodos basados en análisis de hibridación de polinucleótidos, y métodos basados en secuenciación de polinucleótidos. Los métodos utilizados más comúnmente conocidos en la técnica para la cuantificación de la expresión de mRNA en una muestra incluyen transferencia Northern e hibridación *in situ* (Parker & Barnes, *Methods in Molecular Biology* 106:247-283 (1999)), ensayos de protección de RNAsas (Hod, *Biotechniques* 13:852-854 (1992); y reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) (Weis et al., *Trends in Genetics* 8:263-264 (1992)). Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, con inclusión de dúplex de DNA, dúplex de RNA, y dúplex híbridos DNA-RNA o dúplex DNA-proteína. Métodos representativos para análisis de expresión de genes Basándose en secuenciación incluyen Serial Analysis of Gene Expression (SAGE), y análisis de expresión de genes por secuenciación masiva de firma paralela (MPSS).

2. PCR de Transcriptasa Inversa (RT-PCR)

De las técnicas arriba enumeradas, el método cuantitativo más sensible y más flexible es RT-PCR, que puede utilizarse para comparar los niveles de mRNA en poblaciones de muestra diferentes, en tejidos normales y tumorales, con o sin tratamiento mediante fármacos, para caracterizar patrones de expresión génica, discriminar entre mRNAs estrechamente relacionados, y para analizar la estructura del RNA.

El primer paso es el aislamiento de mRNA de una muestra diana. El material de partida es típicamente RNA total aislado de tumores humanos o líneas de células tumorales, y tejidos o líneas de células normales correspondientes,

respectivamente. Así, puede aislarse RNA de una diversidad de tumores primarios, que incluyen tumores o líneas de células tumorales de mama, pulmón, colon, próstata, cerebro, hígado, riñón, páncreas, bazo, timo, testículo, ovario, útero, etc., con DNA recogido de donantes sanos. Si la fuente de mRNA es un tumor primario, el mRNA puede extraerse, por ejemplo, de muestras de tejido congeladas o archivadas incrustadas en parafina y fijadas (v.g. fijadas en formalina).

Los métodos generales para extracción de mRNA son bien conocidos en la técnica y se describen en libros de texto estándar de biología molecular, con inclusión de Ausubel *et al.*, *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1997). Métodos para extracción de RNA a partir de tejidos incrustados en parafina se describen, por ejemplo, en Rupp y Locker, *Lab. Invest.* 56: A67 1987), y De Andrés *et al.*, *BioTechniques* 18:42044 (1995). En particular, el aislamiento del RNA puede realizarse utilizando kit de purificación, series de tampones y proteasa de fabricantes comerciales, tales como Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, el RNA total de células en cultivo puede aislarse utilizando mini-columnas Qiagen RNeasy. Otros kits de aislamiento de RNA disponibles comercialmente incluyen MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (EPICENTRE®, Madison, WI), y Paraffin Block RNA Isolation Kit (Ambion, Inc.). El RNA total de muestras de tejido puede aislarse utilizando RNA Stat-60 (Tel-Test). El RNA preparado a partir de un tumor puede aislarse, por ejemplo, por centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio.

Dado que el RNA no puede servir como molde para la PCR, el primer paso en la determinación del perfil de expresión génica por RT-PCR es la transcripción inversa del molde de RNA en cDNA, seguido por su amplificación exponencial en una reacción PCR. Las dos transcriptasas inversas utilizadas más corrientemente son la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis de las aves (AMV-RT) y la transcriptasa inversa de virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). El paso de transcripción inversa se inicia típicamente utilizando iniciadores específicos, hexámeros aleatorios, o iniciadores oligo-dT, dependiendo de las circunstancias y de la meta de determinación del perfil de expresión. Por ejemplo, el RNA extraído puede transcribirse inversamente utilizando un kit RNA PCR de GeneAmp (Perkin Elmer, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA derivado puede utilizarse luego como molde en la reacción PCR subsiguiente.

Aunque el paso PCR puede utilizar una diversidad de DNA-polimerasas termoestables dependientes de DNA, el mismo emplea típicamente la DNA-polimerasa Taq, que tiene actividad de 5'-3'-nucleasa pero carece de actividad de endonucleasa 3'-5' de corrección de lectura. Así, la PCR TaqMan® utiliza típicamente la actividad de 5'-nucleasa de la polimerasa Taq o Tth para hidrolizar una sonda de hibridación fijada a su amplicón diana, pero se puede utilizar cualquier enzima con actividad de 5'-nucleasa equivalente. Se utilizan dos iniciadores oligonucleotídicos para generar un amplicón típico de una reacción PCR. Un tercer oligonucleótido, o sonda, está diseñado para detectar secuencias de nucleótidos localizadas entre los dos iniciadores PCR. La sonda es no-extensible por la enzima DNA-polimerasa Taq, y está marcada con un tinte informador fluorescente y un tinte fluorescente de extinción. Cualquier emisión inducida por láser procedente del tinte informador es extinguida por el tinte de extinción cuando los dos tintes están localizados próximos uno a otro como ocurre en la sonda. Durante la reacción de amplificación, la enzima DNA-polimerasa Taq escinde la sonda de una manera dependiente del molde. Los fragmentos de sonda resultantes se disocian en solución, y la señal procedente del tinte informador liberado se libera del efecto de extinción del segundo fluoróforo. Se libera una molécula de tinte informador por cada nueva molécula sintetizada, y la detección del tinte informador no extinguido proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

La RT-PCR Taqman® puede realizarse utilizando el tipo disponible comercialmente, tal como, por ejemplo, ABI PRISM 7700™ Sequence Detection System™ (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), o Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). En una realización preferida, el procedimiento de la 5'-nucleasa se ejecuta en un dispositivo PCR cuantitativo en tiempo real tal como el ABI PRISM 7700™ Sequence Detection System™. El sistema consiste en un termociclador, láser, dispositivo acoplado de carga (CCD), cámara y computadora. El sistema amplifica muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por el láser es recogida en tiempo real por cables de óptica de fibras para la totalidad de los 96 pocillos, y es detectada en el CCD. El sistema incluye software para la ejecución del instrumento y para el análisis de los datos.

Los datos del ensayo de 5'-nucleasa se expresan inicialmente como Ct, o el ciclo umbral. Como se ha expuesto anteriormente, los valores de fluorescencia se registran durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificada hasta dicho momento en la reacción de amplificación. El momento en el que se registra la señal fluorescente significativa es el ciclo umbral (C_t).

Para minimizar los errores y el efecto de la variación de muestra a muestra, la RT-PCR se realiza usualmente utilizando un patrón interno. El patrón interno ideal se expresa a un nivel constante entre tejidos diferentes, y no se ve afectado por el tratamiento experimental. Los RNAs utilizados más frecuentemente para normalizar patrones de expresión génica son mRNAs para los genes internos gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y β-actina.

Una variación más reciente de la técnica RT-PCR es la PCR cuantitativa en tiempo real, que mide la acumulación de productos PCR mediante una sonda fluorígena de doble etiquetado (a saber, la sonda TaqMan®). La PCR en tiempo real es compatible no sólo con la PCR competitiva cuantitativa, en la que se utiliza un competidor interno para cada secuencia diana para la normalización, sino también con la PCR cuantitativa comparativa que utiliza un gen de

normalización contenido en la muestra, o un gen interno para RT-PCR. Para detalles adicionales véase, v.g. Held et al., *Genome Research* 6: 986-994 (1996).

Los pasos de un protocolo representativo para determinación del perfil de expresión génica utilizando tejidos fijados incrustados en parafina como la fuente de RNA, que incluyen aislamiento del mRNA, purificación, extensión con iniciadores y amplificación se dan en diversos artículos de revista publicados { por ejemplo: T.E. Godfrey et al. *J. Molec. Diagnostics* 2: 84-91 [2000]; K. Specht et al., *Am. J. Pathol.* 158: 419-29 [2001]}. Resumidamente, un proceso representativo comienza con corte de secciones de aproximadamente 10 µm de espesor de muestras de tejido tumoral incrustadas en parafina. Se extrae a continuación el RNA, y se eliminan las proteínas y el DNA. Después de análisis de la concentración de RNA, pueden incluirse si es necesario pasos de reparación y/o amplificación del RNA, y el RNA se transcribe inversamente utilizando promotores específicos de genes seguido por RT-PCR.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, los iniciadores y sondas de PCR pueden diseñarse basándose en secuencias de intrón presentes en el gen a amplificar. En este caso, el primer paso en el diseño del iniciador/sonda es la delineación de secuencias de intrón dentro de los genes. Esto puede hacerse mediante software públicamente disponible, tal como el software DNA BLAT desarrollado por Kent, W.J. *Genome Res.* 12 (4): 656-64 (2002), o por el software BLAST con inclusión de sus variaciones. Los pasos subsiguientes siguen métodos bien establecidos de diseño de iniciadores y sondas PCR.

Con objeto de evitar señales inespecíficas, es importante enmascarar las secuencias repetitivas dentro de los intrones cuando se diseñan los iniciadores y las sondas. Esto puede realizarse fácilmente utilizando el programa Repeat Masker disponible en línea del Baylor College of Medicine, que criba secuencias de DNA contra una biblioteca de elementos repetitivos y devuelve una secuencia de consulta en la cual los elementos repetitivos están enmascarados. Las secuencias de intrón enmascaradas pueden utilizarse luego para diseñar secuencias de iniciadores y sondas utilizando cualesquiera paquetes de diseño iniciador/sonda disponibles al público comercialmente o de cualquier otro modo, tales como Primer Express (Applied Biosystems); MGB 'assay-by-design' (Applied Biosystems); Primer3 (Steve Rozen y Helen J. Skaletsky (2000) Primer3 en la WWW para usuarios generales y para biólogos programadores. En: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386).

Los factores más importantes considerados en el diseño de iniciadores PCR incluyen longitud del iniciador, temperatura de fusión (T_m), y contenido en G/C, especificidad, secuencias complementarias de iniciadores, y secuencia del extremo 3'. Por lo general, los iniciadores PCR óptimos tienen habitualmente 17-30 bases de longitud, y contienen aproximadamente 20-80%, tal como, por ejemplo, aproximadamente 50-60% de bases G+C. Típicamente se prefieren valores T_m entre 50 y 80°C, v.g. aproximadamente 50 a 70°C.

Para directrices adicionales en relación con el diseño de iniciadores y sondas PCR véase, v.g. Dieffenbach, C.W. et al., "General Concepts for PCR Primer Design" en: *PCR Primer, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1995, pp. 133-155; Innis y Gelfand, "Optimization of PCRs" en: *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, CRC Press, Londres, 1994, pp. 5-11; y Plasterer, T.N. Primerselect: Primer and probe design. *Methods Mol. Biol.* 70:520-527 (1997).

3. Microrredes

La expresión diferencial de genes puede identificarse también, o confirmarse utilizando la técnica de microrredes. Así, el perfil de expresión de genes asociados con el cáncer de mama puede medirse en tejido tumoral reciente o incrustado en parafina, utilizando tecnología de microrredes. En este método, las secuencias polinucleotídicas de interés (con inclusión de cDNAs y oligonucleótidos) se extienden en placas, o se despliegan, sobre un sustrato de microchip. Las secuencias dispuestas en redes se hibridan luego con sondas de DNA específicas de las células o tejidos de interés. De igual modo que en el método RT-PCR, la fuente de mRNA es típicamente RNA total aislado de tumores o líneas de células tumorales humanas, y tejidos o líneas de células normales correspondientes. Así, puede aislarse RNA de una diversidad de tumores primarios o líneas de células tumorales. Si la fuente de mRNA es un tumor primario, el mRNA puede extraerse, por ejemplo, de muestras de tejidos congeladas o archivadas incrustadas en parafina y fijadas (v.g. fijadas en formalina), que se emplean rutinariamente y se guardan en la práctica clínica diaria.

En una realización específica de la técnica de microrredes, se aplican inserciones amplificadas por PCR de clones de cDNA a un sustrato en una red densa. Preferiblemente, se aplican al sustrato al menos 10.000 secuencias de nucleótidos. Los genes dispuestos en microrredes, inmovilizados en el microchip a 10.000 elementos cada uno, son adecuados para hibridación en condiciones severas. Pueden generarse sondas de cDNA marcadas fluorescentemente por incorporación de nucleótidos fluorescentes mediante transcripción inversa de RNA extraído de los tejidos de interés. Las sondas de cDNA marcadas aplicadas al chip se hibridan con especificidad a cada mancha de DNA en la red. Después de lavado severo para eliminar las sondas no fijadas específicamente, se escanea el chip por microscopía láser confocal o por otro método de detección, tal como una cámara CCD. La cuantificación de la hibridación de cada elemento dispuesto en red permite la evaluación de la abundancia de mRNA correspondiente. Con la fluorescencia dual en color, las sondas de cDNA marcadas por separado generadas por dos fuentes de RNA se hibridan por pares a la red. La abundancia relativa de los transcritos de las dos fuentes correspondientes a cada gen especificado se determina de este modo simultáneamente. La escala miniaturizada de la hibridación proporciona una evaluación conveniente y rápida del patrón de expresión para grandes números de genes. Se ha demostrado que dichos métodos tienen la sensibilidad requerida para detectar transcritos raros, que se expresan a razón de un

pequeño número de copias por célula, y para detectar reproduciblemente al menos aproximadamente diferencias de dos veces en los niveles de expresión (Schena *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (2): 106-149 (1996)). El análisis de microrredes puede realizarse por medio de equipos disponibles comercialmente, siguiendo protocolos del fabricante, por ejemplo por utilización de la tecnología Affymetrix GenChip, o la tecnología de microrredes de Incyte.

- 5 El desarrollo de métodos de microrredes para análisis en gran escala de la expresión génica hace posible la búsqueda sistemática de marcadores moleculares de clasificación del cáncer y la predicción de resultados en una diversidad de tipos de tumor.

4. Análisis Serial de la Expresión Génica (SAGE)

- 10 El análisis serial de la expresión génica (SAGE) es un método que permite el análisis simultáneo y cuantitativo de un gran número de transcritos génicos, sin necesidad de proporcionar una sonda de hibridación individual para cada transcrito. En primer lugar, se genera un marcador de secuencia corto (aproximadamente 10-14 pb) que contiene información suficiente para identificar singularmente un transcrito, con tal que la etiqueta se obtenga de una posición singular en cada transcrito. A continuación, se enlazan muchos transcritos unos a otros para formar moléculas seriadas largas, que pueden secuenciarse, revelando la identidad de los marcadores múltiples simultáneamente. El patrón de expresión de cualquier población de transcritos puede evaluarse cuantitativamente por determinación de la abundancia de marcadores individuales, e identificación del gen correspondiente a cada marcador. Para más detalles véase, v.g. Velculescu *et al.*, *Science* 270:484-487 (1995); y Velculescu *et al.*, *Cell* 88:243-51 (1997).

5. Tecnología MassARRAY

- 20 La tecnología MassARRAY (Sequenon, San Diego, California) es un método automatizado de alta capacidad para el análisis de la expresión génica utilizando espectrometría de masas (MS) para la detección. De acuerdo con este método, después del aislamiento del RNA, transcripción inversa y amplificación por PCR, los cDNAs se someten a escisión con iniciadores. Los productos de escisión con iniciadores derivados de cDNA se purifican, y se distribuyen en una red de chips que está pre-cargada con los componentes necesarios para la preparación de la muestra de MS MALTI-TOF. Los diversos cDNAs presentes en la reacción se cuantifican por análisis de las áreas de los picos del espectro de masas obtenido.

6. Análisis de la Expresión Génica por Secuenciación Masiva de Huellas Paralelas (MPSS)

- 30 Este método, descrito por Brenner *et al.*, *Nature Biotechnology* 18: 630-634 (2000), es un método de secuenciación que combina la secuenciación de firmas no basadas en gel con clonación *in vitro* de millones de moldes sobre microcuentas separadas de 5 µm de diámetro. En primer lugar, se construye una biblioteca de microcuentas de moldes de DNA por clonación *in vitro*. Esto va seguido por el ensamblaje de una red planar de las microcuentas que contienen moldes en una celda de flujo a una densidad elevada (típicamente mayor que 3×10^6 microcuentas/cm²). Los extremos libres de los moldes clonados en cada microcuenta se analizan simultáneamente, utilizando un método de secuenciación de firmas Basándose en fluorescencia que no requiere separación de los fragmentos de DNA. Se ha demostrado que este método proporciona simultánea y exactamente, en una sola operación, centenares de miles de secuencias firma de genes a partir de una biblioteca de cDNA de levadura.

7. Inmunohistoquímica

- 40 Los métodos de inmunohistoquímica son adecuados también para detectar los niveles de expresión de marcadores de pronóstico de la presente divulgación. Así, anticuerpos o antiseros, preferiblemente antiseros policlonales, y muy preferiblemente anticuerpos monoclonales específicos para cada marcador se utilizan para detectar la expresión. Los anticuerpos pueden detectarse por marcación directa de los anticuerpos propiamente dichos, por ejemplo, con marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de haptenos tales como biotina, o una enzima tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Alternativamente, se utiliza un anticuerpo primario sin marcar en asociación con un anticuerpo secundario marcado, que comprende antiseros, antiseros policlonales o un anticuerpo monoclonal específico para el anticuerpo primario. Protocolos y kits de inmunohistoquímica son bien conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente.

8. Proteómica

- 50 El término "proteoma" se define como la totalidad de las proteínas presentes en una muestra (v.g. tejido, organismo, o cultivo de células) en un momento determinado. La proteómica incluye, entre otras cosas, el estudio de los cambios globales de expresión de las proteínas en una muestra (a lo que se hace referencia también como "proteómica de expresión"). La proteómica incluye típicamente los pasos siguientes: (1) separación de las proteínas individuales en una muestra por electroforesis en gel 2-D (2-D PAGE); (2) identificación de las proteínas individuales recuperadas del gel (v.g. por espectrometría de masas o secuenciación N-terminal, y (3) análisis de los datos utilizando bioinformática. Los métodos de la proteómica son suplementos valiosos para otros métodos de determinación del perfil de la expresión génica, y pueden utilizarse, solos o en combinación con otros métodos, para detectar los productos de los marcadores de pronóstico de la presente divulgación.

9. Descripción General del Aislamiento, Purificación y Amplificación del mRNA

Los pasos de un protocolo representativo para la determinación del perfil de la expresión génica utilizando tejidos fijos incrustados en parafina como la fuente de RNA, que incluyen aislamiento del mRNA, purificación, extensión con

iniciadores y amplificación, se dan en diversos artículos de revistas publicados {por ejemplo: T.E. Godfrey et al. J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 [2000]; K. Specht et al., Am. J. Pathol. 158: 419-29 [2001]}. Resumidamente, un proceso representativo comienza con el corte de secciones de aproximadamente 10 µm de espesor de muestras de tejido tumoral incrustadas en parafina. El RNA se extrae a continuación, y se eliminan las proteínas y el DNA. Después del análisis de la concentración de RNA, pueden incluirse pasos de reparación y/o amplificación del RNA en caso necesario, y el RNA se transcribe inversamente utilizando promotores específicos de genes seguido por RT-PCR. Finalmente, los datos se analizan para identificar la o las mejores opciones de tratamiento disponibles para el paciente sobre la base del patrón de expresión génica característico identificado en la muestra de tumor examinada.

10. Serie de Genes de Cáncer de Mama, Subsecuencias de Genes Ensayadas, y Aplicación Clínica de los Datos de Expresión Génica

Un aspecto importante de la presente invención es la utilización de la expresión medida de ciertos genes por tejido de cáncer de mama para proporcionar información de pronóstico. Para este propósito es necesario corregir (normalizar) tanto las diferencias en la cantidad de RNA ensayada como la variabilidad en la calidad del RNA utilizado. Por tanto, el ensayo mide e incorpora típicamente la expresión de ciertos genes de normalización, que incluyen genes internos bien conocidos, tales como GAPDH y Cyp1. Alternativamente, la normalización puede basarse en la señal media o mediana (Ct) de la totalidad de los genes ensayados o una gran subserie de los mismos (enfoque de normalización global). Sobre una base de gen por gen, la cantidad medida normalizada de mRNA del tumor de un paciente se compara con la cantidad encontrada en una serie de referencia de tejido del cáncer de mama. El número (N) de tejidos de cáncer de mama en esta serie de referencia debería ser suficientemente alto para asegurar que las diferentes series de referencia (como un todo) se comportan esencialmente de igual manera. Si se cumple esta condición, la identidad de los tejidos de cáncer de mama individuales presentes en una serie particular no tendrá un impacto significativo sobre las cantidades relativas de los genes ensayados. Usualmente, la serie de referencia de tejidos de cáncer de mama consiste en al menos aproximadamente 30, con preferencia al menos aproximadamente 40 especímenes de tejido de cáncer de mama FPE diferentes. A no ser que se indique otra cosa, los niveles de expresión normalizados para cada mRNA/tumor testado/paciente se expresarán como un porcentaje del nivel de expresión medido en la serie de referencia. De modo más específico, la serie de referencia de un número suficientemente alto (v.g. 40) de tumores produce una distribución de niveles normalizados de cada especie de mRNA. El nivel medido en una muestra de tumor particular a analizar cae en cierto percentil dentro de este intervalo, el cual puede ser determinado por métodos bien conocidos en la técnica. A continuación, a no ser que se indique otra cosa, la referencia a los niveles de expresión de un gen supone expresión normalizada con relación a la serie de referencia, aunque esto no siempre se indica explícitamente.

Detalles adicionales de la invención se describirán en el ejemplo no limitante siguiente.

Ejemplo

Un Estudio en Fase II de la Expresión Génica en 79 Tumores de Mama Malignos

Se diseñó y condujo un estudio de expresión de genes con el objetivo primario de caracterizar molecularmente la expresión de genes en muestras de tejido incrustadas en parafina y fijadas de carcinoma ductal invasivo de mama, y explorar la correlación entre tales perfiles moleculares y la supervivencia sin enfermedad.

Diseño del Estudio

Se realizaron ensayos moleculares sobre tejidos de tumor de mama primario incrustados en parafina y fijados con formalina, obtenidos de 79 pacientes individuales diagnosticados con cáncer de mama invasivo. Todos los pacientes en el estudio presentaban 10 o más ganglios positivos. La edad media era 57 años, y el tamaño medio de los tumores clínicos era 4,4 cm. Los pacientes se incluyeron en el estudio únicamente si la evaluación histopatológica, realizada como se describe en la sección de Materiales y Métodos, indicaba cantidades adecuadas de tejido tumoral y patología homogénea.

Materiales y Métodos

Cada bloque representativo de tumor se caracterizó por histopatología estándar para diagnóstico, evaluación semi-cuantitativa de la cantidad de tumor, y grado del tumor. Un total de 6 secciones (de 10 micrómetros de espesor cada una) se prepararon y pusieron en dos tubos de microcentrifuga de la marca Costar (polipropileno, tubos de 1,7 ml, transparentes; 3 secciones en cada tubo). Si el tumor constituía menos del 30% del área total del espécimen, la muestra puede haber sido disecada toscamente por el patólogo, utilizando microdissección gruesa, e introduciendo el tejido tumoral directamente en el tubo Costar.

Si se obtuvo más de un bloque de tumor como parte del procedimiento quirúrgico, se utilizó para el análisis el bloque más representativo de la patología.

Análisis de la Expresión Génica

Se extrajo el mRNA y se purificó a partir de muestras de tejido fijadas e incrustadas en parafina, y se preparó para el análisis de la expresión génica como se describe en la sección 9 anterior.

Los ensayos moleculares de la expresión génica cuantitativa se realizaron por RT-PCR, utilizando el Sistema de Detección de Secuencia™ ABI PRISM 7900™ (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). El ABI PRISM 7900™ se compone de un termociclador, láser, dispositivo acoplador de carga (CCD), cámara y computadora. El sistema amplifica las muestras en un formato de 384 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por el láser se recoge en tiempo real mediante cables de fibra óptica para la totalidad de los 384 pocillos, y se detecta en el CCD. El sistema incluye software para operación del instrumento y para el análisis de los datos.

Análisis y Resultados

Se analizó el tejido tumoral para 185 genes relacionados con el cáncer y 7 genes de referencia. Los valores umbrales de ciclo (CE) para cada paciente se normalizaron basados en la mediana de los 7 genes de referencia para dicho paciente particular. Los datos de resultados clínicos estaban disponibles para todos los pacientes a partir de una revisión de los datos de registro y de gráficos de paciente seleccionados.

Los resultados se clasificaron como:

0 murieron debido a cáncer de mama o a causa desconocida o sobreviven con recurrencia de cáncer de mama;

1 sobreviven sin recurrencia de cáncer de mama o murieron debido a una causa distinta del cáncer de mama

El análisis se realizó por:

1. Análisis de la relación entre la expresión génica normalizada y los desenlaces binarios de 0 ó 1.
2. Análisis de la relación entre la expresión génica normalizada y el tiempo hasta el acontecimiento (0 ó 1 como se ha definido arriba) donde se confirmaron los pacientes que sobrevivían sin recurrencia del cáncer de mama o que murieron debido a una causa distinta del cáncer de mama. Este enfoque se utilizó para evaluar el impacto de pronóstico de genes individuales así como de series de genes múltiples.

Análisis de Pacientes con Carcinoma de Mama Invasivo por Enfoque Binario

En el primer enfoque (binario), el análisis se realizó sobre la totalidad de los 79 pacientes con carcinoma de mama invasivo. Se realizó un test t sobre los grupos de pacientes clasificados como sin recurrencia y sin muerte relacionada con cáncer de mama al cabo de 3 años, frente a recurrencia, o muerte relacionada con cáncer de mama al cabo de 3 años, y se calcularon los valores p para diferencias entre los grupos para cada gen.

La Tabla 1 enumera los 47 genes para los cuales el valor p para las diferencias entre los grupos era $< 0,10$. La primera columna de valores medios de expresión se refiere a pacientes que no tenían una recurrencia metastásica o no murieron de cáncer de mama. La segunda columna de valores medios de expresión se refiere a pacientes que o bien tenían una recurrencia metastásica o murieron de cáncer de mama.

TABLA 1

	Media	Media	Valor t	df	p	N válido	N válido
Bcl2	-0.15748	-1.22816	4.00034	75	0.000147	35	42
PR	-2.67225	-5.49747	3.61540	75	0.000541	35	42
IGF1R	-0.59390	-1.71506	3.49158	75	0.000808	35	42
BAG1	0.18844	-0.68509	3.42973	75	0.000985	35	42
CD68	-0.52275	0.10983	-3.41186	75	0.001043	35	42
EstR1	-0.35581	-3.00699	3.32190	75	0.001384	35	42
CTSL	-0.64894	-0.09204	-3.26781	75	0.001637	35	42
IGFBP2	-0.81181	-1.78398	3.24158	75	0.001774	35	42
GATA3	1.80525	0.57428	3.15608	75	0.002303	35	42
TP53BP2	-4.71118	-6.09289	3.02888	75	0.003365	35	42
EstR1	3.67801	1.64693	3.01073	75	0.003550	35	42
CEGP1	-2.02566	-4.25537	2.85620	75	0.005544	35	42
SURV	-3.67493	-2.96982	-2.70544	75	0.008439	35	42
p27	0.80789	0.28807	2.55401	75	0.012678	35	42
Chk1	-3.37981	-2.80389	-2.46979	75	0.015793	35	42
BBC3	-4.71789	-5.62957	2.46019	75	0.016189	35	42
ZNF217	1.10038	0.62730	2.42282	75	0.017814	35	42
EGFR	-2.88172	-2.20556	-2.34774	75	0.021527	35	42
CD9	1.29955	0.91025	2.31439	75	0.023386	35	42
MYBL2	-3.77489	-3.02193	-2.29042	75	0.024809	35	42
HIF1A	-0.44248	0.03740	-2.25950	75	0.026757	35	42
GRB7	-1.96063	-1.05007	-2.25801	75	0.026854	35	42
pS2	-1.00691	-3.13749	2.24070	75	0.028006	35	42
RIZ1	-7.62149	-8.38750	2.20226	75	0.030720	35	42
ErbB3	-6.89508	-7.44326	2.16127	75	0.033866	35	42
TOP2B	0.45122	0.12665	2.14616	75	0.035095	35	42
MDM2	1.09049	0.69001	2.10967	75	0.038223	35	42
PRAME	-6.40074	-7.70424	2.08126	75	0.040823	35	42
GUS	-1.51683	-1.89280	2.05200	75	0.043661	35	42
RAD51C	-5.85618	-6.71334	2.04575	75	0.044288	35	42
AIB1	-3.08217	-2.28784	-2.00600	75	0.048462	35	42
STK15	-3.11307	-2.59454	-2.00321	75	0.048768	35	42
GAPDH	-0.35829	-0.02292	-1.94326	75	0.055737	35	42
FHIT	-3.00431	-3.67175	1.86927	75	0.065489	35	42
KRT19	2.52397	2.01694	1.85741	75	0.067179	35	42
TS	-2.83607	-2.29048	-1.83712	75	0.070153	35	42
GSTM1	-3.69140	-4.38623	1.83397	75	0.070625	35	42
G-Catenin	0.31875	-0.15524	1.80823	75	0.074580	35	42
AKT2	0.78858	0.46703	1.79276	75	0.077043	35	42
CCNB1	-4.26197	-3.51628	-1.78803	75	0.077810	35	42
PI3KC2A	-2.27401	-2.70265	1.76748	75	0.081215	35	42
FBXO5	-4.72107	-4.24411	-1.75935	75	0.082596	35	42
DR5	-5.80850	-6.55501	1.74345	75	0.085353	35	42
CIAP1	-2.81825	-3.09921	1.72480	75	0.088683	35	42
MCM2	-2.87541	-2.50683	-1.72061	75	0.089445	35	42
CCND1	1.30995	0.80905	1.68794	75	0.095578	35	42
EIF4E	-5.37657	-6.47156	1.68169	75	0.096788	35	42

- 5 En la Tabla 1 que antecede, los valores t negativos indican mayor expresión, asociada con desenlaces peores e, inversamente, los valores t mayores (positivos) mayor indican expresión asociada con mejores desenlaces. Así, por ejemplo, la expresión elevada del gen CD68 (valor t = -3,41, CT medio de vivos < CT medio de fallecidos) indica una probabilidad reducida de supervivencia sin enfermedad. Análogamente, la expresión elevada del gen BC12 (valor t = 4,00; CT medio de vivos > CT medio de fallecidos) indica una probabilidad incrementada de supervivencia sin enfermedad.
- 10

Basándose en los datos indicados en la tabla 1, la expresión de cualquiera de los genes siguientes en el cáncer de

mama por encima de un umbral de expresión definido indica una probabilidad reducida de supervivencia sin recurrencia de cáncer después de la cirugía: Grb7, CD68, CTSL, Chk1, Her2, STK15, AIB1, SURV, EGFR, MYBL2, HIF 1 α .

- 5 Basándose en los datos indicados en la Tabla 1, la expresión de cualquiera de los genes siguientes en el cáncer de mama por encima de un umbral de expresión definido indica un mejor pronóstico para supervivencia sin recurrencia de cáncer de mama después de cirugía: TP53BP2, PR, Bcl2, KRT14, EstR1, IGFBP2, BAG1, CEGP1, KLK10, β -Catenina, GSTM1, FHIT, Rizl, IGF1, BBC3, IGFR1, TBP, p27, IRS1, IGF1R, GATA3, CEGP1, ZNF217, CD9, pS2, ErbB3, TOP2B, MDM2, RAD51, y KRT19.

Análisis de los Pacientes ER-positivos por Enfoque Binario

- 10 57 pacientes con CT normalizado para el receptor de estrógenos (ER) > 0 (es decir, pacientes ER-positivos) se sometieron a análisis separado. Se realizó un test t sobre los dos grupos de pacientes clasificados como sin recurrencia y sin muerte relacionada con cáncer de mama al cabo de 3 años, o con recurrencia o muerte relacionada con cáncer de mama a los 3 años, y se calcularon los valores p para las diferencias entre los grupos para cada gen. La Tabla 2, siguiente, enumera los genes en los cuales el valor p para las diferencias entre los grupos era < 0,105. La primera
- 15 columna de valores medios de expresión se refiere a pacientes que no tenían recurrencia metastásica ni murieron por cáncer de mama. La segunda columna de valores medios de expresión se refiere a pacientes que o bien padecían una recurrencia de metástasis o murieron por cáncer de mama.

TABLA 2

20		Media	Media	Valor t	df	p	N válido	N válido
	IGF1R	-0.13975	-1.00435	3.65063	55	0.000584	30	27
	Bcl2	0.15345	-0.70480	3.55488	55	0.000786	30	27
	CD68	-0.54779	0.19427	-3.41818	55	0.001193	30	27
	HNF3A	0.39617	-0.63802	3.20750	55	0.002233	30	27
	CTSL	-0.66726	0.00354	-3.20692	55	0.002237	30	27
	TP53BP2	-4.81858	-6.44425	3.13698	55	0.002741	30	27
	GATA3	2.33386	1.40803	3.02958	55	0.003727	30	27
	BBC3	-4.54979	-5.72333	2.91943	55	0.005074	30	27
	RAD51C	-5.63363	-6.94841	2.85475	55	0.006063	30	27
	BAG1	0.31087	-0.50669	2.61524	55	0.011485	30	27
	IGFBP2	-0.49300	-1.30983	2.59121	55	0.012222	30	27
	FBXO5	-4.86333	-4.05564	-2.56325	55	0.013135	30	27
	EstR1	0.68368	-0.66555	2.56090	55	0.013214	30	27
	PR	-1.89094	-3.86602	2.52803	55	0.014372	30	27
	SURV	-3.87857	-3.10970	-2.49622	55	0.015579	30	27
	CD9	1.41691	0.91725	2.43043	55	0.018370	30	27
	RB1	-2.51662	-2.97419	2.41221	55	0.019219	30	27
	EPHX1	-3.91703	-5.85097	2.29491	55	0.025578	30	27
	CEGP1	-1.18600	-2.95139	2.26608	55	0.027403	30	27
	CCNB1	-4.44522	-3.35763	-2.25148	55	0.028370	30	27
	TRAIL	0.34893	-0.56574	2.20372	55	0.031749	30	27
	EstR1	4.60346	3.60340	2.20223	55	0.031860	30	27
	DR5	-5.71827	-6.79088	2.14548	55	0.036345	30	27
	MCM2	-2.96800	-2.48458	-2.10518	55	0.039857	30	27
	Chk1	-3.46968	-2.85708	-2.08597	55	0.041633	30	27
	p27	0.94714	0.49656	2.04313	55	0.045843	30	27
	MYBL2	-3.97810	-3.14837	-2.02921	55	0.047288	30	27
	GUS	-1.42486	-1.82900	1.99758	55	0.050718	30	27

P53	-1.08810	-1.47193	1.92087	55	0.059938	30	27
HIF1A	-0.40925	0.11688	-1.91278	55	0.060989	30	27
cMet	-6.36835	-5.58479	-1.88318	55	0.064969	30	27
EGFR	-2.95785	-2.28105	-1.86840	55	0.067036	30	27
MTA1	-7.55365	-8.13656	1.81479	55	0.075011	30	27
RIZ1	-7.52785	-8.25903	1.79518	55	0.078119	30	27
ErbB3	-6.62488	-7.10826	1.79255	55	0.078545	30	27
TOP2B	0.54974	0.27531	1.74888	55	0.085891	30	27
EIF4E	-5.06603	-6.31426	1.68030	55	0.098571	30	27
TS	-2.95042	-2.36167	-1.67324	55	0.099959	30	27
STK15	-3.25010	-2.72118	-1.64822	55	0.105010	30	27

Para cada gen, se utilizó un algoritmo de clasificación a fin de identificar el mejor valor umbral (CT) para utilizar cada gen aisladamente en la predicción del desenlace clínico.

- 5 Basándose en la serie de datos indicados en la Tabla 2, la expresión de los genes siguientes en el cáncer ER-positivo por encima de un nivel de expresión definido es indicativa de una probabilidad reducida de supervivencia sin recurrencia de cáncer después de cirugía: CD68; CTSL; FBX05; SURV; CCNB1; MCM2; Chk1; MYBL2; HIF1A; cMET; EGFR; TS; STK15. Muchos de estos genes (CD68, CTSL, SURV, CCNB1, MCM2, Chk1, MYBL2, EGFR, y STK15) se identificaron también como indicadores de mal pronóstico en el análisis previo, que no estaba limitado al cáncer de mama ER-positivo. Basándose en la serie de datos indicada en la Tabla 2, la expresión de los genes siguientes en el
- 10 cáncer ER-positivo por encima de un nivel de expresión definido es indicativa de un mejor pronóstico para la supervivencia sin recurrencia de cáncer después de cirugía: IGFR1; BC12; HNF3A; TP53BP2; GATA3; BBC3; RAD51C; BAG1; IGFBP2; PR; CD9; RB1; EPHX1; CEGP1; TRAIL; DR5; p27; p53; MTA; RIZ1; ErbB3; TOP2B; EIF4E. De los últimos genes, IGFR1; BC12; TP53BP2; GATA3; BBC3; RAD51C; BAG1; IGFBP2; PR; CD9; CEGP1; DR5; p27; RIZ1; ErbB3; TOP2B; EIF4E se han identificado también como indicadores de buen pronóstico en el análisis
- 15 previo, no limitado a cáncer de mama ER-positivo.

Análisis de pacientes ER-negativos por enfoque binario

- Veinte pacientes con CT normalizado para receptor de estrógenos (ER) < 1,6 (es decir, pacientes ER-negativos) se sometieron a análisis separado. Se realizó un test t sobre los dos grupos de pacientes clasificados como sin recurrencia y sin muerte relacionada con cáncer de mama a los 3 años, o con recurrencia o muerte relacionada con cáncer de
- 20 mama a los 3 años, y se calcularon los valores p para las diferencias entre los grupos para cada gen. La Tabla 3 enumera los genes en los cuales el valor p para las diferencias entre los grupos era < 0,118. La primera columna de valores de expresión media se refiere a pacientes que no presentaban una recurrencia metastásica ni murieron por cáncer de mama. La segunda columna de valores de expresión media se refiere a pacientes que o bien presentaban una recurrencia metastásica o murieron por cáncer de mama.

25

TABLA 3

	Media	Media	Valor t	df	p	N válido	N válido
KRT14	-1.95323	-6.69231	4.03303	18	0.000780	5	15
KLK10	-2.68043	-7.11288	3.10321	18	0.006136	5	15
CCND1	-1.02285	0.03732	-2.77992	18	0.012357	5	15
Upa	-0.91272	-0.04773	-2.49460	18	0.022560	5	15
HNF3A	-6.04780	-2.36469	-2.43148	18	0.025707	5	15
Maspin	-3.56145	-6.18678	2.40169	18	0.027332	5	15
CDH1	-3.54450	-2.34984	-2.38755	18	0.028136	5	15
HER2	-1.48973	1.53108	-2.35826	18	0.029873	5	15
GRB7	-2.55289	0.00036	-2.32890	18	0.031714	5	15
AKT1	-0.36849	0.46222	-2.29737	18	0.033807	5	15
TGFA	-4.03137	-5.67225	2.28546	18	0.034632	5	15
FRP1	1.45776	-1.39459	2.27884	18	0.035097	5	15
STMY3	-1.59610	-0.26305	-2.23191	18	0.038570	5	15
Contig 27882	-4.27585	-7.34338	2.18700	18	0.042187	5	15
A-Catenin	-1.19790	-0.39085	-2.15624	18	0.044840	5	15
VDR	-4.37823	-2.37167	-2.15620	18	0.044844	5	15
GRO1	-3.65034	-5.97002	2.12286	18	0.047893	5	15
MCM3	-3.86041	-5.55078	2.10030	18	0.050061	5	15
B-actin	4.69672	5.19190	-2.04951	18	0.055273	5	15
HIF1A	-0.64183	-0.10566	-2.02301	18	0.058183	5	15
MMP9	-8.90613	-7.35163	-1.88747	18	0.075329	5	15
VEGF	0.37904	1.10778	-1.87451	18	0.077183	5	15
PRAME	-4.95855	-7.41973	1.86668	18	0.078322	5	15
AIB1	-3.12245	-1.92934	-1.86324	18	0.078829	5	15
KRT5	-1.32418	-3.62027	1.85919	18	0.079428	5	15
KRT18	1.08383	2.25369	-1.83831	18	0.082577	5	15
KRT17	-0.69073	-3.56536	1.78449	18	0.091209	5	15
P14ARF	-1.87104	-3.36534	1.63923	18	0.118525	5	15

Basándose en la serie de datos indicados en la Tabla 3, la expresión de los genes siguientes en el cáncer ER-negativo por encima de un nivel de expresión definido es indicativa de una probabilidad reducida de supervivencia sin recurrencia de cáncer ($p < 0.05$): CCND1; UPA; HNF3A; CDH1; Her2; GRB7; AKT1; STMY3; α -Catenina; VDR; GRO1. Únicamente 2 de estos genes (Her2 y Grb7) se identificaron también como indicadores de mal pronóstico en el análisis previo, no limitado a cáncer de mama ER-negativo. Basándose en la serie de datos indicada en la Tabla 3, la expresión de los genes siguientes en el cáncer ER-negativo por encima de un nivel de expresión definido es indicativa de un mejor pronóstico para supervivencia sin recurrencia de cáncer (KT14; KLK10; Maspin, TGF α , y FRP1). De los últimos genes, únicamente KLK10 ha sido identificado como indicador de buen pronóstico en el análisis previo, no limitado a cáncer de mama ER-negativo.

Análisis de genes múltiples e indicadores de desenlace

Se emprendieron dos enfoques a fin de determinar si la utilización de genes múltiples podría proporcionar mejor discriminación entre los desenlaces.

En primer lugar, se realizó un análisis de discriminación utilizando un enfoque gradual directo. Se generaron modelos que clasificaban el desenlace con mayor discriminación que la obtenida con cualquier gen individual solo.

De acuerdo con un segundo enfoque (enfoque de tiempo hasta el acontecimiento), se definió para cada gen un modelo de Riesgo Proporcional de Cox (véase, v.g., Cox, D.R., y Oakes, D. (1984), *Analysis of Survival Data*, Chapman and Hall, Londres, Nueva York) con el tiempo hasta recurrencia o muerte como variable dependiente, y el nivel de expresión del gen como la variable independiente. Se identificaron los genes que tienen un valor $p < 0.10$ en el modelo de Cox. Para cada gen, el modelo de Cox proporciona el riesgo relativo (RR) de recurrencia o muerte para un cambio unidad en la expresión del gen. Puede seleccionarse distribuir los pacientes en subgrupos para cualquier valor umbral de la expresión medida (en la escala CT), en la cual todos los pacientes con valores de expresión superiores al umbral presentan mayor riesgo, y todos los pacientes con valores de expresión inferiores al umbral presentan un riesgo menor, o viceversa, dependiendo de si el gen es un indicador de pronóstico malo ($RR > 1.01$) o bueno ($RR < 1.01$). Así, cualquier valor umbral definirá subgrupos de pacientes con riesgo respectivamente incrementado o reducido. Los desenlaces se resumen en la Tabla 4. La tercera columna, con el encabezamiento: exp(coef) muestra los valores RR.

TABLA 4

Gen	coef	exp(coef)	se(coef)	z	p
TP53BP2	-0.21892	0.803386	0.068279	-3.20625	0.00134
GRB7	0.235697	1.265791	0.073541	3.204992	0.00135
PR	-0.10258	0.90251	0.035864	-2.86018	0.00423
CD68	0.465623	1.593006	0.167785	2.775115	0.00552
Bcl2	-0.26769	0.765146	0.100785	-2.65603	0.00791
KRT14	-0.11892	0.887877	0.046938	-2.53359	0.0113
PRAME	-0.13707	0.871912	0.054904	-2.49649	0.0125
CTSL	0.431499	1.539564	0.185237	2.329444	0.0198
EstR1	-0.07686	0.926018	0.034848	-2.20561	0.0274
Chk1	0.284466	1.329053	0.130823	2.174441	0.0297
IGFBP2	-0.2152	0.806376	0.099324	-2.16669	0.0303
HER2	0.155303	1.168011	0.072633	2.13818	0.0325
BAG1	-0.22695	0.796959	0.106377	-2.13346	0.0329
CEGP1	-0.07879	0.924236	0.036959	-2.13177	0.033
STK15	0.27947	1.322428	0.132762	2.105039	0.0353
KLK10	-0.11028	0.895588	0.05245	-2.10248	0.0355
B.Catenin	-0.16536	0.847586	0.084796	-1.95013	0.0512
EstR1	-0.0803	0.922842	0.042212	-1.90226	0.0571
GSTM1	-0.13209	0.876266	0.072211	-1.82915	0.0674
TOP2A	-0.11148	0.894512	0.061855	-1.80222	0.0715
AIB1	0.152968	1.165288	0.086332	1.771861	0.0764
FHIT	-0.15572	0.855802	0.088205	-1.7654	0.0775
RIZ1	-0.17467	0.839736	0.099464	-1.75609	0.0791
SURV	0.185784	1.204162	0.106625	1.742399	0.0814
IGF1	-0.10499	0.900338	0.060482	-1.73581	0.0826
BBC3	-0.1344	0.874243	0.077613	-1.73163	0.0833
IGF1R	-0.13484	0.873858	0.077889	-1.73115	0.0834
DIABLO	0.284336	1.32888	0.166556	1.707148	0.0878
TBP	-0.34404	0.7089	0.20564	-1.67303	0.0943
p27	-0.26002	0.771033	0.1564	-1.66256	0.0964
IRS1	-0.07585	0.926957	0.046096	-1.64542	0.0999

Los análisis binarios y de tiempo hasta el acontecimiento, con pocas excepciones, identificaban los mismos genes como marcadores de pronóstico. Por ejemplo, la comparación de las Tablas 1 y 4 muestra que 10 genes estaban representados en los 15 primeros genes en ambas listas. Adicionalmente, cuando ambos análisis identificaban el mismo gen a $[p < 0.10]$, lo que ocurría para 21 genes, los mismos eran siempre concordantes con respecto a la dirección (signo positivo o negativo) de la correlación con supervivencia/recurrencia. Globalmente, estos resultados respaldan la conclusión de que los marcadores identificados tienen valor de pronóstico significativo.

Para los modelos de Cox que comprenden más de dos genes (modelos multivariante), se realiza la entrada escalonada de cada gen individual en el modelo, donde el primer gen introducido se preselecciona de entre aquellos genes que tienen valores p univariantes significativos, y el gen seleccionado para entrada en el modelo en cada paso subsiguiente es el gen que mejora óptimamente el ajuste del modelo a los datos. Este análisis puede realizarse con cualquier número total de genes. En el análisis cuyos resultados se muestran a continuación, la entrada escalonada se realizó para hasta 10 genes.

El análisis multivariante se realiza utilizando la ecuación siguiente:

$RR = \exp[\text{coef}(\text{genA}) \times \text{Ct}(\text{genA}) + \text{coef}(\text{genB}) \times \text{Ct}(\text{genB}) + \text{coef}(\text{genC}) \times \text{Ct}(\text{genC}) + \dots]$.

En esta ecuación, los coeficientes para los genes que son indicadores de desenlace favorable son números positivos y los coeficientes para los genes que son indicadores de desenlace desfavorable son números negativos. Los valores "Ct" en la ecuación son ΔCt s, es decir reflejan la diferencia entre el valor Ct medio normalizado para una población y el valor Ct normalizado medido para el paciente en cuestión. La convención utilizada en el análisis presente ha sido que los ΔCt s por debajo y por encima del valor medio de la población tienen signos positivos y signos negativos, respectivamente (reflejando mayor o menor abundancia de mRNA). El riesgo relativo (RR) calculado por resolución de esta ecuación indicará si el paciente tiene una probabilidad aumentada o reducida de supervivencia a largo plazo sin recurrencia de cáncer.

10 Análisis multivariante de genes de 79 pacientes con carcinoma de mama invasivo

Se realizó un análisis multivariante escalonado, utilizando el Modelo de Riesgo Proporcional de Cox, sobre los datos de expresión génica obtenidos para el total de 79 pacientes con carcinoma de mama invasivo. Por este análisis se han identificado las series de 10 genes siguientes como genes que tienen valor predictivo particularmente fuerte de supervivencia del paciente:

- 15 (a) TP53BP2, Bcl2, BAD, EPHX1, PDGFR β , DIABLO, XIAP, YB1, CA9, y KRT8.
- (b) GRB7, CD68, TOP2A, Bcl2, DIABLO, CD3, ID1, PPM1D, MCM6, y WISP1.
- (c) PR, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, IGFBP2, TIMP1, CA9, MMP9, y COX2.
- (d) CD68, GRB7, TOP2A, Bcl2, DIABLO, CD3, ID1, PPM1D, MCM6, y WISP1.
- (e) Bcl2, TP53BP2, BAD, EPHX1, PDGFR β , DIABLO, XIAP, YB1, CA9, y KRT8.
- 20 (f) KRT14, KRT5, PRAME, TP53BP2, GUS1, AIB1, MCM3, CCNE1, MCM6, y ID1.
- (g) PRAME, TP53BP2, EstR1, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, BBC3, y VEGFB.
- (h) CTSL2, GRB7, TOP2A, CCNB1, Bcl2, DIABLO, PRAME, EMS1, CA9, y EpCAM.
- (i) EstR1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, BBC3, y VEGFB.
- (k) Chk1, PRAME, p53BP2, GRB7, CA9, CTSL, CCNB1, TOP2A, tamaño del tumor, e IGFBP2.
- 25 (l) IGFBP2, GRB7, PRAME, DIABLO, CTSL, β -Catenina, PPM1D, Chk1, WISP1, y LOT1.
- (m) HER2, TP53BP2, Bcl2, DIABLO, TIMP1, EPHX1, TOP2A, TRAIL, CA9, y AREG.
- (n) BAG1, TP53BP2, PRAME, IL6, CCNB1, PAI1, AREG, tamaño del tumor, CA9, y Ki67.
- (o) CEGP1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, STK15, y AKT2, y FGF 18.
- (p) STK15, TP53BP2, PRAME, IL6, CCNE1, AKT2, DIABLO, cMet, CCNE2, y COX2.
- 30 (q) KLK10, EstR1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, y BBC3.
- (r) AIB1, TP53BP2, Bcl2, DIABLO, TIMP1, CD3, p53, CA9, GRB7, y EPHX1
- (s) BBC3, GRB7, CD68, PRAME, TOP2A, CCNB1, EPHX1, CTSL GSTM1, y APC.
- (t) CD9, GRB7, CD68, TOP2A, Bcl2, CCNB1, CD3, DIABLO, ID1, y PPM1D.
- (w) EGFR, KRT14, GRB7, TOP2A, CCNB1, CTSL, Bcl2, TP, KLK10, y CA9.
- 35 (x) HIF1 α , PR, DIABLO, PRAME, Chk1, AKT2, GRB7, CCNE1, TOP2A, y CCNB1.
- (y) MDM2, TP53BP2, DIABLO, Bcl2, AIB1, TIMP1, CD3, p53, CA9, y HER2.
- (z) MYBL2, TP53BP2, PRAME, IL6, Bcl2, DIABLO, CCNE1, EPHX1, TIMP1, y CA9.
- (aa) p27, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, STK15, AKT2, e ID1.
- (ab) RAD51, GRB7, CD68, TOP2A, CIAP2, CCNB1, BAG1, IL6, FGFR1, y TP53BP2.
- 40 (ac) SURV, GRB7, TOP2A, PRAME, CTSL, GSTM1, CCNB1, VDR, CA9, y CCNE2.
- (ad) TOP2B, TP53BP2, DIABLO, Bcl2, TIMP1, AIB1, CA9, p53, KRT8, y BAD.
- (ae) ZNF217, GRB7, p53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, APC4, y β -Catenina..

Si bien la presente invención se ha descrito con referencia a lo que se considera son las realizaciones específicas, debe entenderse que la invención no está limitada a tales realizaciones. Por el contrario, la invención se limita exclusivamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Tabla 5B

SURV NM_001168 TGTTTTGATTCGCGGCTTACGAGGTGAGAGTGAAGGAGGAAGAGGAGTGTGCGCTTTTGCTAGAGCTGACAGCTTGG
 TBP NM_003194 GCGCGAAACGCCGAATATAATCCCAAGCGSTTTGCTGCGTAATCATGAGGATAGAGAGGCCAG
 TQFA NM_003235 GGTGTGCGCAGACACCTTCTGCTACTTGGCTGTAATGACCTGTGCGAGCTTTTGTGCGGCTTCAAAAGTGTGCAAGAACTCGGT
 TIMP1 NM_003254 TCCCTGCGGGTCCAGATAGCCTGAATCCTGCGCGGAGTGGAACTGGAAGCTGACAGCTGTCCACCGTGTCCGAG
 TOP2A NM_001097 AATCCAAAGGGGAGAGTGATGACTTCCATATGGAATTGACTGACGCTGTGGCTGCTGCGGCAAAATCTGTAC
 TOP2B NM_001098 TGTGGACATCTTCCCTCAGACTTGGCTACTGAGCCACCTTCTGCTGACGAAACCGTGGGCTAG
 TP NM_001853 CTATATGCGAGCCAGAGATGTGACAGGCCACCGTGGAGAGCTGCGCACTCATCAGAGCTCCATTCTCAGTAAGAAACTCGTGG
 TP53BP1 NM_005423 GCGCCAAATATTGAGAACTTTTATATCAGAGGACCCATATGCGGCTATGGAGAGCATCTGCTGCGCATCATACCCATCC
 TRAIL NM_003810 CTTACAGTGTCTCCTGCACTGCTCTGTGTGCGCTGTAACTTACGCTGTACTTTACCAACGAGCTGAAGCAGATG
 TS NM_001071 GCGTGGGTGTGCGCTTCAACATCGCCAGCTACGCGCTGCTCAGCTACATGATTGCGGCATCAGG
 UPA NM_002658 GTGGAATGTGCGCTGAAGGACAAGCCAGCGCTCTACAGAGATCTGACACTTCTTACCGTGGATCCGCAQ
 VDR NM_000375 GCGCTGGATTTCAGAAAGAGCCAGGTCTGAGATCTGGGACCGCTTCTGCTGCTTCCCTGCGCTGTGAAT
 VEGF NM_003375 CTGCTGTCTTGGGTGCATTGGAGCGCTTGGCTTGGCTGCTTACCTCCACCATGCCAAGTGTGCCAGGCTGG
 VEGFB NM_003377 TGACGATGGCTGGAGTGTGTGCCACCTGGGCGAGTCCCAAGTCCGATGCGAGTCCCAAGTGTGCCAGGCTGG
 WIF1 NM_003682 AGAGGATCCATGAATTCACACTTGGCGGCTGCTCAGCAGCTGCTATCAACCCAACTGCTGGAGTTTG
 XIAP NM_001167 GCGATTGGAAGACAGGAAAGTATCCCAATTGCAAGATTTTCAACCGCTTTTATCTTCAAAATAGTCCAGCGCA
 YB-1 NM_001959 AGACTGTGGACTTGTATGTTGTGAAGGAGAAAGCGCTGCGGAGGAGCAAACTTACAGCTCTGCTGTGTGCTCC
 ZNF217 NM_006525 ACCCAGTAGCAAGGAGAGGCCACTCACTGCTCGGAGTSCGGCAAACTTTTCAAGAGTACCCAGAGCTG

Gen	Acceso	Nombre de sonda	Sec	lon
AIB1	NM_006534	S1994/AIB1.f3	GCGGCGAGTTTCCGATTTA	19
AIB1	NM_006534	S1995/AIB1.r3	TGAGTCCACCATCCAGCAAGT	21
AIB1	NM_006534	S5055/AIB1.p3	ATGGCGCGCGGAGGATCAAAA	21
AKT1	NM_005163	S0010/AKT1.f3	CGCTTCTATGGCGCTGAGAT	20
AKT1	NM_005163	S0012/AKT1.r3	TCCCGGTACACCACGTTCTT	20
AKT1	NM_005163	S4776/AKT1.p3	CAGCCCTGGACTACCTGCACCTCGG	24
AKT2	NM_001626	S0828/AKT2.f3	TCCTGCCACCCCTTCAAACC	19
AKT2	NM_001626	S0829/AKT2.r3	GCGCGTAAATTCATCATCGAA	21
AKT2	NM_001626	S4727/AKT2.p3	CAGGTACAGTCCGAGGTGACACA	24
APC	NM_000038	S0022/APC.f4	GGACAGCAGGAATGTGTTTC	20
APC	NM_000038	S0024/APC.r4	ACCCACTCGATTTGTTTCTG	20
APC	NM_000038	S4888/APC.p4	CATTGGCTCCCCGTGACCTGTA	22
AREG	NM_001657	S0025/AREG.f2	TGTGAGTGAAATGCCTTCTAGTAGTA	27
AREG	NM_001657	S0027/AREG.r2	TTGTGGTTCGTTATCATACTCTTCTGA	27
AREG	NM_001657	S4889/AREG.p2	CCGTCTCTGGGAGCCGACTATGA	23
B-actin	NM_001101	S0034/B-acti.f2	CAGCAGATGTGGATCAGCAAG	21
B-actin	NM_001101	S0036/B-acti.r2	GCATTTGCGGTGGACGAT	18
B-actin	NM_001101	S4730/B-acti.p2	AGGAGATGACGAGTCCGGCCCC	23
B-Catenin	NM_001904	S2150/B-Cate.f3	GGCTCTTGTGCGTACTGCTCT	22
B-Catenin	NM_001904	S2151/B-Cate.r3	TCAGATGACGAAGAGCACAGATG	23
B-Catenin	NM_001904	S5046/B-Cate.p3	AGGCTCAGTGTATGCTTCCCTGTCAACG	29
BAD	NM_032989	S2011/BAD.f1	GGGTGAGGTGCCTCGAGAT	19
BAD	NM_032989	S2012/BAD.r1	CTGCTCACTCGGCTCAAACTC	21
BAD	NM_032989	S5058/BAD.p1	TGGGCCAGAGCATGTTCCAGATC	24
BAG1	NM_004323	S1386/BAG1.f2	CGTTGTCAGCACTTGGAAATACAA	23
BAG1	NM_004323	S1387/BAG1.r2	GTTCAACCTCTTCTGTGGACTGT	24
BAG1	NM_004323	S4731/BAG1.p2	CCCAATTAACATGACCCGCAACCAT	26
BBC3	NM_014417	S1584/BBC3.f2	CCTGGAGGGTCTGTACAAT	20
BBC3	NM_014417	S1585/BBC3.r2	CTAATTGGGCTCCATCTCG	19
BBC3	NM_014417	S4890/BBC3.p2	CATCATGGGACTCCTGCCCTTACC	24
Bcl2	NM_000633	S0043/Bcl2.f2	CAGATGGACCTAGTACCCACTGAGA	25
Bcl2	NM_000633	S0045/Bcl2.r2	CCTATGATTTAAGGGCATTTTTC	24
Bcl2	NM_000633	S4732/Bcl2.p2	TTCCACGCGGAAGGACAGCGAT	22
CA9	NM_001216	S1388/CA9.f3	ATCCTAGCCCTGGTTTTTG	20
CA9	NM_001216	S1399/CA9.r3	CTGCCCTTCTCATCTGCACAA	20
CA9	NM_001216	S4938/CA9.p3	TTTGCTGTCAACAGCGTCCG	20
CCNB1	NM_031966	S1720/CCNB1.f2	TTCAAGTTGTTGAGGAGAC	20
CCNB1	NM_031966	S1721/CCNB1.r2	CATCTTCTTGGGCACACAAT	20
CCNB1	NM_031966	S4733/CCNB1.p2	TGTCTCCATTATTGATCGGTTTCATGCA	27
CCND1	NM_001758	S0058/CCND1.f3	GCATGTTCTGTGGCTCTAAGA	21
CCND1	NM_001758	S0060/CCND1.r3	CGGTGTAGATGCACAGCTTCTC	22
CCND1	NM_001758	S4985/CCND1.p3	AAGGAGACCATCCCCCTGACGGC	23
CCNE1	NM_001238	S1446/CCNE1.f1	AAAGAAGATGATGACCGGGTTTAC	24
CCNE1	NM_001238	S1447/CCNE1.r1	GAGCCTCTGGATGGTGCAAT	20
CCNE1	NM_001238	S4944/CCNE1.p1	CAAACTCAACGTGCAAGCCTCGGA	24
CCNE2	NM_057749	S1458/CCNE2.f2	ATGCTGTGGCTCCTTCTAACT	22
CCNE2	NM_057749	S1459/CCNE2.r2	ACCCAAATGTGATATACAAAAGGTT	27
CCNE2	NM_057749	S4945/CCNE2.p2	TACCAAGCAACCTACATGTCAAGAAAGCCC	30
CD3z	NM_000734	S0064/CD3z.f1	AGATGAAGTGAAGGCGCTT	20
CD3z	NM_000734	S0066/CD3z.r1	TGCTCTGTAAATCGGCAACTG	21
CD3z	NM_000734	S4988/CD3z.p1	CACCGCGGCCATCCTGCA	18
CD68	NM_001251	S0067/CD68.f2	TGTTCCCAAGCCCTGTGT	18
CD68	NM_001251	S0069/CD68.r2	CTCCTCCACCCCTGGGTTGT	19
CD68	NM_001251	S4734/CD68.p2	CTCCAAGCCAGATTGAGATTCGAGTCA	28
CD9	NM_001769	S0685/CD9.f1	GGCGTGGAACAGTTTATCT	20
CD9	NM_001769	S0687/CD9.r1	CACGGTGAAGGTTTTCGAGT	19
CD9	NM_001769	S4792/CD9.p1	AGACATCTGCCCAAGAAAGGACGT	24
CDH1	NM_004360	S0073/CDH1.f3	TGAGTGTCCCGGTATCTTC	21
CDH1	NM_004360	S0075/CDH1.r3	CAGCCGCTTTCAGATTTTCAT	21
CDH1	NM_004360	S4990/CDH1.p3	TGCCAATCCGATGAAATTGGAAATTT	27
CEGP1	NM_020974	S1494/CEGP1.f2	TGACAATCAGCACACCTGCAT	21

CEGP1	NM_020974	S1495/CEGP1.r2	TGTGACTACAGCCGTGATCCTTA	23
CEGP1	NM_020974	S4735/CEGP1.p2	CAGGCCCTCTTCCGAGCGGT	20
Chk1	NM_001274	S1422/Chk1.f2	GATAAATTGGTACAAGGGATCAGCTT	26
Chk1	NM_001274	S1423/Chk1.r2	GGGTGCCAAGTAACTGACTATTCA	24
Chk1	NM_001274	S4941/Chk1.p2	CCAGCCCACATGTCTGATCATATGC	26
CIAP1	NM_001166	S0764/CIAP1.f2	TGCCTGTGGTGGGAAGCT	18
CIAP1	NM_001166	S0765/CIAP1.r2	GGAAAATGCCTCCGGTGT	19
CIAP1	NM_001166	S4802/CIAP1.p2	TGACATAGCATCATCCTTTGGTTCCCAGTT	30
clAP2	NM_001165	S0076/clAP2.f2	GGATATTTCCGTGGCTCTTATTCA	24
clAP2	NM_001165	S0078/clAP2.r2	CTTCTCATCAAGGCAGAAAAATCTT	25
clAP2	NM_001165	S4991/clAP2.p2	TTCATCATCAAATCCTGTAACTCCAGAGCA	30
cMet	NM_000245	S0082/cMet.f2	GACATTTCCAGTCCCTGCAGTCA	22
cMet	NM_000245	S0084/cMet.r2	CTCCGATCGCACACATTTGT	20
cMet	NM_000245	S4993/cMet.p2	TGCCTCTCTGCCCCACCTTTGT	23
Contig 27882	AK000618	S2633/Contig.f3	GGCATCCTGGCCCCAAAGT	18
Contig 27882	AK000618	S2634/Contig.r3	GACCCCTCAGCTGGTAGTTG	21
Contig 27882	AK000618	S4977/Contig.p3	CCCAAATCCAGCGGCTAGAGGC	23
COX2	NM_000963	S0088/COX2.f1	TCTGCAGAGTTGGAAGCACTCTA	23
COX2	NM_000963	S0090/COX2.r1	GCCGAGGCTTTTCTACCAGAA	21
COX2	NM_000963	S4995/COX2.p1	CAGGATACAGCTCCACAGCATCGATGTC	28
CTSL	NM_001912	S1303/CTSL.f2	GGGAGGCTTATCTCACTGAGTGA	23
CTSL	NM_001912	S1304/CTSL.r2	CCATTGCAGCCTTCATTGC	19
CTSL	NM_001912	S4899/CTSL.p2	TTGAGGCCAGAGCAGTCTACCAGATTCT	29
CTSL2	NM_001333	S4354/CTSL2.f1	TGTCTCACTGAGCGAGCAGAA	21
CTSL2	NM_001333	S4355/CTSL2.r1	ACCATTGCAGCCCTGATTG	19
CTSL2	NM_001333	S4356/CTSL2.p1	CTTGAGGACGCGAACAGTCCACCA	24
DAPK1	NM_004938	S1768/DAPK1.f3	CGCTGACATCATGAATGTTCT	22
DAPK1	NM_004938	S1769/DAPK1.r3	TCTCTTTCAAGCAACGATGTGTCTT	24
DAPK1	NM_004938	S4927/DAPK1.p3	TCATATCCAAACTCGCTCCAGCCG	25
DIABLO	NM_019887	S0808/DIABLO.f1	CACAATGGCGGCTCTGAAG	19
DIABLO	NM_019887	S0809/DIABLO.r1	ACACAAACACTGTCTGTACCTGAAGA	26
DIABLO	NM_019887	S4813/DIABLO.p1	AAGTTACGCTGCGCGACAGCCAA	23
DR5	NM_003842	S2551/DR5.f2	CTCTGAGACAGTGCTTCGATGACT	24
DR5	NM_003842	S2552/DR5.r2	CCATGAGGCCCAACTTCT	19
DR5	NM_003842	S4979/DR5.p2	CAGACTTGGTGCCCTTTGACTCC	23
EGFR	NM_005228	S0103/EGFR.f2	TGTCGATGGACTTCCAGAAC	20
EGFR	NM_005228	S0105/EGFR.r2	ATTGGGACAGCTTGGATCA	19
EGFR	NM_005228	S4999/EGFR.p2	CACCTGGGCAGCTGCCAA	18
EIF4E	NM_001968	S0106/EIF4E.f1	GATCTAAGATGGCGACTGTGCGAA	23
EIF4E	NM_001968	S0108/EIF4E.r1	TTAGATTCCGTTTTCTCTCTTCTG	25
EIF4E	NM_001968	S5000/EIF4E.p1	ACCACCCCTACTCCTAATCCCCGACT	27
EMS1	NM_005231	S2663/EMS1.f1	GGCAGTGTCACTGAGTCCTTGA	22
EMS1	NM_005231	S2664/EMS1.r1	TGCACTGTGCGTCCCAAT	18
EMS1	NM_005231	S4956/EMS1.p1	ATCCTCCCCTGCCCGCG	18
EpCAM	NM_002354	S1807/EpCAM.f1	GGGCCCTCCAGAACAAATGAT	20
EpCAM	NM_002354	S1808/EpCAM.r1	TGCACTGCTTGGCCTTAAAGA	21
EpCAM	NM_002354	S4984/EpCAM.p1	CCGCTCTCATCGCAGTCAGGATCAT	25
EPHX1	NM_000120	S1865/EPHX1.f2	ACCGTAGGCTCTGCTCTGAA	20
EPHX1	NM_000120	S1866/EPHX1.r2	TGGTCCAGGTGGAAACTTC	20
EPHX1	NM_000120	S4754/EPHX1.p2	AGGCAGCCAGACCCACAGGA	20
ErbB3	NM_001982	S0112/ErbB3.f1	CGTTATGTCTATGCCAGATACAC	23
ErbB3	NM_001982	S0114/ErbB3.r1	GAAGTGAGACCCACTGAAGAAAGG	24
ErbB3	NM_001982	S5002/ErbB3.p1	CCTCAAAGGTAATCCCTCCTCCCGG	25
EstR1	NM_000125	S0115/EstR1.f1	CGTGGTGCCCTCTATGAC	19
EstR1	NM_000125	S0117/EstR1.r1	GGCTAGTGGGCGCATGTAG	19
EstR1	NM_000125	S4737/EstR1.p1	CTGGAGATGCTGGACGCCC	19
FBXO5	NM_012177	S2017/FBXO5.r1	GGATTGTAGACTGTCACCGAAATTC	25
FBXO5	NM_012177	S2018/FBXO5.f1	GGCTATTCTCTATTTCTCTACAAAGTG	28
FBXO5	NM_012177	S5061/FBXO5.p1	CCTCCAGGAGGCTACCTTCTTCATGTTCA	30
FGF18	NM_003862	S1665/FGF18.f2	CGGTAGTCAAGTCCGGATCAA	21
FGF18	NM_003862	S1666/FGF18.r2	GCTTGCCCTTTCGCGTTCA	18
FGF18	NM_003862	S4914/FGF18.p2	CAAGGAGACGGAATTCTACCTGTGC	25

FGFR1	NM_023109	S0818/FGFR1.f3	CACGGGACATTACCACATC	20
FGFR1	NM_023109	S0819/FGFR1.r3	GGGTGCCATCCACTTCACA	19
FGFR1	NM_023109	S4816/FGFR1.p3	ATAAAAAGACAACCAACGGCCGACTGC	27
FHIT	NM_002012	S2443/FHIT.f1	CCAGTGGAGCGCTTCCAT	18
FHIT	NM_002012	S2444/FHIT.r1	CTCTCTGGGTCGTCTGAAACAA	22
FHIT	NM_002012	S2445/FHIT.p1	TCGGCCACTTCATCAGGACGCAG	23
FHIT	NM_002012	S4921/FHIT.p1	TCGGCCACTTCATCAGGACGCAG	23
FRP1	NM_003012	S1804/FRP1.f3	TTGGTACCTGTGGGTTAGCA	20
FRP1	NM_003012	S1805/FRP1.r3	CACATCCAAATGCAAACCTGG	20
FRP1	NM_003012	S4983/FRP1.p3	TCCCCAGGGTAGAATTCAATCAGAGC	26
G-Catenin	NM_002230	S2153/G-Cate.f1	TCAGCAGCAAGGGCATCAT	19
G-Catenin	NM_002230	S2154/G-Cate.r1	GGTGGTTTTCTTGAGCGTGACT	23
G-Catenin	NM_002230	S5044/G-Cate.p1	CGCCCGCAGGCCTCATCCT	19
GAPDH	NM_002046	S0374/GAPDH.f1	ATTCCACCCATGGCAAATTC	20
GAPDH	NM_002046	S0375/GAPDH.r1	GATGGGATTTCCATTGATGACA	22
GAPDH	NM_002046	S4738/GAPDH.p1	CCGTCTCAGCCTTGACGGTGC	22
GATA3	NM_002051	S0127/GATA3.f3	CAAGGAGCTCACTGTGGTGCT	23
GATA3	NM_002051	S0129/GATA3.r3	GAGTCAGAATGGCTTATTCACAGATG	26
GATA3	NM_002051	S5005/GATA3.p3	TGTTCCAACCACTGAATCTGGACC	24
GRB7	NM_005310	S0130/GRB7.f2	CCATCTGCATCCATCTTGTT	20
GRB7	NM_005310	S0132/GRB7.r2	GGCCACCAGGGTATTATCTG	20
GRB7	NM_005310	S4726/GRB7.p2	CTCCCCACCCTTGAGAAGTGCT	23
GRO1	NM_001511	S0133/GRO1.f2	CGAAAAGATGCTGAACAGTGACA	23
GRO1	NM_001511	S0135/GRO1.r2	TCAGGAACAGCCACCAGTGA	20
GRO1	NM_001511	S5006/GRO1.p2	CTTCCTCCTCCCTTCTGGTCAGTTGGAT	28
GSTM1	NM_000561	S2026/GSTM1.r1	GGCCCAGCTTGAATTTTCA	20
GSTM1	NM_000561	S2027/GSTM1.f1	AAGCTATGAGGAAAAGAAGTACACGAT	27
GSTM1	NM_000561	S4739/GSTM1.p1	TCAGCCACTGGCTTCTGTCTAATCAGGAG	30
GUS	NM_000181	S0139/GUS.f1	CCCCTCAGTAGCCAAGTCA	20
GUS	NM_000181	S0141/GUS.r1	CACGCAGGTGGTATCAGTCT	20
GUS	NM_000181	S4740/GUS.p1	TCAAGTAAACGGGCTGTTTTCCAAACA	27
HER2	NM_004448	S0142/HER2.f3	CGGTGTGAGAAAGTGCAGCAA	20
HER2	NM_004448	S0144/HER2.r3	CTCTCGCAAGTGCTCCAT	19
HER2	NM_004448	S4729/HER2.p3	CCAGACCATAGCACACTCGGGCAC	24
HIF1A	NM_001530	S1207/HIF1A.f3	TGAACATAAAGCTGCAACATGGA	24
HIF1A	NM_001530	S1208/HIF1A.r3	TGAGGTTGGTTACTGTTGGTATCATATA	28
HIF1A	NM_001530	S4753/HIF1A.p3	TTGCACTGCACAGGCCACATTAC	24
HNF3A	NM_004496	S0148/HNF3A.f1	TTCAGGATGTTAGGAAGTGAAG	24
HNF3A	NM_004496	S0150/HNF3A.r1	GCGTGTCTGCGTAGTAGCTGTT	22
HNF3A	NM_004496	S5008/HNF3A.p1	AGTCGCTGGTTTCATGCCCTTCCA	24
ID1	NM_002165	S0820/ID1.f1	AGAACCGCAAGGTGAGCAA	19
ID1	NM_002165	S0821/ID1.r1	TCCAAGTGAAGGTCCCTGATG	21
ID1	NM_002165	S4832/ID1.p1	TGGAGATTCTCCAGCACGTATCGAC	26
IGF1	NM_000618	S0154/IGF1.f2	TCCGGAGCTGTGATCTAAGGA	21
IGF1	NM_000618	S0156/IGF1.r2	CGGACAGAGCGAGCTGACTT	20
IGF1	NM_000618	S5010/IGF1.p2	TGTATTGCGCACCCCTCAAGCCTG	24
IGF1R	NM_000875	S1249/IGF1R.f3	GCATGGTAGCCGAAGATTTC	21
IGF1R	NM_000875	S1250/IGF1R.r3	TTTCCGGTAATAGTCTGTCTCATAGATATC	30
IGF1R	NM_000875	S4895/IGF1R.p3	CGCGTCATACCAAAATCTCCGATTTTGA	28
IGFBP2	NM_000597	S1128/IGFBP2.f1	GTGGACAGCACCATGAACA	19
IGFBP2	NM_000597	S1129/IGFBP2.r1	CCTTCATACCCGACTTGAGG	20
IGFBP2	NM_000597	S4837/IGFBP2.p1	CTTCCGGCCAGCACTGCCTC	20
IL6	NM_000600	S0760/IL6.f3	CCTGAACCTTCCAAAGATGG	20
IL6	NM_000600	S0761/IL6.r3	ACCAGGCAAGTCTCCTCATT	20
IL6	NM_000600	S4800/IL6.p3	CCAGATTGGAAGCATCCATCTTTTCA	27
IRS1	NM_005544	S1943/IRS1.f3	CCACAGCTCACCTTCTGTCA	20
IRS1	NM_005544	S1944/IRS1.r3	CCTCAGTGCCAGTCTCTTCC	20
IRS1	NM_005544	S5050/IRS1.p3	TCCATCCAGCTCCAGCCAG	20
KI-67	NM_002417	S0436/KI-67.f2	CGGACTTTGGGTGCGACTT	19
KI-67	NM_002417	S0437/KI-67.r2	TTACAACTCTTCCACTGGGACGAT	24
KI-67	NM_002417	S4741/KI-67.p2	CEACTTGTCGAACCAACCGCTCGT	23
KLK10	NM_002776	S2624/KLK10.f3	GCCAGAGGCTCCATCGT	18

KLK10	NM_002776	S2625/KLK10.r3	CAGAGGTTTGAACAGTGCAGACA	23
KLK10	NM_002776	S4978/KLK10.p3	CCTCTTCCTCCCCAGTCGGCTGA	23
KRT14	NM_000526	S1853/KRT14.f1	GGCCTGCTGAGATCAAAGAC	20
KRT14	NM_000526	S1854/KRT14.r1	GTCCACTGTGGCTGTGAGAA	20
KRT14	NM_000526	S5037/KRT14.p1	TGTTCCCTCAGGTCCTCAATGGTCTTG	26
KRT17	NM_000422	S0172/KRT17.f2	CGAGGATTGGTTCTTCAGCAA	21
KRT17	NM_000422	S0174/KRT17.r2	ACTCTGCACCAGCTCACTGTTG	22
KRT17	NM_000422	S5013/KRT17.p2	CACCTCGCGGTTCACTTCCTCTGT	24
KRT18	NM_000224	S1710/KRT18.f2	AGAGATCGAGGCTCTCAAGG	20
KRT18	NM_000224	S1711/KRT18.r2	GGCCTTTTACTTCCTCTTCG	20
KRT18	NM_000224	S4762/KRT18.p2	TGGTTCTTCTTCATGAAGAGCAGCTCC	27
KRT19	NM_002276	S1515/KRT19.f3	TGAGCGGCAGAAATCAGGAGTA	21
KRT19	NM_002276	S1516/KRT19.r3	TGCGGTAGGTGGCAATCTC	19
KRT19	NM_002276	S4866/KRT19.p3	CTCATGGACATCAAGTCGCGGCTG	24
KRT5	NM_000424	S0175/KRT5.f3	TCAGTGGAGAAGGAGTTGGA	20
KRT5	NM_000424	S0177/KRT5.r3	TGCCATATCCAGAGGAAACA	20
KRT5	NM_000424	S5015/KRT5.p3	CCAGTCAACATCTCTGTTGTACAAGCA	28
KRT8	NM_002273	S2588/KRT8.f3	GGATGAAGCTTACATGAACAAGGTAGA	27
KRT8	NM_002273	S2589/KRT8.r3	CATATAGCTGCCTGAGGAAGTTGAT	25
KRT8	NM_002273	S4952/KRT8.p3	CGTCGGTCAGCCCTTCCAGGC	21
LOT1 variant 1	NM_002656	S0692/LOT1 v.f2	GGAAAGACCACCTGAAAAACCA	22
LOT1 variant 1	NM_002656	S0693/LOT1 v.r2	GTACTTCTTCCCACACTCCTCACA	24
LOT1 variant 1	NM_002656	S4793/LOT1 v.p2	ACCCACGACCCCAACAAATGGC	23
Maspin	NM_002639	S0836/Maspin.f2	CAGATGGCCACTTTGAGAACATT	23
Maspin	NM_002639	S0837/Maspin.r2	GGCAGCATTAAACCACAAGGATT	22
Maspin	NM_002639	S4835/Maspin.p2	AGCTGACAACAGTGTGAACGACCAGACC	28
MCM2	NM_004526	S1602/MCM2.f2	GACTTTTGCCCGCTACCTTTC	21
MCM2	NM_004526	S1603/MCM2.r2	GCCACTAACTGCTTCAGTATGAAGAG	26
MCM2	NM_004526	S4900/MCM2.p2	ACAGCTCATTGTTGTACGCGCGGA	24
MCM3	NM_002388	S1524/MCM3.f3	GGAGAACAAATCCCCTTGAGA	20
MCM3	NM_002388	S1525/MCM3.r3	ATCTCCTGGATGGTGATGGT	20
MCM3	NM_002388	S4870/MCM3.p3	TGGCCTTTCTGTCTACAAGGATCACCA	27
MCM6	NM_005915	S1704/MCM6.f3	TGATGGTCTATGTGTACATTCA	24
MCM6	NM_005915	S1705/MCM6.r3	TGGGACAGGAAACACACCAA	20
MCM6	NM_005915	S4919/MCM6.p3	CAGGTTTCATACCAACACAGGCTTCAGCAC	30
MDM2	NM_002392	S0830/MDM2.f1	CTACAGGGACGCCATCGAA	19
MDM2	NM_002392	S0831/MDM2.r1	ATCCAACCAATCACCTGAATGTT	23
MDM2	NM_002392	S4834/MDM2.p1	CTTACACCAGCATCAAGATCCGG	23
MMP9	NM_004994	S0656/MMP9.f1	GAGAACCAATCTCACCAGCA	20
MMP9	NM_004994	S0657/MMP9.r1	CACCCGAGTGTAACCATAGC	20
MMP9	NM_004994	S4760/MMP9.p1	ACAGGTATTCTCTGCCAGCTGCC	24
MTA1	NM_004689	S2369/MTA1.f1	CCGCCCTCACCTGAAGAGA	19
MTA1	NM_004689	S2370/MTA1.r1	GGAATAAGTTAGCCGCGCTTCT	22
MTA1	NM_004689	S4855/MTA1.p1	CCCAGTGTCCGCCAAGGAGCG	21
MYBL2	NM_002466	S3270/MYBL2.f1	GCCGAGATCGCCAAGATG	18
MYBL2	NM_002466	S3271/MYBL2.r1	CTTTTGATGGTAGAGTTCCAGTGATTC	27
MYBL2	NM_002466	S4742/MYBL2.p1	CAGCATTGTCTGTCTCCCTGGCA	24
P14ARF	S78535	S2842/P14ARF.f1	CCCTCGTGCTGATGCTACT	19
P14ARF	S78535	S2843/P14ARF.r1	CATCATGACCTGGTCTTCTAGG	22
P14ARF	S78535	S4971/P14ARF.p1	CTGCCCTAGACGCTGGCTCCTC	22
p27	NM_004064	S0205/p27.f3	CGGTGGACCACGAAGAGTTAA	21
p27	NM_004064	S0207/p27.r3	GGCTCGCCTCTTCCATGTC	19
p27	NM_004064	S4750/p27.p3	CCGGGACTTGAGAAAGCACTGCA	23
P53	NM_000546	S0208/P53.f2	CTTTGAACCCTTGCTTGCAA	20
P53	NM_000546	S0210/P53.r2	CCCGGGACAAAGCAAATG	18
P53	NM_000546	S5065/P53.p2	AAGTCCTGGGTGCTTCTGACGCACA	25
PAI1	NM_000602	S0211/PAI1.f3	CCGCAACGTGGTTTTCTCA	19
PAI1	NM_000602	S0213/PAI1.r3	TGCTGGGTTTCTCCTCCTGTT	21
PAI1	NM_000602	S5066/PAI1.p3	CTCGGTGTTGGCCATGCTCCAG	22
PDGFRb	NM_002609	S1346/PDGFRb.f3	CCAGCTCTCCTCCAGCTAC	20
PDGFRb	NM_002609	S1347/PDGFRb.r3	GGGTGGCTCTCACTTAGCTC	20
PDGFRb	NM_002609	S4931/PDGFRb.p3	ATCAATGTCCCTGTCCGAGTGCTG	24

PI3KC2A	NM_002645	S2020/PI3KC2.r1	CACACTAGCATTTTCTCCGCATA	23
PI3KC2A	NM_002645	S2021/PI3KC2.f1	ATACCAATCACCGCACAAACC	21
PI3KC2A	NM_002645	S5062/PI3KC2.p1	TGCGCTGTGACTGGACTTAACAAATAGCCT	30
PPM1D	NM_003620	S3159/PPM1D.f1	GCCATCCGCAAAGGCTTT	18
PPM1D	NM_003620	S3160/PPM1D.r1	GGCCATTCCGCCAGTTTC	18
PPM1D	NM_003620	S4856/PPM1D.p1	TCGCTTGTACCTTGCCATGTGG	23
PR	NM_000926	S1336/PR.f6	GCATCAGGCTGTCTATTATGG	20
PR	NM_000926	S1337/PR.r6	AGTAGTTGTGCTGCCCTTCC	20
PR	NM_000926	S4743/PR.p6	TGTCCTTACCTGTGGGAGCTGTAAGGTC	28
PRAME	NM_006115	S1985/PRAME.f3	TCTCCATATCTGCCTTGCAAGT	23
PRAME	NM_006115	S1986/PRAME.r3	GCACGTGGGTGAGATTGCT	19
PRAME	NM_006115	S4756/PRAME.p3	TCCTGCAGCACCTCATCGGGCT	22
pS2	NM_003225	S0241/pS2.f2	GCCCTCCCAGTGTGCAAAAT	19
pS2	NM_003225	S0243/pS2.r2	CGTCGATGGTATTAGGATAGAAGCA	25
pS2	NM_003225	S5026/pS2.p2	TGCTGTTTCGACGACACCGTTCC	23
RAD51C	NM_058216	S2606/RAD51C.f3	GAACCTCTTGAGCAGGAGCATACC	24
RAD51C	NM_058216	S2607/RAD51C.r3	TCCACCCCAAGAATATCATCTAGT	25
RAD51C	NM_058216	S4764/RAD51C.p3	AGGGCTTCATAATCACCTTCTGTTC	25
RB1	NM_000321	S2700/RB1.f1	CGAAGCCCTTACAAGTTTCC	20
RB1	NM_000321	S2701/RB1.r1	GGACTCTTCAGGGGTGAAAT	20
RB1	NM_000321	S4765/RB1.p1	CCCTTACGGATTCTGGAGGGAAC	24
RIZ1	NM_012231	S1320/RIZ1.f2	CCAGACGAGCGATTAGAAGC	20
RIZ1	NM_012231	S1321/RIZ1.r2	TCCTCTCTTCTCCTCCTC	20
RIZ1	NM_012231	S4761/RIZ1.p2	TGTGAGGTGAATGATTGGGGGA	23
STK15	NM_003600	S0794/STK15.f2	CATCTTCCAGGAGGACCACT	20
STK15	NM_003600	S0795/STK15.r2	TCCGACCTTCAATCATTTCA	20
STK15	NM_003600	S4745/STK15.p2	CTCTGTGGCACCTGGACTACCTG	24
STMY3	NM_005940	S2067/STMY3.f3	CCTGGAGGCTGCAACATACC	20
STMY3	NM_005940	S2068/STMY3.r3	TACAATGGCTTTGGAGGATAGCA	23
STMY3	NM_005940	S4746/STMY3.p3	ATCCTCTGAAGCCCTTTTCGCAGC	25
SURV	NM_001168	S0259/SURV.f2	TGTTTTGATTCCCGGGCTTA	20
SURV	NM_001168	S0261/SURV.r2	CAAAGCTGTGAGCTCTAGCAAAAG	24
SURV	NM_001168	S4747/SURV.p2	TGCCTTCTTCTCCTCCTCCTCACCT	28
TBP	NM_003194	S0262/TBP.f1	GCCCCAAACGCCGAATATA	19
TBP	NM_003194	S0264/TBP.r1	CGTGGCTCTCTTATCCTCATGAT	23
TBP	NM_003194	S4751/TBP.p1	TACCGCAGCAAACCGCTTGGG	21
TGFA	NM_003236	S0489/TGFA.f2	GGTGTGCCACAGACCTTCCT	20
TGFA	NM_003236	S0490/TGFA.r2	ACGGAGTTCTTGACAGAGTTTTGA	24
TGFA	NM_003236	S4768/TGFA.p2	TTGGCCTGTAATCACCTGTGCAGCCTT	27
TIMP1	NM_003254	S1695/TIMP1.f3	TCCCTGCGGTCCCAGATAG	19
TIMP1	NM_003254	S1696/TIMP1.r3	GTGGGAACAGGGTGGACACT	20
TIMP1	NM_003254	S4918/TIMP1.p3	ATCCTGCCCGGAGTGGAACTGAAGC	25
TOP2A	NM_001067	S0271/TOP2A.f4	AATCCAAGGGGGAGAGTGAT	20
TOP2A	NM_001067	S0273/TOP2A.r4	GTACAGATTTTGCCCGAGGA	20
TOP2A	NM_001067	S4777/TOP2A.p4	CATATGGACTTTGACTCAGCTGTGGC	26
TOP2B	NM_001068	S0274/TOP2B.f2	TGTGGACATCTTCCCCTCAGA	21
TOP2B	NM_001068	S0276/TOP2B.r2	CTAGCCCGACCGGTTCTGT	18
TOP2B	NM_001068	S4778/TOP2B.p2	TTCCTACTGAGCCACCTTCTCTG	24
TP	NM_001953	S0277/TP.f3	CTATATGCAGCCAGAGATGTGACA	24
TP	NM_001953	S0279/TP.r3	CCACGAGTTTCTTACTGAGAATGG	24
TP	NM_001953	S4779/TP.p3	ACAGCCTGCCACTCATCACAGCC	23
TP53BP2	NM_005426	S1931/TP53BP.f2	GGGCCAAATATTGAGAAGC	19
TP53BP2	NM_005426	S1932/TP53BP.r2	GGATGGGTATGATGGGACAG	20
TP53BP2	NM_005426	S5049/TP53BP.p2	CCACCATAGCGGCCATGGAG	20
TRAIL	NM_003810	S2539/TRAIL.f1	CTTCACAGTGCTCCTGCAGTCT	22
TRAIL	NM_003810	S2540/TRAIL.r1	CATCTGCTTCAGCTCGTTGGT	21
TRAIL	NM_003810	S4980/TRAIL.p1	AAGTACACGTAAGTTACAGCCACACA	26
TS	NM_001071	S0280/TS.f1	GCCTCGGTGTGCCCTTTCA	18
TS	NM_001071	S0282/TS.r1	CGTGATGTGCGCAATCATG	19
TS	NM_001071	S4780/TS.p1	CATCGCCAGCTACGCCCTGCTC	22
upa	NM_002658	S0283/upa.f3	GTGGATGTGCCCTGAAGGA	19
upa	NM_002658	S0285/upa.r3	CTGCGGATCCAGGGTAAGAA	20

Tabla 6F

upa	NM_002858	S4769/upa.p3	AAGCCAGGCGTCTACACGAGAGTCTCAC	28
VDR	NM_000376	S2745/VDR.f2	GCCCTGGATTTCAGAAAGAG	20
VDR	NM_000376	S2746/VDR.r2	AGTTACAAGCCAGGGAAGGA	20
VDR	NM_000376	S4962/VDR.p2	CAAGTCTGGATCTGGGACCCTTTCC	25
VEGF	NM_003376	S0286/VEGF.f1	CTGCTGTCTTGGGTGCATTG	20
VEGF	NM_003376	S0288/VEGF.r1	GCAGCCTGGGACCACTTG	18
VEGF	NM_003376	S4782/VEGF.p1	TTGCCTTGCTGCTCTACCTCCACCA	25
VEGFB	NM_003377	S2724/VEGFB.f1	TGACGATGGCCTGGAGTGT	19
VEGFB	NM_003377	S2725/VEGFB.r1	GGTACCGGATCATGAGGATCTG	22
VEGFB	NM_003377	S4960/VEGFB.p1	CTGGGCAGCACCAAGTCCGGA	21
WISP1	NM_003882	S1671/WISP1.f1	AGAGGCATCCATGAACTTCACA	22
WISP1	NM_003882	S1672/WISP1.r1	CAAACTCCACAGTACTTGGGTGA	24
WISP1	NM_003882	S4915/WISP1.p1	CGGGCTGCATCAGCACACGC	20
XIAP	NM_001167	S0289/XIAP.f1	GCAGTTGGAAGACACAGGAAAGT	23
XIAP	NM_001167	S0291/XIAP.r1	TGCGTGGCACTATTTTCAAGA	21
XIAP	NM_001167	S4752/XIAP.p1	TCCCAAATTGCAGATTTATCAACGGC	27
YB-1	NM_004559	S1194/YB-1.f2	AGACTGTGGAGTTTGATGTTGTTGA	25
YB-1	NM_004559	S1195/YB-1.r2	GGAACACCACCAGGACCTGTAA	22
YB-1	NM_004559	S4843/YB-1.p2	TTGCTGCCTCCGCACCCTTTTCT	23
ZNF217	NM_006526	S2739/ZNF217.f3	ACCCAGTAGCAAGGAGAAGC	20
ZNF217	NM_006526	S2740/ZNF217.r3	CAGCTGGTGGTAGGTTCTGA	20
ZNF217	NM_006526	S4961/ZNF217.p3	CACTCACTGCTCCGAGTGCGG	21

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENOMIC HEALTH, INC.
 Cobleigh, Melody
 5 Shak, Steven
 Baker, Joffre
 Cronin, Maureen
 <120> MARCADORES DE EXPRESIÓN GÉNICA PARA PROGNOSIS DEL CÁNCER DE MAMA
 10 <130> GHDX-008DIV2
 <140>
 <141>
 15 <150> US 13/221,549
 <151> 2011-08-30
 <150> US 12/478,632
 <151> 2009-06-04
 20 <150> US 10/758,307
 <151> 2004-01-14
 <150> US 60/440,861
 25 <151> 2003-01-15
 <160> 440
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 30 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <223> Amplicón
 35 <400> 1
 gcggcgagtt tccgatttaa agctgagctg cgaggaaaat ggcggcggga ggatcaaaat 60
 acttgctgga tgggtggactc a 81
 <210> 2
 <211> 71
 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 2

5 cgcttctatg gcgctgagat tgtgtcagcc ctggactacc tgcactcgga gaagaacgtg 60
gtgtaccggg a 71

<210> 3

<211> 71

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Amplicón

<400> 3

tcttgccacc ctccaacct caggtcacgt ccgaggtcga cacaaggtag ttcgatgatg 60
aatttaccgc c 71

<210> 4

15 <211> 69

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

20 <400> 4

ggacagcagg aatgtgtttc tccatacagg tcacggggag ccaatggttc agaaacaaat 60
cgagtgggt 69

<210> 5

<211> 82

<212> DNA

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 5

tgtgagtga atgccttcta gtagtgaacc gtcctcgga gccgactatg actactcaga 60
agagtatgat aacgaaccac aa 82

30 <210> 6

<211> 66

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

5 <400> 6

cagcagatgt ggatcagcaa gcaggagtat gacgagtcg gcccctccat cgtccaccgc 60
aatgc 66

<210> 7

<211> 80

<212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 7

ggctcttgtg cgtactgtcc ttcgggctgg tgacagggaa gacatcactg agcctgccat 60
ctgtgctctt cgtcatctga 80

15 <210> 8

<211> 73

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Amplicón

<400> 8

gggtcaggtg cctcgagatc gggcttgggc ccagagcatg ttccagatcc cagagtttga 60
gccgagtgag cag 73

<210> 9

<211> 81

25 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 9

30 cgttgtcagc acttgggaata caagatgggt gccgggtcat gttaattggg aaaaagaaca 60
gtccacagga agaggttgaa c 81

<210> 10

<211> 83

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Amplicón

<400> 10

```
cctggagggt cctgtacaat ctcacatgg gactcctgcc cttaccagg ggccacagag 60
cccccgagat ggagcccaat tag 83
```

<210> 11

<211> 73

10 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 11

```
cagatggacc tagtaccac tgagatttcc acgccgaagg acagcgatgg gaaaaatgcc 60
cttaaatcat agg 73
```

<210> 12

<211> 72

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Amplicón

<400> 12

```
atcctagccc tggtttttgg cctcctttt gctgtcacca gcgtcgcgtt ccttgtgcag 60
atgagaaggc ag 72
```

<210> 13

25 <211> 84

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

30 <400> 13

```
ttcaggttgt tgcaggagac catgtacatg actgtctcca ttattgatcg gttcatgcag 60
aataattgtg tgcccaagaa gatg 84
```

<210> 14

<211> 69

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Amplicón

<400> 14

gcatgttcgt ggcctctaag atgaaggaga ccatccccct gacggccgag aagctgtgca 60
tctacaccg 69

<210> 15

<211> 71

10 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicone

<400> 15

15 aaagaagatg atgaccgggt ttacccaaac tcaacgtgca agcctcggat tattgcacca 60
tccagaggct c 71

<210> 16

<211> 82

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Amplicón

<400> 16

atgctgtggc tccttcctaa ctggggcttt cttgacatgt aggttgcttg gtaataacct 60
ttttgtatat cacaatttgg gt 82

<210> 17

25 <211> 65

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

30 <400> 17

agatgaagtg gaaggcgctt ttcaccgcgg ccatcctgca ggcacagttg ccgattacag 60
aggca 65

<210> 18

<211> 74
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> Amplicón
 <400> 18
tggttcccag ccctgtgtcc acctccaagc ccagattcag attcgagtca tgtacacaac 60
ccaggggtgga ggag 74
 <210> 19
 <211> 64
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Amplicón
 <400> 19
gggcgtggaa cagtttatct cagacatctg cccaagaag gacgtactcg aaaccttcac 60
cgtg 64
 15 <210> 20
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Amplicón
 <400> 20
tgagtgtccc ccggtatctt ccccgccctg ccaatcccga tgaaattgga aattttattg 60
atgaaaaatct gaaagcggct g 81
 <210> 21
 25 <211> 77
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Amplicón
 30 <400> 21
tgacaatcag cacacctgca ttcaccgctc ggaagagggc ctgagctgca tgaataagga 60
tcacggctgt agtcaca 77
 <210> 22

<211> 82

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Amplicón

<400> 22

gataaattgg tacaagggat cagcttttcc cagcccatat gtcctgatca tatgcttttg 60
aatagtcagt tacttggcac cc 82

<210> 23

<211> 72

10 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 23

15 tgcctgtggt gggaagctca gtaactggga accaaaggat gatgctatgt cagaacaccg 60
gaggcatttt cc 72

<210> 24

<211> 86

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Amplicón

<400> 24

ggatatttcc gtggctctta ttcaaactct ccatcaaata ctgtaaactc cagagcaaat 60
caagattttt ctgccttgat gagaag 86

<210> 25

25 <211> 86

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

30 <400> 25

gacatttcca gtcctgcagt caatgcctct ctgccccacc ctttgttcag tgtggctggg 60
gccacgacaa atgtgtgcga tcggag 86

<210> 26

<211> 75

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Amplicón

<400> 26

ggcatcctgg cccaaagttt cccaaatcca ggcggctaga ggcccactgc ttcccaacta 60
ccagctgagg gggtc 75

<210> 27

10 <211> 79

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

15 <400> 27

tctgcagagt tggaaagcact ctatggtgac atcgatgctg tggagctgta tcctgccctt 60
ctggtagaaa agcctcggc 79

<210> 28

<211> 74

<212> DNA

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 28

gggaggctta tctcactgag tgagcagaat ctggtagact gctctgggcc tcaaggcaat 60
gaaggctgca atgg 74

25 <210> 29

<211> 67

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Amplicón

<400> 29

tgtctcactg agcgagcaga atctggtgga ctgttcgctg cctcaaggca atcagggctg 60
caatggt 67

<210> 30

<211> 77

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Amplicón

<400> 30

cgctgacatc atgaatgttc ctcgaccggc tggaggcgag tttggatatg acaaagacac 60
atcgttgctg aaagaga 77

<210> 31

10 <211> 73

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

15 <400> 31

cacaatggcg gctctgaaga gttggctgtc gcgcagcgta acttcattct tcaggtacag 60
acagtgtttg tgt 73

<210> 32

<211> 84

<212> DNA

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 32

ctctgagaca gtgcttcgat gactttgcag acttggtgcc ctttgactcc tgggagccgc 60
tcatgaggaa gttgggcctc atgg 84

25 <210> 33

<211> 62

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Amplicón

<400> 33

tgtcgaatga cttccagaac cacctgggca gctgccaaaa gtgtgatcca agctgtccca 60
at 62

<210> 34

<211> 82

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Amplicón

<400> 34

```
gatctaagat ggcgactgtc gaaccggaaa ccaccctac tcctaattcc ccgactacag 60
aagaggagaa aacggaatct aa 82
```

<210> 35

10 <211> 68

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

15 <400> 35

```
ggcagtgtca ctgagtcctt gaaatcctcc cctgccccgc gggctctctgg attgggacgc 60
acagtgca 68
```

<210> 36

<211> 75

<212> DNA

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 36

```
gggccctcca gaacaatgat gggctttatg atcctgactg cgatgagagc gggctcttta 60
aggccaagca gtgca 75
```

25 <210> 37

<211> 76

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Amplicón

<400> 37

accgtaggct ctgctctgaa tgactctcct gtgggtctgg ctgcctatat tctagagaag 60
ttttccacct ggacca 76

<210> 38

<211> 81

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 38

cggttatgtc atgccagata cacacctcaa aggtactccc tcttcccggg aaggcacctt 60
ttcttcagtg ggtctcagtt c 81

10 <210> 39

<211> 68

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Amplicón

<400> 39

cgtgggtgccc ctctatgacc tgctgctgga gatgctggac gcccaccgcc tacatgcgcc 60
cactagcc 68

<210> 40

<211> 90

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 40

ggctattcct cattttctct acaaagtggc ctcagtgaac atgaagaagg tagcctcctg 60
gaggagaatt tcggtgacag tctacaatcc 90

25 <210> 41

<211> 68

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Amplicón

<400> 41

cggtagtcaa gtccggatca agggcaagga gacggaattc tacctgtgca tgaaccgcaa 60
aggcaagc 68

<210> 42

<211> 74

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 42

cacgggacat tcaccacatc gactactata aaaagacaac caacggccga ctgcctgtga 60
agtggatggc accc 74

10 <210> 43

<211> 67

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Amplicone

<400> 43

ccagtggagc gcttccatga cctgcgtcct gatgaagtgg ccgatttggt tcagacgacc 60
cagagag 67

<210> 44

<211> 75

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 44

ttggtacctg tgggttagca tcaagttctc cccagggtag aattcaatca gagctccagt 60
ttgcatttgg atgtg 75

25 <210> 45

<211> 68

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Amplicón

<400> 45

tcagcagcaa gggcatcatg gaggaggatg aggcctgcgg gcgccagtac acgctcaaga 60
aaaccacc 68

<210> 46

<211> 74

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 46

10 attccacca tggcaaattc catggcaccg tcaaggctga gaacgggaag cttgtcatca 60
atggaaatcc catc 74

<210> 47

<211> 75

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Amplicón

<400> 47

caaaggagct cactgtggtg tctgtgttcc aaccactgaa tctggacccc atctgtgaat 60
aagccattct gactc 75

<210> 48

20 <211> 67

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

25 <400> 48

ccatctgcat ccatcttggt tgggctcccc acccttgaga agtgcctcag ataataccct 60
ggtggcc 67

<210> 49

<211> 73

<212> DNA

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 49

cgaaaagatg ctgaacagtg acaaattccaa ctgaccagaa gggaggagga agctcactgg 60
tggctgttcc tga 73

<210> 50

5 <211> 86

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

10 <400> 50

aagctatgag gaaaagaagt acacgatggg ggacgctcct gattatgaca gaagccagtg 60
gctgaatgaa aaattcaagc tgggcc 86

<210> 51

<211> 73

<212> DNA

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 51

cccactcagt agccaagtca caatgtttgg aaaacagccc gtttacttga gcaagactga 60
taccacctgc gtg 73

20 <210> 52

<211> 70

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Amplicón

<400> 52

cggtgtgaga agtgcagcaa gccctgtgcc cgagtgtgct atggtctggg catggagcac 60
ttgcgagagg 70

<210> 53

<211> 82

30 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 53

tgaacataaa gtctgcaaca tggaaggat tgcactgcac aggccacatt cacgtatatg 60
ataccaacag taaccaacct ca 82

5 <210> 54

<211> 73

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Amplicón

<400> 54

tccaggatgt taggaactgt gaagatggaa gggcatgaaa ccagcgactg gaacagctac 60
tacgcagaca cgc 73

<210> 55

<211> 70

15 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 55

20 agaaccgcaa ggtgagcaag gtggagattc tccagcacgt catcgactac atcagggacc 60
ttcagttgga 70

<210> 56

<211> 76

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Amplicón

<400> 56

tccggagctg tgatctaagg aggctggaga tgtattgcgc acccctcaag cctgccaaagt 60
cagctcgctc tgtccg 76

<210> 57

30 <211> 83

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 57

5 **gc**atggtagc **cga**agatttc **aca**gtcaaaa **t**cgagattt **tg**gtatgacg **cg**agatatct 60
atgagacaga **ct**attaccgg **aaa** 83

<210> 58

<211> 73

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Amplicón

<400> 58

gtggacagca **cca**tgaacat **gt**tgggctggg **gg**aggcagtg **ct**ggccggaa **gccc**ctcaag 60
tcgggtatga **agg** 73

<210> 59

15 <211> 72

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

20 <400> 59

cctgaacctt **cca**aagatgg **ct**gaaaaaga **tg**gatgcttc **ca**atctggat **tca**atgagga 60
gacttgctg **gt** 72

<210> 60

<211> 74

<212> DNA

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 60

ccacagctca **cct**tctgtca **ggt**gtccatc **cc**agctccag **cc**agctccca **gag**aggaaga 60
gactggcact **gagg** 74

30 <210> 61

<211> 80

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

5 <400> 61

cggacttttg gtgcgacttg acgagcggtg gttcgacaag tggccttgcg ggccgggatcg 60
tcccagtgga agagttgtaa 80

<210> 62

<211> 78

<212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 62

gcccagaggc tccatcgctc atcctcttcc tccccagtcg gctgaactct ccccttgctc 60
gcactgttca aacctctg 78

15 <210> 63

<211> 83

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Amplicón

<400> 63

ggcctgctga gatcaaagac tacagtcctt acttcaagac cattgaggac ctgaggaaca 60
agattctcac agccacagtg gac 83

<210> 64

<211> 73

25 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 64

cgaggatttg ttcttcagca agacagagga actgaaccgc gaggtggcca ccaacagtga 60
gctgggtgcag agt 73

30

<210> 65

<211> 68

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Amplicón

<400> 65

agagatcgag gctctcaagg aggagctgct cttcatgaag aagaaccacg aagaggaagt 60
aaaaggcc 68

<210> 66

<211> 77

10 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 66

15 tgagcggcag aatcaggagt accagcggct catggacatc aagtcgcggc tggagcagga 60
gattgccacc taccgca 77

<210> 67

<211> 69

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Amplicón

<400> 67

tcagtggaga aggagttgga ccagtcaaca tctctgttgt cacaagcagt gtttcctctg 60
gatatggca 69

<210> 68

25 <211> 86

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

30 <400> 68

ggatgaagct tacatgaaca aggtagagct ggagtctcgc ctggaagggc tgaccgacga 60
gatcaacttc ctcaggcagc tatatg 86

<210> 69

<211> 83

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Amplicón

<400> 69

ggaaagacca cctgaaaaac cacctccaga cccacgaccc caacaaaatg gcctttgggt 60
gtgaggagtg tgggaagaag tac 83

<210> 70

10 <211> 77

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

15 <400> 70

cagatggcca ctttgagaac attttagctg acaacagtgt gaacgaccag accaaaatcc 60
ttgtgggttaa tgctgcc 77

<210> 71

<211> 75

<212> DNA

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 71

gacttttgcc cgctaccttt cattccggcg tgacaacaat gagctgttgc tcttcatact 60
gaagcagtta gtggc 75

25 <210> 72

<211> 75

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Amplicón

<400> 72

ggagaacaat ccccttgaga cagaatatgg ctttctgtc tacaaggatc accagaccat 60
caccatccag gagat 75

<210> 73

<211> 82

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 73

tgatggctct atgtgtcaca ttcattcacag gtttcatacc aacacaggct tcagcacttc 60
ctttgggtgt tttcctgtcc ca 82

10 <210> 74

<211> 68

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Amplicón

<400> 74

ctacagggac gccatcgaat ccggatcttg atgctggtgt aagtgaacat tcaggtgatt 60
ggttggat 68

<210> 75

<211> 67

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 75

25 gagaaccaat ctcaccgaca ggcagctggc agaggaatac ctgtaccgct atggttacac 60
tcgggtg 67

<210> 76

<211> 77

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Amplicón

<400> 76

ccgccctcac ctgaagagaa acgcgctcct tggcggacac tgggggagga gaggaagaag 60
cgcggtaac ttattcc 77

<210> 77

<211> 74

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 77

gccgagatcg ccaagatggt gccagggagg acagacaatg ctgtgaagaa tcactggaac 60
tctaccatca aaag 74

10 <210> 78

<211> 72

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Amplicón

<400> 78

ccctcgtgct gatgctactg aggagccagc gtctagggca gcagccgctt cctagaagac 60
caggtcatga tg 72

<210> 79

<211> 66

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 79

cggtggacca cgaagagtta acccgggact tggagaagca ctgcagagac atggaagagg 60
cgagcc 66

25 <210> 80

<211> 68

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Amplicón

<400> 80

ctttgaaccc ttgcttgcaa taggtgtgcg tcagaagcac ccaggacttc catttgcttt 60
gtcccggg 68

<210> 81

<211> 81

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 81

ccgcaacgtg gttttctcac cctatggggt ggcctcgggt ttggccatgc tccagctgac 60
aacaggagga gaaaccagc a 81

10 <210> 82

<211> 66

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Amplicone

<400> 82

ccagctctcc ttccagctac agatcaatgt ccctgtccga gtgctggagc taagtgagag 60
ccaccc 66

<210> 83

<211> 83

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 83

ataccaatca ccgcacaaac ccaggctatt tggttaagtcc agtcacagcg caaagaaaca 60
tatgcggaga aaatgctagt gtg 83

25

<210> 84

<211> 62

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Amplicón

<400> 84

gccatccgca aaggctttct cgcttgctac cttgccatgt ggaagaaact ggcggaatgg 60
cc 62

<210> 85

<211> 85

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 85

gcacacaggct gtcattatgg tgccttacc tgtgggagct gtaaggctct ctttaagagg 60
gcaatggaag ggcagcacia ctact 85

10 <210> 86

<211> 66

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Amplicón

<400> 86

tctccatatt tgccttgacg agtctcctgc agcacctcat cgggctgagc aatctgaccc 60
acgtgc 66

<210> 87

<211> 86

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 87

25 gccctcccag tgtgcaaata agggctgctg ttctgacgac accgttcgtg gggctcccctg 60
gtgcttctat cctaatacca tcgacg 86

<210> 88

<211> 78

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Amplicón

<400> 88

gaacttcttg agcaggagca tacccagggc ttcataatca cttctgttc agcactagat 60
gatattcttg ggggtgga 78

<210> 89

<211> 77

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 89

cgaagccctt acaagtttcc tagttcaccc ttacggattc ctggagggaa catctatatt 60
tcaccctga agagtcc 77

10 <210> 90

<211> 74

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Amplicón

<400> 90

ccagacgagc gattagaagc ggcagcttgt gaggtgaatg atttggggga agaggaggag 60
gaggaagagg agga 74

<210> 91

<211> 69

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 91

25 catcttccag gaggaccact ctctgtggca ccctggacta cctgccccct gaaatgattg 60
aaggtcggg 69

<210> 92

<211> 90

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Amplicón

<400> 92

cctggaggct gcaacatacc tcaatcctgt cccaggccgg atcctcctga agcccttttc 60
gcagcactgc tatectccaa agccattgta 90

<210> 93

<211> 80

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 93

tgttttgatt cccgggctta ccagggtgaga agtgaggag gaagaagcca gtgtcccttt 60
tgctagagct gacagctttg 80

10 <210> 94

<211> 65

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Amplicón

<400> 94

gcccgaacg ccgaatataa tccaagcgg ttgctgcgg taatcatgag gataagagag 60
ccacg 65

<210> 95

<211> 83

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 95

ggtgtgccac agaccttcct acttggcctg taatcacctg tgcagccttt tgtgggcctt 60
caaaactctg tcaagaactc cgt 83

25

<210> 96

<211> 75

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Amplicón

<400> 96

tccctgcggt cccagatagc ctgaatcctg cccggagtgg aactgaagcc tgcacagtgt 60
ccaccctgtt cccac 75

<210> 97

<211> 72

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 97

10 aatccaaggg ggagagtgat gacttccata tggactttga ctgagctgtg gctcctcggg 60
caaaatctgt ac 72

<210> 98

<211> 66

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Amplicón

<400> 98

tgtggacatc ttccctcag acttcctac tgagccacct tctctgccac gaaccggtcg 60
ggctag 66

<210> 99

20 <211> 82

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

25 <400> 99

ctatatgcag ccagagatgt gacagccacc gtggacagcc tgccactcat cacagcctcc 60
attctcagta agaaactcgt gg 82

<210> 100

<211> 81

<212> DNA

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 100

gggccaaata ttcagaagct tttatatcag aggaccacca tagcggccat ggagaccatc 60
tctgtcccat catacccatc c 81

<210> 101

<211> 73

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 101

10 cttcacagtg ctctgcagt ctctctgtgt ggctgtaact tacgtgtact ttaccaacga 60
gctgaagcag atg 73

<210> 102

<211> 65

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Amplicón

<400> 102

gcctcgggtgt gcctttcaac atcgccagct acgccctgct cacgtacatg attgcgcaca 60
tcacg 65

<210> 103

20 <211> 70

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

25 <400> 103

gtggatgtgc cctgaaggac aagccaggcg tctacacgag agtctcacac ttcttaccct 60
ggatccgcag 70

<210> 104

<211> 67

<212> DNA

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 104

gccctggatt tcagaaagag ccaagtctgg atctgggacc ctttccttcc ttccctggct 60
tgtaact 67

<210> 105

<211> 71

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 105

10 ctgctgtctt ggggtgcattg gagccttgcc ttgctgtctt acctccacca tgccaagtgg 60
tcccaggctg c 71

<210> 106

<211> 71

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Amplicón

<400> 106

tgacgatggc ctggagtgtg tgcccactgg gcagcaccaa gtccggatgc agatcctcat 60
gatccggtac c 71

<210> 107

20 <211> 75

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

25 <400> 107

agaggcatcc atgaacttca cacttgcggg ctgcatcagc acacgctcct atcaacccaa 60
gtactgtgga gtttg 75

<210> 108

<211> 77

<212> DNA

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 108

gcagttggaa gacacaggaa agtatcccca aattgcagat ttatcaacgg cttttatctt 60
gaaaatagtg ccacgca 77

<210> 109

<211> 76

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 109

10 agactgtgga gtttgatggt gttgaaggag aaaaggggtgc ggaggcagca aatgttacag 60
gtcctggtgg tgttcc 76

<210> 110

<211> 70

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Amplicone

<400> 110

acccagtagc aaggagaagc ccactcactg ctccgagtgc ggcaaagctt tcagaaccta 60
ccaccagctg 70

<210> 111

20 <211> 19

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Iniciador directo

25 <400> 111

gcggcgagtt tccgattta 19

<210> 112

<211> 21

<212> DNA

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Iniciador inverso

	<400> 112	
	tgagtccacc atccagcaag t	21
	<210> 113	
	<211> 21	
5	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 113	
10	atggcggcgg gaggatcaaa a	21
	<210> 114	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 114	
	cgcttctatg gcgctgagat	20
	<210> 115	
20	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
25	<400> 115	
	tcccggtaca ccacgttctt	20
	<210> 116	
	<211> 24	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 116	

	cagccctgga ctacctgcac tcgg	24
	<210> 117	
	<211> 19	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 117	
	tcctgccacc cttcaaacc	19
10	<210> 118	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Iniciador inverso	
	<400> 118	
	ggcggtaaatt tcattcatcga a	21
	<210> 119	
	<211> 24	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 119	
25	caggtcacgt ccgaggtcga caca	24
	<210> 120	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 120	
	ggacagcagg aatgtgtttc	20

	<210> 121	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 121	
	accactcga ttgtttctg	20
	<210> 122	
10	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
15	<400> 122	
	cattggctcc ccgtgacctg ta	22
	<210> 123	
	<211> 27	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 123	
	tgtgagtga atgccttcta gtagtga	27
25	<210> 124	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Sonda	
	<400> 124	
	ccgtcctcgg gagccgacta tga	23
	<210> 125	

	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Iniciador inverso	
	<400> 125	
	ttgtggttcg ttatcatact cttctga	27
	<210> 126	
	<211> 21	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 126	
15	cagcagatgt ggatcagcaa g	21
	<210> 127	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 127	
	gcatttgctgg tggacgat	18
	<210> 128	
25	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
30	<400> 128	
	aggagtatga cgagtcctggc ccc	23
	<210> 129	
	<211> 22	

	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
5	<400> 129	
	ggctcttggtg cgtactgtcc tt	22
	<210> 130	
	<211> 23	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 130	
	tcagatgacg aagagcacag atg	23
15	<210> 131	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Sonda	
	<400> 131	
	aggctcagtg atgtcttccc tgtcaccag	29
	<210> 132	
	<211> 19	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 132	
30	gggtcaggtg cctcgagat	19
	<210> 133	
	<211> 21	
	<212> DNA	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 133	
5	ctgctcactc ggctcaaact c	21
	<210> 134	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 134	
	tgggccaga gcatgttcca gatc	24
	<210> 135	
15	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
20	<400> 135	
	cgttgtcagc acttgaata caa	23
	<210> 136	
	<211> 24	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 136	
	gttcaacctc ttctgtgga ctgt	24
30	<210> 137	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 137	
	cccaattaac atgacccggc aaccat	26
5	<210> 138	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Iniciador directo	
	<400> 138	
	cctggagggt cctgtacaat	20
	<210> 139	
	<211> 19	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 139	
20	ctaattgggc tccatctcg	19
	<210> 140	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 140	
	catcatggga ctctgccct tacc	24
	<210> 141	
30	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

	<223> Iniciador directo	
	<400> 141	
	cagatggacc tagtaccac tgaga	25
	<210> 142	
5	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
10	<400> 142	
	ttccacgccg aaggacagcg at	22
	<210> 143	
	<211> 24	
	<212> DNA	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 143	
	cctatgattt aagggcattt ttcc	24
20	<210> 144	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Iniciador directo	
	<400> 144	
	atcctagccc tggtttttgg	20
	<210> 145	
	<211> 20	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	

	<400> 145	
	ctgccttctc atctgcacaa	20
	<210> 146	
	<211> 20	
5	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 146	
10	tttgctgtca ccagcgtcgc	20
	<210> 147	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 147	
	ttcagggttgt tgcaggagac	20
	<210> 148	
20	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
25	<400> 148	
	catcttcttg ggcacacaat	20
	<210> 149	
	<211> 27	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	

	<400> 149	
	tgtctccatt attgatcggt tcatgca	27
	<210> 150	
	<211> 21	
5	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 150	
10	gcatgttcgt ggcctctaag a	21
	<210> 151	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 151	
	cggtgtagat gcacagcttc tc	22
	<210> 152	
20	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
25	<400> 152	
	aaggagacca tccccctgac ggc	23
	<210> 153	
	<211> 24	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 153	

	aaagaagatg atgaccgggt ttac	24
	<210> 154	
	<211> 20	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 154	
	gagcctctgg atggtgcaat	20
10	<210> 155	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Sonda	
	<400> 155	
	caaactcaac gtgcaagcct cgga	24
	<210> 156	
	<211> 22	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 156	
25	atgctgtggc tccttcctaa ct	22
	<210> 157	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 157	
	acccaaattg tgatatacaa aaagggtt	27

	<210> 158	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 158	
	taccaagcaa cctacatgtc aagaaagccc	30
	<210> 159	
10	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
15	<400> 159	
	agatgaagtg gaaggcgctt	20
	<210> 160	
	<211> 18	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 160	
	caccgcggcc atcctgca	18
25	<210> 161	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Iniciador inverso	
	<400> 161	
	tgccctctgta atcggcaact g	21
	<210> 162	

	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Iniciador directo	
	<400> 162	
	tggttcccag ccctgtgt	18
	<210> 163	
	<211> 28	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 163	
15	ctccaagccc agattcagat tcgagtca	28
	<210> 164	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 164	
	ctcctccacc ctgggttgt	19
	<210> 165	
25	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
30	<400> 165	
	gggcgtggaa cagtttatct	20
	<210> 166	
	<211> 19	

	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
5	<400> 166	
	cacggtgaag gtttcgagt	19
	<210> 167	
	<211> 24	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 167	
	agacatctgc cccaagaagg acgt	24
15	<210> 168	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Iniciador directo	
	<400> 168	
	tgagtgtccc ccggtatctt c	21
	<210> 169	
	<211> 21	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 169	
30	cagccgcttt cagattttca t	21
	<210> 170	
	<211> 27	
	<212> DNA	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 170	
5	tgccaatccc gatgaaattg gaaattt	27
	<210> 171	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 171	
	tgacaatcag cacacctgca t	21
	<210> 172	
15	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
20	<400> 172	
	tgtgactaca gccgtgatcc tta	23
	<210> 173	
	<211> 20	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 173	
	caggccctct tccgagcgg	20
30	<210> 174	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>		
	<223> Iniciador directo		
	<400> 174		
	gataaattgg tacaagggat cagctt	26	
5	<210> 175		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
10	<223> Iniciador inverso		
	<400> 175		
	gggtgccaag taactgacta ttca	24	
	<210> 176		
	<211> 26		
15	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Sonda		
	<400> 176		
20	ccagcccaca tgcctgatc atatgc	26	
	<210> 177		
	<211> 18		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
25	<220>		
	<223> Iniciador directo		
	<400> 177		
	tgcctgtggt gggaagct	18	
	<210> 178		
30	<211> 19		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		

	<223> Iniciador inverso	
	<400> 178	
	ggaaaatgcc tccggtgtt	19
	<210> 179	
5	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
10	<400> 179	
	tgacatagca tcattcctttg gttcccagtt	30
	<210> 180	
	<211> 24	
	<212> DNA	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 180	
	ggatatttcc gtggctctta ttca	24
20	<210> 181	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Sonda	
	<400> 181	
	tctccatcaa atcctgtaaa ctccagagca	30
	<210> 182	
	<211> 25	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	

	<400> 182	
	cttctcatca aggcagaaaa atctt	25
	<210> 183	
	<211> 22	
5	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 183	
10	gacatttcca gtcctgcagt ca	22
	<210> 184	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 184	
	tgcctctctg cccaccctt tgt	23
	<210> 185	
20	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
25	<400> 185	
	ctccgatcgc acacatttgt	20
	<210> 186	
	<211> 18	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 186	

	ggcatcctgg cccaaagt	18
	<210> 187	
	<211> 21	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 187	
	gacccccctca gctggtagtt g	21
10	<210> 188	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Sonda	
	<400> 188	
	cccaaatacca ggcggctaga ggc	23
	<210> 189	
	<211> 23	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 189	
25	tctgcagagt tggaagcact cta	23
	<210> 190	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 190	
	caggatacag ctccacagca tcgatgtc	28

	<210> 191	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 191	
	gccgaggctt ttctaccaga a	21
	<210> 192	
10	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
15	<400> 192	
	gggaggctta tctcactgag tga	23
	<210> 193	
	<211> 19	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 193	
	ccattgcagc cttcattgc	19
25	<210> 194	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Sonda	
	<400> 194	
	ttgaggccca gagcagtcta ccagattct	29
	<210> 195	

	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Iniciador directo	
	<400> 195	
	tgtctcactg agcgagcaga a	21
	<210> 196	
	<211> 19	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 196	
15	accattgcag ccctgattg	19
	<210> 197	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 197	
	cttgaggacg cgaacagtcc acca	24
	<210> 198	
25	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
30	<400> 198	
	cgctgacatc atgaatgttc ct	22
	<210> 199	
	<211> 24	

	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
5	<400> 199	
	tctcttttcag caacgatgtg tctt	24
	<210> 200	
	<211> 25	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 200	
	tcatatccaa actcgccctcc agccg	25
15	<210> 201	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Iniciador directo	
	<400> 201	
	cacaatggcg gctctgaag	19
	<210> 202	
	<211> 26	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 202	
30	acacaaacac tgtctgtacc tgaaga	26
	<210> 203	
	<211> 23	
	<212> DNA	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 203	
5	aagttacgct gcgcgacagc caa	23
	<210> 204	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 204	
	ctctgagaca gtgcttcgat gact	24
	<210> 205	
15	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
20	<400> 205	
	ccatgaggcc caacttcct	19
	<210> 206	
	<211> 23	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 206	
	cagacttggt gccctttgac tcc	23
30	<210> 207	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 207	
	tgtc gatgga cttccagaac	20
5	<210> 208	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Sonda	
	<400> 208	
	cacctgggca gctgccaa	18
	<210> 209	
	<211> 19	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 209	
20	attgggacag cttggatca	19
	<210> 210	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 210	
	gatctaagat ggcgactgtc gaa	23
	<210> 211	
30	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

	<223> Iniciador inverso	
	<400> 211	
	ttagattccg ttttctcctc ttctg	25
	<210> 212	
5	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
10	<400> 212	
	accaccccta ctccataatcc cccgact	27
	<210> 213	
	<211> 22	
	<212> DNA	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 213	
	ggcagtgatca ctgagtcctt ga	22
20	<210> 214	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Iniciador inverso	
	<400> 214	
	tgcactgtgc gtcccaat	18
	<210> 215	
	<211> 18	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	

	<400> 215	
	atcctccctt gccccgcg	18
	<210> 216	
	<211> 20	
5	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 216	
10	gggccctcca gaacaatgat	20
	<210> 217	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 217	
	tgcaactgctt ggccttaaag a	21
	<210> 218	
20	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
25	<400> 218	
	ccgctctcat cgcagtcagg atcat	25
	<210> 219	
	<211> 20	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 219	

	accgtaggct ctgctctgaa	20
	<210> 220	
	<211> 20	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 220	
	tggtccaggt ggaaaacttc	20
10	<210> 221	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Sonda	
	<400> 221	
	aggcagccag acccacagga	20
	<210> 222	
	<211> 23	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 222	
25	cggttatgtc atgccagata cac	23
	<210> 223	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 223	
	cctcaaaggt actccctcct cccgg	25

	<210> 224	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 224	
	gaactgagac ccactgaaga aagg	24
	<210> 225	
10	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
15	<400> 225	
	cgtggtgccc ctctatgac	19
	<210> 226	
	<211> 19	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 226	
	ctggagatgc tggacgccc	19
25	<210> 227	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Iniciador inverso	
	<400> 227	
	ggctagtggg cgcatgtag	19
	<210> 228	

	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Iniciador inverso	
	<400> 228	
	ggattgtaga ctgtcaccga aattc	25
	<210> 229	
	<211> 28	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 229	
15	ggctattcct cattttctct acaaagtg	28
	<210> 230	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 230	
	cctccaggag gctaccttct tcatgttcac	30
	<210> 231	
25	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
30	<400> 231	
	cggtagtcaa gtccggatca a	21
	<210> 232	
	<211> 18	

	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
5	<400> 232	
	gcttgccttt gcggttca	18
	<210> 233	
	<211> 25	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 233	
	caaggagacg gaattctacc tgtgc	25
15	<210> 234	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Iniciador directo	
	<400> 234	
	cacgggacat tcaccacatc	20
	<210> 235	
	<211> 19	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 235	
30	gggtgccatc cacttcaca	19
	<210> 236	
	<211> 27	
	<212> DNA	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 236	
5	ataaaaaagac aaccaacggc cgactgc	27
	<210> 237	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 237	
	ccagtggagc gcttccat	18
	<210> 238	
15	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
20	<400> 238	
	ctctctgggt cgtctgaaac aa	22
	<210> 239	
	<211> 23	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 239	
	tcggccactt catcaggacg cag	23
30	<210> 240	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 240	
	ttggtacctg tgggttagca	20
5	<210> 241	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Iniciador inverso	
	<400> 241	
	cacatccaaa tgcaaactgg	20
	<210> 242	
	<211> 26	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 242	
20	tccccaggggt agaattcaat cagagc	26
	<210> 243	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 243	
	tcagcagcaa gggcatcat	19
	<210> 244	
30	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

	<223> Iniciador inverso	
	<400> 244	
	ggtggttttc ttgagcgtgt act	23
	<210> 245	
5	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
10	<400> 245	
	cgcccgaggg cctcatcct	19
	<210> 246	
	<211> 20	
	<212> DNA	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 246	
	attccaccca tggcaaattc	20
20	<210> 247	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Iniciador inverso	
	<400> 247	
	gatgggattt ccattgatga ca	22
	<210> 248	
	<211> 22	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	

	<400> 248	
	ccgttctcag ccttgacggt gc	22
	<210> 249	
	<211> 23	
5	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 249	
10	caaaggagct cactgtggtg tct	23
	<210> 250	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 250	
	tggtccaacc actgaatctg gacc	24
	<210> 251	
20	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
25	<400> 251	
	gagtcagaat ggcttattca cagatg	26
	<210> 252	
	<211> 20	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 252	

	ccatctgcat ccatcttgtt	20
	<210> 253	
	<211> 23	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 253	
	ctccccaccc ttgagaagtg cct	23
10	<210> 254	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Iniciador inverso	
	<400> 254	
	ggccaccagg gtattatctg	20
	<210> 255	
	<211> 23	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 255	
25	cgaaaagatg ctgaacagtg aca	23
	<210> 256	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Primer inverso	
	<400> 256	
	tcaggaacag ccaccagtga	20

	<210> 257	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 257	
	cttcctcctc ccttctggtc agttggat	28
	<210> 258	
10	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
15	<400> 258	
	ggcccagctt gaatttttca	20
	<210> 259	
	<211> 27	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 259	
25	aagctatgag gaaaagaagt acacgat	27
	<210> 260	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 260	
	tcagccactg gcttctgtca taatcaggag	30

	<210> 261	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 261	
	cccactcagt agccaagtca	20
	<210> 262	
10	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
15	<400> 262	
	tcaagtaaac gggctgtttt ccaaaca	27
	<210> 263	
	<211> 20	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 263	
	cacgcaggtg gtatcagtct	20
25	<210> 264	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Iniciador directo	
	<400> 264	
	cggtgtgaga agtgcagcaa	20
	<210> 265	

	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Sonda	
	<400> 265	
	ccagaccata gcacactcgg gcac	24
	<210> 266	
	<211> 19	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 266	
15	cctctcgcga gtgctccat	19
	<210> 267	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 267	
	tgaacataaa gtctgcaaca tgga	24
	<210> 268	
25	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
30	<400> 268	
	tgagggttggt tactgttggt atcatata	28
	<210> 269	
	<211> 24	

	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
5	<400> 269	
	ttgcactgca caggccacat tcac	24
	<210> 270	
	<211> 24	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 270	
	tccaggatgt taggaactgt gaag	24
15	<210> 271	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Iniciador inverso	
	<400> 271	
	gcgtgtctgc gtagtagctg tt	22
	<210> 272	
	<211> 24	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 272	
30	agtcgctggt ttcatgccct tcca	24
	<210> 273	
	<211> 19	
	<212> DNA	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 273	
5	agaaccgcaa ggtgagcaa	19
	<210> 274	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 274	
	tccaactgaa ggtccctgat g	21
	<210> 275	
15	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
20	<400> 275	
	tgagattct ccagcacgtc atcgac	26
	<210> 276	
	<211> 21	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 276	
	tccggagctg tgatctaagg a	21
30	<210> 277	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>		
	<223> Sonda		
	<400> 277		
	tgtattgcgc acccctcaag cctg	24	
5	<210> 278		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
10	<223> Iniciador inverso		
	<400> 278		
	cggacagagc gagctgactt	20	
	<210> 279		
	<211> 21		
15	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Iniciador directo		
	<400> 279		
20	gcatggtagc cgaagatttc a	21	
	<210> 280		
	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
25	<220>		
	<223> Iniciador inverso		
	<400> 280		
	tttcggtaa tagtctgtct catagatatc	30	
	<210> 281		
30	<211> 28		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		

	<223> Sonda	
	<400> 281	
	cgcgtcatac caaaatctcc gattttga	28
	<210> 282	
5	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
10	<400> 282	
	gtggacagca ccatgaaca	19
	<210> 283	
	<211> 20	
	<212> DNA	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 283	
	ccttcatacc cgacttgagg	20
20	<210> 284	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Sonda	
	<400> 284	
	cttccggcca gcactgcctc	20
	<210> 285	
	<211> 20	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	

	<400> 285		
	cctgaacctt ccaaagatgg		20
	<210> 286		
	<211> 20		
5	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Iniciador inverso		
	<400> 286		
10	accaggcaag tctcctcatt		20
	<210> 287		
	<211> 27		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> Sonda		
	<400> 287		
	ccagattgga agcatccatc tttttca		27
	<210> 288		
20	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Iniciador directo		
25	<400> 288		
	ccacagctca ccttctgtca		20
	<210> 289		
	<211> 20		
	<212> DNA		
30	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Iniciador inverso		
	<400> 289		

	cctcagtgcc agtctcttcc	20
	<210> 290	
	<211> 20	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 290	
	tccatcccag ctccagccag	20
10	<210> 291	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Sonda	
	<400> 291	
	ccacttgtcg aaccaccgct cgt	23
	<210> 292	
	<211> 19	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 292	
25	cggactttgg gtgcgactt	19
	<210> 293	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 293	
	ttacaactct tccactggga cgat	24

	<210> 294	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 294	
	gcccagaggc tccatcgt	18
	<210> 295	
10	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
15	<400> 295	
	cagaggtttg aacagtgcag aca	23
	<210> 296	
	<211> 23	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 296	
	cctcttcctc cccagtcggc tga	23
25	<210> 297	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Iniciador directo	
	<400> 297	
	ggcctgctga gatcaaagac	20
	<210> 298	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Iniciador inverso	
	<400> 298	
	gtccactgtg gctgtgagaa	20
	<210> 299	
	<211> 26	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 299	
15	tgttcctcag gtcctcaatg gtcttg	26
	<210> 300	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 300	
	cgaggattgg ttcttcagca a	21
	<210> 301	
25	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
30	<400> 301	
	actctgcacc agctcactgt tg	22
	<210> 302	
	<211> 24	

	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
5	<400> 302	
	cacctcgcgg ttcagttcct ctgt	24
	<210> 303	
	<211> 20	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 303	
	agagatcgag gctctcaagg	20
15	<210> 304	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Iniciador inverso	
	<400> 304	
	ggccttttac ttctcttcg	20
	<210> 305	
	<211> 27	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 305	
30	tggttcttct tcatgaagag cagctcc	27
	<210> 306	
	<211> 21	
	<212> DNA	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 306	
5	tgagcggcag aatcaggagt a	21
	<210> 307	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 307	
	tgcggtaggt ggcaatctc	19
	<210> 308	
15	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
20	<400> 308	
	ctcatggaca tcaagtcgcg gctg	24
	<210> 309	
	<211> 20	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 309	
	tcagtggaga aggagttgga	20
30	<210> 310	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 310	
5	ccagtcaaca tctctgttgt cacaagca	28
	<210> 311	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 311	
	tgccatatcc agaggaaaca	20
	<210> 312	
15	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
20	<400> 312	
	ggatgaagct tacatgaaca aggtaga	27
	<210> 313	
	<211> 25	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 313	
	catatagctg cctgaggaag ttgat	25
30	<210> 314	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 314	
	cgtcggtcag cccttcagg c	21
5	<210> 315	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Iniciador directo	
	<400> 315	
	ggaaagacca cctgaaaaac ca	22
	<210> 316	
	<211> 24	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 316	
20	gtacttcttc ccacactcct caca	24
	<210> 317	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 317	
	acccacgacc ccaacaaaat ggc	23
	<210> 318	
30	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

	<223> Iniciador directo	
	<400> 318	
	cagatggcca ctttgagaac att	23
	<210> 319	
5	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
10	<400> 319	
	ggcagcatta accacaagga tt	22
	<210> 320	
	<211> 28	
	<212> DNA	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 320	
	agctgacaac agtgtgaacg accagacc	28
20	<210> 321	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Iniciador directo	
	<400> 321	
	gacttttgcc cgctaccttt c	21
	<210> 322	
	<211> 26	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	

	<400> 322	
	gccactaact gcttcagtat gaagag	26
	<210> 323	
	<211> 24	
5	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 323	
10	acagctcatt gttgtcacgc cgga	24
	<210> 324	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 324	
	ggagaacaat ccccttgaga	20
	<210> 325	
20	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
25	<400> 325	
	atctcctgga tggatggt	20
	<210> 326	
	<211> 27	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 326	

	tggcctttct gtctacaagg atcacca	27
	<210> 327	
	<211> 24	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 327	
	tgatggctct atgtgtcaca ttca	24
10	<210> 328	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Iniciador inverso	
	<400> 328	
	tgggacagga aacacaccaa	20
	<210> 329	
	<211> 30	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 329	
25	caggtttcat accaacacag gcttcag	30
	<210> 330	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 330	
	ctacagggac gccatcgaa	19

	<210> 331	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 331	
	atccaaccaa tcacctgaat gtt	23
	<210> 332	
10	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
15	<400> 332	
	cttacaccag catcaagatc cgg	23
	<210> 333	
	<211> 20	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 333	
25	gagaaccaat ctcaccgaca	20
	<210> 334	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 334	
	cacccgagtg taaccatagc	20

	<210> 335	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 335	
	acaggtattc ctctgccagc tgcc	24
	<210> 336	
10	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
15	<400> 336	
	ccgccctcac ctgaagaga	19
	<210> 337	
	<211> 22	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 337	
	ggaataagtt agccgcgctt ct	22
25	<210> 338	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Sonda	
	<400> 338	
	cccagtgccc gccaggagc g	21
	<210> 339	

	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Iniciador directo	
	<400> 339	
	gccgagatcg ccaagatg	18
	<210> 340	
	<211> 27	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 340	
15	cttttgatgg tagagttcca gtgattc	27
	<210> 341	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 341	
	cagcattgtc tgcctccct ggca	24
	<210> 342	
25	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
30	<400> 342	
	ccctcgtgct gatgctact	19
	<210> 343	
	<211> 22	

	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
5	<400> 343	
	catcatgacc tggctcttcta gg	22
	<210> 344	
	<211> 22	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 344	
	ctgccctaga cgctggctcc tc	22
15	<210> 345	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Iniciador directo	
	<400> 345	
	cggtggacca cgaagagtta a	21
	<210> 346	
	<211> 23	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 346	
30	ccgggacttg gagaagcact gca	23
	<210> 347	
	<211> 19	
	<212> DNA	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 347	
5	ggctcgcctc ttccatgtc	19
	<210> 348	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 348	
	ctttgaaccc ttgcttgcaa	20
	<210> 349	
15	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
20	<400> 349	
	aagtcctggg tgcttctgac gcaca	25
	<210> 350	
	<211> 18	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 350	
	cccgggacaa agcaaattg	18
30	<210> 351	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 351	
	ccgcaacgtg gttttctca	19
5	<210> 352	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Sonda	
	<400> 352	
	ctcgggtgtg gccatgctcc ag	22
	<210> 353	
	<211> 21	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 353	
20	tgctggggtt ctctctctgt t	21
	<210> 354	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 354	
	ccagctctcc ttccagctac	20
	<210> 355	
30	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

	<223> Iniciador inverso	
	<400> 355	
	gggtggctct cacttagctc	20
	<210> 356	
5	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
10	<400> 356	
	atcaatgtcc ctgtccgagt gctg	24
	<210> 357	
	<211> 23	
	<212> DNA	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 357	
	cacactagca ttttctccgc ata	23
20	<210> 358	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Iniciador directo	
	<400> 358	
	ataccaatca ccgcacaaac c	21
	<210> 359	
	<211> 30	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	

	<400> 359	
	tgcgctgtga ctggacttaa caaatagcct	30
	<210> 360	
	<211> 18	
5	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 360	
10	gccatccgca aaggcttt	18
	<210> 361	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 361	
	ggccattccg ccagtttc	18
	<210> 362	
20	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
25	<400> 362	
	tcgcttgatca ccttgccatg tgg	23
	<210> 363	
	<211> 20	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 363	

	gcatcaggct gtcattatgg	20
	<210> 364	
	<211> 20	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 364	
	agtagttgtg ctgcccttcc	20
10	<210> 365	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Sonda	
	<400> 365	
	tgtccttacc tgtgggagct gtaaggct	28
	<210> 366	
	<211> 23	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 366	
25	tctccatatc tgccttgag agt	23
	<210> 367	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 367	
	gcacgtgggt cagattgct	19

	<210> 368	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 368	
	tcctgcagca cctcatcggt ct	22
	<210> 369	
10	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
15	<400> 369	
	gccctcccag tgtgcaaat	19
	<210> 370	
	<211> 23	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 370	
	tgctgtttcg acgacaccgt tcg	23
25	<210> 371	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Iniciador inverso	
	<400> 371	
	cgtcgatggt attaggatag aagca	25
	<210> 372	

	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Iniciador directo	
	<400> 372	
	gaacttcttg agcaggagca tacc	24
	<210> 373	
	<211> 25	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 373	
15	tccacccccca agaatatcat ctagt	25
	<210> 374	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 374	
	agggttcat aatcaccttc tgttc	25
	<210> 375	
25	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
30	<400> 375	
	cgaagccctt acaagtttcc	20
	<210> 376	
	<211> 20	

	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
5	<400> 376	
	ggactcttca ggggtgaaat	20
	<210> 377	
	<211> 24	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 377	
	cccttacgga ttcttgagg gaac	24
15	<210> 378	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Iniciador directo	
	<400> 378	
	ccagacgagc gattagaagc	20
	<210> 379	
	<211> 20	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 379	
30	tcctcctctt cctcctctc	20
	<210> 380	
	<211> 23	
	<212> DNA	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 380	
5	tgtgaggtga atgatttggg gga	23
	<210> 381	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 381	
	catcttccag gaggaccact	20
	<210> 382	
15	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
20	<400> 382	
	tccgaccttc aatcatttca	20
	<210> 383	
	<211> 24	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 383	
	ctctgtggca ccctggacta cctg	24
30	<210> 384	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 384	
	cctggaggct gcaacatacc	20
5	<210> 385	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Iniciador inverso	
	<400> 385	
	tacaatggct ttggaggata gca	23
	<210> 386	
	<211> 25	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 386	
20	atcctcctga agcccttttc gcagc	25
	<210> 387	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 387	
	tgttttgatt cccgggctta	20
	<210> 388	
30	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

	<223> Sonda	
	<400> 388	
	tgcccttcttc ctcctcact tctcacct	28
	<210> 389	
5	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
10	<400> 389	
	caaagctgtc agctctagca aaag	24
	<210> 390	
	<211> 19	
	<212> DNA	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 390	
	gcccgaacg ccgaatata	19
20	<210> 391	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Sonda	
	<400> 391	
	taccgcagca aaccgcttgg g	21
	<210> 392	
	<211> 23	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	

	<400> 392	
	cgtggctctc ttatcctcat gat	23
	<210> 393	
	<211> 20	
5	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 393	
10	ggtgtgccac agaccttcct	20
	<210> 394	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 394	
	acggagttct tgacagagtt ttga	24
	<210> 395	
20	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
25	<400> 395	
	ttggcctgta atcacctgtg cagcctt	27
	<210> 396	
	<211> 19	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 396	

	tccctgcggt cccagatag	19
	<210> 397	
	<211> 20	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 397	
	gtgggaacag ggtggacact	20
10	<210> 398	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Sonda	
	<400> 398	
	atcctgcccg gagtggaact gaagc	25
	<210> 399	
	<211> 20	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 399	
25	aatccaaggg ggagagtgat	20
	<210> 400	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 400	
	catatggact ttgactcagc tgtggc	26

	<210> 401	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 401	
	gtacagattt tgcccgagga	20
	<210> 402	
10	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
15	<400> 402	
	tgtggacatc ttcccctcag a	21
	<210> 403	
	<211> 24	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 403	
	ttccctactg agccaccttc tctg	24
25	<210> 404	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Iniciador inverso	
	<400> 404	
	ctagcccgac cggttcgt	18
	<210> 405	

	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
5	<223> Iniciador directo		
	<400> 405		
	ctatatgcag ccagagatgt gaca		24
	<210> 406		
	<211> 23		
10	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Sonda		
	<400> 406		
15	acagcctgcc actcatcaca gcc		23
	<210> 407		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
20	<220>		
	<223> Iniciador inverso		
	<400> 407		
	ccacgagttt cttactgaga atgg		24
	<210> 408		
25	<211> 19		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Iniciador directo		
30	<400> 408		
	gggccaata ttcagaagc		19
	<210> 409		
	<211> 20		

	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
5	<400> 409	
	ggatgggtat gatgggacag	20
	<210> 410	
	<211> 20	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 410	
	ccaccatagc ggccatggag	20
15	<210> 411	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Iniciador directo	
	<400> 411	
	cttcacagtg ctctgcagt ct	22
	<210> 412	
	<211> 21	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 412	
30	catctgcttc agctcgttgg t	21
	<210> 413	
	<211> 26	
	<212> DNA	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 413	
5	aagtacacgt aagttacagc cacaca	26
	<210> 414	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 414	
	gcctcgggtgt gcctttca	18
	<210> 415	
15	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
20	<400> 415	
	catcgccagc tacgcctgc tc	22
	<210> 416	
	<211> 19	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 416	
	cgtgatgtgc gcaatcatg	19
30	<210> 417	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 417	
	gtggatgtgc cctgaagga	19
5	<210> 418	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Iniciador inverso	
	<400> 418	
	ctgcggatcc agggtaagaa	20
	<210> 419	
	<211> 28	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 419	
20	aagccaggcg tctacacgag agtctcac	28
	<210> 420	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 420	
	gccctggatt tcagaaagag	20
	<210> 421	
30	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

	<223> Iniciador inverso	
	<400> 421	
	agttacaagc caggaagga	20
	<210> 422	
5	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
10	<400> 422	
	caagtctgga tctgggaccc tttcc	25
	<210> 423	
	<211> 20	
	<212> DNA	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 423	
	ctgctgtctt ggggtgcattg	20
20	<210> 424	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Iniciador inverso	
	<400> 424	
	gcagcctggg accacttg	18
	<210> 425	
	<211> 25	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	

	<400> 425	
	ttgccttgct gctctacctc cacca	25
	<210> 426	
	<211> 19	
5	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 426	
10	tgacgatggc ctggagtgt	19
	<210> 427	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 427	
	ggtaccggat catgaggatc tg	22
	<210> 428	
20	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
25	<400> 428	
	ctgggcagca ccaagtccgg a	21
	<210> 429	
	<211> 22	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 429	

	agaggcatcc atgaacttca ca	22
	<210> 430	
	<211> 24	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 430	
	caaactccac agtacttggg ttga	24
10	<210> 431	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Sonda	
	<400> 431	
	cgggctgcat cagcacacgc	20
	<210> 432	
	<211> 23	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
	<400> 432	
25	gcagttggaa gacacaggaa agt	23
	<210> 433	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 433	
	tccccaaatt gcagatttat caacggc	27

	<210> 434	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 434	
	tgctggcac tttttcaag a	21
	<210> 435	
10	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador directo	
15	<400> 435	
	agactgtgga gttgatgtt gttga	25
	<210> 436	
	<211> 22	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 436	
	ggaacaccac caggacctgt aa	22
25	<210> 437	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Sonda	
	<400> 437	
	ttgctgcctc cgcacccttt tct	23
	<210> 438	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Iniciador directo	
	<400> 438	
	accagtagc aaggagaagc	20
	<210> 439	
	<211> 20	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador inverso	
	<400> 439	
15	cagctggtgg taggttctga	20
	<210> 440	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 440	
	cactcactgc tccgagtgcg g	21

REIVINDICACIONES

1. Un método de predicción de la probabilidad de supervivencia a largo plazo de un paciente de cáncer de mama sin recurrencia del cáncer de mama, que comprende:
 - determinar el nivel de expresión de un transcrito de mRNA de MDM2, en una muestra de tejido de cáncer de mama obtenida de dicho paciente; normalizar con respecto al nivel de expresión de un conjunto de referencia de transcritos de mRNA en la muestra de tejido de cáncer de mama;
 - donde un mayor nivel de expresión de mRNA de MDM2 indica una probabilidad aumentada de supervivencia sin recurrencia de cáncer de mama.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:
 - determinar un nivel de expresión de al menos un transcrito de mRNA en la misma u otra muestra de tejido de cáncer de mama del paciente, donde al menos ese transcrito de mRNA es el transcrito de un gen seleccionado del grupo compuesto por TP53BP2, GRB7, PR, CD68, Bcl2, KRT14, IRS1, CTSL, EstR1, Chk1, IGFBP2, BAG1, CEGP1, STK15, GSTM1, FHIT, RIZ1, AIB1, SURV, BBC3, IGF1R, p27, GATA3, ZNF217, EGFR, CD9, MYBL2, HIF1a, pS2, ErbB3, TOP2B, RAD51C, KRT19, TS, Her2, KLK10, β -Catenina, γ -Catenina, MCM2, PI3KC2A, IGF1, TBP, CCNB1, FBX05, y DR5, normalizado con respecto al nivel de expresión de todos los transcritos de mRNA en la muestra de tejido de cáncer de mama o de una serie de referencia de transcritos de mRNA en la muestra de tejido del cáncer de mama;
 - donde la expresión aumentada de GRB7, CD68, CTSL, Chk1, AIB1, CCNB1, MCM2, FBX05, Her2, STK15, SURV, EGFR, MYBL2, HIF1 α o TS indica una probabilidad reducida de supervivencia sin recurrencia del cáncer de mama y la expresión aumentada de TP53BP2, PR, Bcl2, KRT14, EstR1, IGFBP2, BAG1, CEGP1, KLK10, β -Catenina, γ -Catenina, DR5, PI3KCA2, RAD51C, GSTM1, FHIT, RIZ1, BBC3, TBP, p27, IRS1, IGF1R, GAT A3, ZNF217, CD9, pS2, ErbB3, TOP2B, IGF1 o KRT19 indica una probabilidad aumentada de supervivencia sin recurrencia del cáncer de mama.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde el cáncer de mama es carcinoma de mama invasivo.
4. El método de la reivindicación 1, 2 o 3, donde la muestra de tumor de cáncer de mama es una muestra de tejido fijada, incrustada en cera.
5. El método de la reivindicación 1, 2 o 3, donde la muestra de tejido de cáncer de mama es tejido de biopsia de núcleo o células aspiradas con aguja fina.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el nivel de expresión se determina mediante reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR).
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende también la elaboración de un informe basado en el nivel de expresión normalizado de MDM2.
8. El método de la reivindicación 8, donde dicho informe incluye una predicción de la probabilidad de supervivencia a largo plazo del paciente sin recurrencia del cáncer de mama.
9. Un método para elaborar un perfil genómico personalizado para un paciente con cáncer de mama, que comprende:
 - (a) someter el mRNA extraído del tejido de mama del paciente a un análisis de expresión génica;
 - (b) determinar el nivel de expresión de un transcrito de mRNA de MDM2, donde el nivel de expresión es normalizado con respecto a un gen o genes de control y opcionalmente se compara con la cantidad encontrada en una serie de tejidos de referencia de cáncer de mama; y
 - (c) crear un informe en el que se resuman los datos normalizados obtenidos por dicho análisis de expresión génica, donde dicho informe incluye una predicción de probabilidad aumentada de supervivencia a largo plazo del paciente sin recurrencia del cáncer de mama cuando se detecta un nivel de expresión aumentado de MDM2.
10. El método de la reivindicación 10, donde dicho tejido de mama comprende células de cáncer de mama.
11. El método de la reivindicación 10 u 11, donde dicho tejido de mama se obtiene de una muestra fijada, incrustada en cera.
12. El método de la reivindicación 10 u 11, donde dicho tejido de mama se obtiene de tejido de biopsia de núcleo o células aspiradas con aguja fina.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde el nivel de expresión se determina por reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (qRT-PCR).