

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 119**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6869 (2008.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2014 PCT/US2014/015841**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14124451**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2014 E 14749095 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 2954070**

54 Título: **Método para evaluar un inmunorrepertorio**

30 Prioridad:

11.02.2013 US 201361763451 P

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

09.12.2020

73 Titular/es:

**IREPERTOIRE, INC. (100.0%)
601 Genome Way, Suite 3005
Huntsville, AL 35806, US**

72 Inventor/es:

**WANG, CHUNLIN y
HAN, JIAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 798 119 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para evaluar un inmunorrepositorio

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un método para identificar y caracterizar el inmunoperfil de un paciente y predecir la probabilidad de qué enfermedad podría tener el paciente.

10 Antecedentes de la invención

Desde hace muchos años, los científicos saben que determinadas enfermedades están asociadas a genes o a mutaciones genéticas particulares. Sin embargo, la causalidad genética, representa solo una parte de las enfermedades diagnosticadas en los seres humanos. Muchas enfermedades parecen estar relacionadas de alguna manera con la respuesta del sistema inmunitario a los agentes infecciosos y ambientales, pero todavía se está determinando de qué modo el sistema inmunitario desempeña un papel en enfermedades tales como cáncer, enfermedad de Alzheimer, costochondritis, fibromialgia, lupus y otras enfermedades.

15

20 El genoma humano comprende, por genoma haploide, un número total de 567-588 genes de IG (inmunoglobulina) y de RT (receptores de linfocitos T) (339-354 de IG y 228-234 de RT), localizados en los 7 locus principales. Estos comprenden genes 405-418 V, 32-D; 105-109 J y 25-29 C. El número de genes funcionales de IG y RT es de 321-353 por genoma haploide. Estos comprenden genes 187-216 V, 28-D; 86-88 J y 20-21 C (<http://imgt.cines.fr>). A través del reordenamiento de estos genes, se ha calculado que se pueden generar aproximadamente $2,5 \times 10^7$ anticuerpos posibles o receptores de linfocitos T.

25 Hasta ahora, algunas enfermedades se habían asociado con la reacción del cuerpo contra un antígeno común (Prinz, J. et al., Eur. J. Immunol. (1999) 29(10): 3360-3368, "Selection of Conserved TCR VDJ Rearrangements in Chronic Psoriatic Plaques Indicates a Common Antigen in Psoriasis Vulgaris) and/or to specific VDJ rearrangements (Tamaru, J. et al., Blood (1994) 84(3): 708-715, "Hodgkin's Disease with a B-cell Phenotype Often Shows a VDJ Rearrangement and Somatic Mutations in the VH Genes). Lo que se necesita es un método mejorado para evaluar los cambios en las células de respuesta inmunitaria y asociar esos cambios con enfermedades específicas.

30

35 En el documento WO2012/097374 se desvela un método para identificar en una persona un estado inmunitario normal frente a uno anómalo en función de los datos de secuenciación de la CDR3, en donde la diversidad de clonotipos se analiza calculando un índice de diversidad (reivindicación 4, [0007], [0015]).

Compendio de la invención

40 La invención se define por el alcance de las reivindicaciones. Se desvela un método para evaluar los cambios en las poblaciones de células de respuesta inmunitaria y asociar esos cambios con una enfermedad específica. En un aspecto de la invención, el método comprende las siguientes etapas (a) aislar una subpoblación de leucocitos (glóbulos blancos) de al menos un sujeto humano o un animal, (b) aislar ARN de la subpoblación de células, (c) amplificar el ARN utilizando RT-PCR en una primera reacción de amplificación para producir amplicones utilizando cebadores anidados, comprendiendo al menos una parte de los cebadores anidados, nucleótidos adicionales para incorporar en un amplicón resultante, un sitio de unión para un cebador comunitario, (d) separar los amplicones de la primera reacción de amplificación de uno o más de los cebadores no utilizados de la primera reacción de amplificación, (e) amplificar, mediante la adición de cebadores comunitarios en una segunda reacción de amplificación, teniendo los amplicones de la primera reacción de amplificación, al menos un sitio de unión para un cebador comunitario, y (f) secuenciar los amplicones de la segunda reacción de amplificación para identificar reordenaciones de anticuerpos y/o receptores en la subpoblación de células. En una realización, la subpoblación puede comprender una muestra poblacional de sangre completa u otra muestra poblacional mixta.

45

50 En una realización, la etapa de aislar una subpoblación de leucocitos puede realizarse mediante citometría de flujo para separar los linfocitos B vírgenes, linfocitos B maduros, linfocitos B de memoria, linfocitos T vírgenes, linfocitos T maduros y linfocitos T de memoria. En diversas realizaciones del método, las recombinaciones en la subpoblación de células son reordenaciones de cadena pesada de inmunoglobulina (IgH, *immunoglobulin heavy chain*) de linfocitos B, cadenas ligeras kappa y/o lambda (IgK, IgL), receptores Alfa, Beta, Gamma y Delta de linfocitos T. Opcionalmente, para evaluar la eficacia de vacuna en la producción de una respuesta inmunitaria, el método puede comprender una etapa adicional que comprende (g) comparar las reordenaciones identificadas de una población de personas a las que se les ha administrado una vacuna, con las reordenaciones identificadas de una población de personas a la que no se les ha administrado la vacuna.

55

60 Opcionalmente, para determinar si existe una correlación entre una reordenación o un conjunto de reordenaciones específicas y la enfermedad, el método también puede comprender la etapa adicional de (g) comparar las reordenaciones identificadas de una población de personas normales con las reordenaciones identificadas de una población de personas a las que se les ha diagnosticado una enfermedad.

65

En diversos aspectos, el método puede producir una amplificación semicuantitativa de polinucleótidos que comprenden las regiones determinantes de complementariedad 3 (CDR3, siglas del inglés *complementarity determining region 3*), que son el resultado de reordenaciones genéticas dentro de los linfocitos T o B y responsables de la afinidad y especificidad de los anticuerpos y/o receptores de linfocitos T por antígenos específicos. La amplificación semicuantitativa proporciona un método para detectar no solo la presencia de secuencias específicas de CDR3, sino también determinar la abundancia relativa de células que han producido los acontecimientos de recombinación necesarios para producir esas secuencias de CDR3.

Además se desvela un método para analizar información de secuencia semicuantitativa para proporcionar uno o más informes sobre el estado inmunitario de un ser humano o un animal. El método para producir un informe sobre el estado inmunitario comprende las siguientes etapas (a) identificar una o más secuencias de CDR3 distintas que se comparten entre un inmunoperfil de un sujeto y un inmunoperfil acumulativo de una biblioteca de enfermedades almacenada en una base de datos, sumando un número total de secuencias detectadas de un sujeto que corresponden a las secuencias de CDR3 distintas compartidas, y calculando el porcentaje del número total de secuencias detectadas en el inmunoperfil del sujeto que son representativas de las CDR3 distintas compartidas entre el inmunoperfil del sujeto y la biblioteca de enfermedades para crear uno o más índices compartidos originales; (b) seleccionar aleatoriamente secuencias de una biblioteca pública almacenada en una base de datos para formar una sub-biblioteca, comprendiendo la sub-biblioteca un número de secuencias que es aproximadamente igual al número de secuencias de CDR3 distintas en la biblioteca de enfermedades, identificando una o más secuencias de CDR3 distintas que se comparten entre el inmunoperfil del sujeto y la sub-biblioteca, sumando un número total de secuencias detectadas correspondientes a las secuencias de CDR3 compartidas, y calculando un porcentaje del número total de secuencias detectadas en el inmunoperfil del sujeto que se comparte entre el inmunoperfil del sujeto y la sub-biblioteca para crear un índice de compartición de muestras; (c) repetir la etapa (b) al menos 1 000 veces o más; y (d) estimar el valor de P como la fracción de veces que los índices de compartición de muestras son mayores que o iguales al índice de compartición original entre un inmunoperfil de un paciente y una biblioteca de enfermedades.

Breve descripción de los dibujos

La divulgación puede entenderse mejor con referencia a los siguientes dibujos. Los elementos de los dibujos no están necesariamente a escala entre sí, en lugar de ello, se hace hincapié en ilustrar claramente los principios de la invención. Asimismo, los mismos números de referencia indican partes correspondientes a lo largo de las diversas vistas.

Las Figuras 1a y 1b son fotografías de un gel que ilustran la presencia de productos de amplificación obtenidos por el método desvelado en el presente documento utilizando los cebadores desvelados en el presente documento. Las Figuras 2a y 2b son dibujos que representan la diferencia observada en la diversidad entre un inmunoperfil en una persona con una enfermedad y una persona que generalmente está sana, cada círculo negro representa una secuencia de CDR3 distinta y el tamaño del círculo representa el número de veces que se encuentra la secuencia de CDR3 distinta en el inmunoperfil.

La Figura 3 es un diagrama que ilustra el método para generar una biblioteca pública.

La Figura 4 es un diagrama que ilustra el método para generar una biblioteca de enfermedades.

La Figura 5 ilustra los resultados obtenidos al comparar un inmunoperfil de un paciente con una biblioteca de enfermedades, calculando un porcentaje para cada CDR3 distinta en el inmunoperfil del paciente que se comparte entre los dos, y añadir esos porcentajes para producir una suma o un índice de compartición.

La Figura 6 ilustra los resultados obtenidos al comparar un inmunoperfil de un paciente con un subconjunto de una biblioteca pública, calculando un porcentaje para cada CDR3 distinta que se comparte entre los dos, y añadir esos porcentajes en el inmunoperfil del paciente para producir una suma, o un índice de compartición.

La figura 7 es un gráfico que ilustra el método de la invención, donde el área bajo la curva representa los índices compartidos totales obtenidos para los subconjuntos de una biblioteca pública (sub-bibliotecas), se estima un valor de P y los índices compartidos de las comparaciones de un inmunoperfil de una persona y de una o más bibliotecas de enfermedades, se representan con líneas verticales (DL₁, DL₂, etc.).

Descripción detallada

Los inventores han desarrollado métodos para evaluar reordenaciones de anticuerpos y receptores de linfocitos T a partir de una gran cantidad de células, siendo los métodos útiles para comparar reordenaciones identificadas en poblaciones de personas para determinar si existe una correlación entre una reordenación específica o un conjunto de reordenaciones específico y una enfermedad, o determinados síntomas de una enfermedad. El método también es útil para establecer un historial de la respuesta inmunitaria de una o más personas en respuesta a agentes infecciosos y/o ambientales, así como para evaluar la eficacia de vacunas.

En el presente documento se desvela un método para evaluar cambios en las poblaciones de células de respuesta inmunitaria y asociar esos cambios a una enfermedad específica. En un aspecto de la invención, el método comprende las siguientes etapas (a) aislar una subpoblación de leucocitos (glóbulos blancos) de al menos un sujeto humano o un animal, (b) aislar ARN de la subpoblación de células, (c) amplificar el ARN utilizando RT-PCR en una primera reacción

de amplificación para producir amplicones utilizando cebadores anidados, comprendiendo al menos una parte de los cebadores anidados, nucleótidos adicionales para incorporar en un amplicón resultante, un sitio de unión para un cebador comunitario, (d) separar los amplicones de la primera reacción de amplificación de uno o más de los cebadores no utilizados de la primera reacción de amplificación, (e) amplificar, mediante la adición de cebadores comunitarios en una segunda reacción de amplificación, teniendo los amplicones de la primera reacción de amplificación, al menos un sitio de unión para un cebador comunitario, y (f) secuenciar los amplicones de la segunda reacción de amplificación para identificar reordenaciones de anticuerpos y/o receptores en la subpoblación de células. En una realización, la subpoblación puede comprender una muestra poblacional de sangre completa u otra muestra poblacional mixta.

En una realización, se extrae una muestra de sangre periférica de un paciente y la etapa de aislar una subpoblación de leucocitos puede realizarse mediante citometría de flujo para separar los linfocitos B vírgenes, linfocitos B maduros, linfocitos B de memoria, linfocitos T vírgenes, linfocitos T maduros y linfocitos T de memoria. En diversas realizaciones del método, las recombinaciones en la subpoblación de células son reordenaciones de cadena pesada de inmunoglobulina (IgH, *immunoglobulin heavy chain*) de linfocitos B, cadenas ligeras kappa y/o lambda (IgK, IgL), receptor Beta, Gamma o Delta de linfocitos T.

En un segundo aspecto, el método puede comprender una etapa adicional (g) de comparar las reordenaciones identificadas de una población de personas normales con las reordenaciones identificadas de una población de personas a las que se les ha diagnosticado una enfermedad, para determinar si existe una correlación entre una reordenación específica o un conjunto de reordenaciones específicas y la enfermedad.

En otro aspecto, el método puede comprender una etapa adicional que comprende (g) comparar las reordenaciones identificadas de una población de personas a las que se les ha administrado una vacuna, con las reordenaciones identificadas de una población de personas a las que no se les ha administrado la vacuna, para evaluar la eficacia de la vacuna en la producción de una respuesta inmunitaria.

En algunas realizaciones, la etapa de separar los amplicones de la primera reacción de amplificación de uno o más cebadores no utilizados de la primera reacción de amplificación, puede omitirse y las dos reacciones de amplificación pueden realizarse en el mismo tubo de reacción.

El inventor desarrolló anteriormente un método de PCR conocido como tem-PCR (siglas del inglés *target-enriched multiplex*-PCR, PCR múltiple con enriquecimiento de dianas), que se ha descrito en la publicación número W02005/038039. Más recientemente, el inventor ha desarrollado un método denominado arm-PCR (siglas del inglés *amplicon rescue multiplex*-PCR, reacción en cadena de la polimerasa de múltiple rescate con amplicón), que se describe en el documento WO2009/124293. También se describe un aparato para detectar polinucleótidos diana en una muestra, comprendiendo el aparato una primera cámara de amplificación de termociclado para amplificar uno o más polinucleótidos diana para producir amplicones utilizando cebadores anidados, comprendiendo al menos una parte de los cebadores anidados, nucleótidos adicionales para incorporar en un amplicón resultante un sitio de unión para un cebador comunitario; un medio para separar los amplicones de la primera reacción de amplificación de uno o más cebadores no utilizados de la primera reacción de amplificación; y una segunda cámara de amplificación de termociclado para amplificar uno o más amplicones producidos durante la primera reacción de amplificación mediante la adición de cebadores comunitarios en una segunda reacción de amplificación, teniendo los amplicones de la primera reacción de amplificación, al menos un sitio de unión para al menos un cebador comunitario.

También se describe una micromatriz de PCR que comprende una primera cámara de PCR conectada de manera fluida tanto a un depósito de residuos como a una segunda cámara de PCR, adicionalmente, el depósito de residuos y la segunda cámara de PCR comprenden, cada uno de ellos, al menos un electrodo, comprendiendo los electrodos un medio para separar los amplicones producidos en la primera cámara de PCR. La segunda cámara de PCR está conectada de manera fluida a una cámara de hibridación y de detección, comprendiendo la cámara de hibridación y de detección microperlas, o perlas, dispuestas de modo que la posición física de las perlas sea una indicación de la presencia de un polinucleótido diana específico en la muestra analizada por medio de la microplaca.

Los métodos de tem-PCR, y especialmente de arm-PCR, proporcionan una amplificación semicuantitativa de múltiples polinucleótidos en una reacción. Adicionalmente, la arm-PCR proporciona sensibilidad añadida. Ambas proporcionan la capacidad de amplificar múltiples polinucleótidos en una reacción, lo cual es beneficioso en el presente método porque el repertorio de varios linfocitos T y B, por ejemplo, es muy grande. La adición de un sitio de unión a cebador comunitario en la reacción de amplificación, y la amplificación posterior de moléculas diana utilizando cebadores comunitarios, proporciona un resultado cuantitativo o semicuantitativo que permite determinar las cantidades relativas de las células que comprenden diversas reordenaciones en una muestra de sangre del paciente. La expansión clonal debido al reconocimiento del antígeno, da como resultado una población más grande de células que reconocen ese antígeno, y la evaluación de las células por sus números relativos proporciona un método para determinar si una exposición antigénica ha influido en la expansión de linfocitos B productores de anticuerpos o de linfocitos T portadores de receptores. Esto es útil para evaluar si puede haber una población particular de células que sea prevalente en personas a las que se las ha diagnosticado una enfermedad determinada, por ejemplo, y puede ser especialmente útil para evaluar si una vacuna ha logrado o no la respuesta inmunitaria deseada en personas a quienes se les ha

administrado la vacuna.

Existen diversas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento disponibles en el comercio, tal como la secuenciación 454 de Roche Life Sciences. En el método de secuenciación 454, los cebadores 454A y 454B se unen a productos de PCR durante la PCR o se ligan después de la reacción de PCR. Cuando se realiza junto con *tem*-PCR o *arm*-PCR, los cebadores 454A y 454B pueden utilizarse como cebadores comunitarios en las reacciones de amplificación. Los productos de la PCR, por lo general una mezcla de diferentes secuencias, se diluyen a aproximadamente 200 copias por ml. En una reacción de "PCR de emulsión", (un entorno similar a un gel semisólido), los productos de la PCR diluidos se amplifican con cebadores (454A o 454B) en la superficie de las microperlas. Dado que los moldes de PCR se diluyen de esta manera, por lo general, solo una perla está adyacente a un molde y está confinada en el entorno semisólido, la amplificación solo se produce en las microperlas y alrededor de las mismas. Después, las perlas se eluyen y se colocan en una placa con pocillos especialmente diseñados. Cada pocillo solo puede contener una perla. Después, se añaden los reactivos a los pocillos para llevar a cabo la pirosecuenciación. Para leer la reacción de secuenciación de cada uno de los pocillos, puede utilizarse un detector de fibra óptica y, en paralelo, los datos se recopilan en un ordenador. Una de dichas reacciones de alto rendimiento podría generar hasta 60 millones de lecturas (60 millones de perlas) y cada lectura puede generar secuencias de aproximadamente 300 pb.

Un aspecto desvelado en el presente documento implica el desarrollo de una base de datos de "inmunorreperorios personales", o inmunoperfiles, de tal manera que cada persona pueda establecer una referencia y seguir el desarrollo de las respuestas inmunitarias contra antígenos, tanto conocidos como desconocidos, durante un período de años. Si se recopila información de una gran cantidad de personas, esta información puede proporcionar una base de datos epidemiológica que produzca información valiosa, particularmente en lo que respecta al desarrollo de esas enfermedades, tales como cáncer y cardiopatía, que se cree que a menudo surgen de la exposición a agentes víricos u otros agentes infecciosos o células transformadas, muchos de los cuales aún no han sido identificados. Un uso particularmente importante del método desvelado en el presente documento, conlleva la evaluación de niños para determinar si las enfermedades infecciosas, los agentes ambientales o las vacunas, pueden ser la causa del autismo. Por ejemplo, muchos han postulado que la administración de vacunas puede desencadenar el desarrollo de autismo. Sin embargo, muchos también atribuyen esa posible correlación al uso de agentes en las vacunas, tal como el timerosol, y los estudios han demostrado que el timerosol no parece ser un agente causante de la enfermedad. Se sigue especulando que el desarrollo de las vacunas cóctel se ha correlacionado con el aumento del número de casos de autismo, sin embargo, recopilar datos para evaluar una posible conexión causal para múltiples antígenos, es extremadamente difícil. El método desvelado en el presente documento simplifica ese proceso y puede proporcionar información clave para comprender mejor el autismo y otras enfermedades en las que la respuesta inmunitaria de diferentes personas puede proporcionar una explicación acerca del desarrollo diferencial de la enfermedad en algunas personas expuestas a un agente o a un grupo de agentes, mientras que otras personas expuestas de manera similar no desarrollan la enfermedad.

Los desequilibrios del inmunoperfil, desencadenados por infecciones, pueden conducir a muchas enfermedades, incluyendo cánceres, leucemia, enfermedades neuronales (Alzheimer, esclerosis múltiple, Parkinson, autismo, etc.), enfermedades autoinmunitarias y enfermedades metabólicas. Estas enfermedades pueden denominarse enfermedades de inmunoperfil. Puede haber dos formas de enfermedad de inmunoperfil. (1) una forma de "pérdida de función" y (2) una forma de "ganancia de función". En la forma de "pérdida de función", una persona es susceptible a una enfermedad porque su inmunoperfil restringido y/o limitado carece de las células que producen las IG y los RT más eficientes y necesarios. En la forma de "ganancia de función", una persona es susceptible a una enfermedad porque su inmunoperfil ganó células que producían las IG y los RT que normalmente no deberían estar allí. En las enfermedades de inmunoperfil de "pérdida de una función" (LOF, siglas del inglés *loss of a function*), una persona no tiene los linfocitos B o T funcionales apropiados para combatir una enfermedad. La tipificación de sus HLA (siglas del inglés *human leukocyte antigen*, antígenos leucocitarios humanos) ha determinado que esas células se eliminan durante las primeras etapas del proceso de maduración de las células inmunitarias, eliminándose generalmente las células porque reaccionan fuertemente contra sus propias proteínas.

Además se desvela un método que comprende (a) amplificar y secuenciar uno o más ARN de los linfocitos T y/o linfocitos B de una o más personas, (b) introducir las secuencias en una base de datos para proporcionar datos que puedan almacenarse en un ordenador, un servidor u otro dispositivo de almacenamiento electrónico, (c) introducir información y características identificativas de una persona, correspondiente a las secuencias del uno o más de los ARN, como datos que también puedan almacenarse en un ordenador, un servidor u otro dispositivo de almacenamiento electrónico y (d) evaluar los datos de las etapas (b) y (e) de una o más personas, para determinar si existe una correlación entre la una o más secuencias de ARN y una o más características de la persona correspondiente a la(s) secuencia(s). La información identificativa puede incluir, por ejemplo, un número identificativo del paciente, un código que comprenda el tipo de HLA del paciente, un código de enfermedad que comprenda uno o más diagnósticos clínicos que puedan haberse realizado, un "código de estadificación" que comprenda la fecha de la muestra, un código de tipo celular que comprenda el tipo de subpoblación celular a partir del cual se amplificó y secuenció el ARN, y uno o más códigos de secuencia que comprendan las secuencias identificadas para la muestra.

El método descrito incluye un novedoso diseño de cebador que no solo permite la amplificación de todo el inmunorreperitorio, sino que también permite realizar la amplificación de una manera extremadamente múltiple y

semicuantitativa. La amplificación múltiple requiere que solo se necesiten unas pocas reacciones de PCR o RT-PCR. Por ejemplo, todas las IG pueden amplificarse en una reacción, o estas podrían dividirse en dos o tres reacciones para la IgH, IgL o IgK. De manera similar, los receptores de linfocitos T (RT), incluyendo RTA, RTB, RTD y RTG, pueden amplificarse en una sola reacción, o pueden amplificarse en unas pocas reacciones. Por amplificación semicuantitativa se entiende que en la reacción múltiple todas las dianas se amplificarán de manera independiente, de tal manera que el análisis concluyente de los productos amplificados refleje la relación interna original entre las dianas.

En diversos aspectos, el método puede producir una amplificación semicuantitativa de polinucleótidos que comprenden las regiones determinantes de complementariedad (CDR), que resultan de reordenaciones genéticas dentro de los linfocitos T o B y que son responsables de la afinidad y especificidad de los anticuerpos y/o receptores de linfocitos T por antígenos específicos. La amplificación semicuantitativa proporciona un método para detectar no solo la presencia de secuencias específicas de CDR3, sino que también determina el número relativo de células que han producido los sucesos de recombinación necesarios para producir esas secuencias de CDR3.

Además se desvela un método para analizar información de secuencia semicuantitativa para proporcionar uno o más informes sobre el estado inmunitario de un ser humano o un animal. El método para producir un informe sobre el estado inmunitario comprende las siguientes etapas (a) identificar una o más secuencias de la CDR3 distintas que se comparten entre un inmunoperfil de un sujeto y una biblioteca de enfermedades almacenada en una base de datos, sumando el total de esas secuencias de la CDR3 compartidas y calculando el porcentaje del número total de secuencias en el inmunoperfil del sujeto que se comparten entre el inmunoperfil del sujeto y la biblioteca de enfermedades para crear uno o más índices compartidos originales; (b) seleccionar aleatoriamente secuencias de una biblioteca pública almacenada en una base de datos para formar una sub-biblioteca, comprendiendo la sub-biblioteca una cantidad de secuencias que es aproximadamente igual a la cantidad de secuencias distintas en la biblioteca de enfermedades, identificando una o más secuencias de CDR3 distintas que se comparten entre el inmunoperfil del sujeto y la sub-biblioteca, sumando el total de esas secuencias de CDR3 compartidas y calculando el porcentaje del número total de secuencias en el inmunoperfil del sujeto que se comparte entre el inmunoperfil del sujeto y la sub-biblioteca para crear un índice de compartición de muestras; (c) repetir la etapa (b) al menos 1 000 veces o más; y (d) estimar el valor de P como la fracción de veces que los índices de compartición de muestras son mayores que o iguales al índice de compartición original entre un inmunoperfil de un paciente y una biblioteca de enfermedades.

Los inventores han descubierto que el inmunoperfil de las personas que tienen determinadas enfermedades, tales como, por ejemplo, cáncer, enfermedad autoinmunitaria, etc., puede caracterizarse por una ausencia de diversidad en una o más poblaciones de células inmunitarias. La Figura 2 es un dibujo que ilustra la diferencia que puede observarse, por ejemplo, entre el distinto tipo y número de linfocitos T presentes en una muestra de sangre de un paciente con cáncer (Fig. 2a) y un paciente sano (Fig. 2b), donde cada círculo representa un tipo distinto de linfocito T, representado por un ADNc recombinado amplificado y secuenciado de la región determinante de complementariedad (por ejemplo, la CDR3) del receptor de linfocitos T y el número relativo de células que se determinan, por amplificación y secuenciación con PCR, para compartir la misma secuencia de CDR3. Como indica la Fig. 2a, puede haber menos células distintas de diferentes especificidades, pero un mayor número de células de determinadas especificidades, representado por las secuencias de CDR3. La figura 2b ilustra un perfil normal de más células diferentes, pero un menor número de cada tipo de célula que comparte la misma secuencia de CDR3.

La lista de cada célula que expresa una CDR3 distinta, y los números de dichas células representados dentro de una muestra sanguínea o tisular de un ser humano o animal, puede constituir un inmunoperfil para ese ser humano o animal. La recopilación de los inmunoperfiles de un grupo de seres humanos, por ejemplo, del grupo que comprende personas tanto sanas como que padecen diversas enfermedades diferentes, puede proporcionar una "biblioteca pública" que sea representativa del tipo de diversidad que se encuentra en una población normal (Fig. 3). De manera similar, la recopilación de los inmunoperfiles de un grupo de personas a las que se las ha diagnosticado clínicamente una enfermedad determinada, puede proporcionar una "biblioteca de enfermedades" que sea representativa de la ausencia de diversidad de las CDR3 específicas de las poblaciones de células extendidas, etc. (Fig. 4). Estos inmunoperfiles pueden almacenarse en una base de datos, accesible, por ejemplo, a través de un acceso informático a internet, para que la información pueda utilizarse en el método de la invención para analizar el estado inmunitario de un paciente.

Para un paciente individual, puede producirse un inmunoperfil que comprenda una lista de células distintas que expresen CDR3 ("CDR3 distintas", las células que comparten una secuencia de CDR3 única) y los números de cada CDR3 distinta presente en una muestra sanguínea o tisular de un individuo. El inmunoperfil del paciente se compara con los inmunoperfiles combinados de un grupo de pacientes a los que se les ha diagnosticado una enfermedad determinada (una biblioteca de enfermedades, almacenada en una base de datos). Esto se puede hacer para una serie de bibliotecas de enfermedades, y se muestra en la figura 5.

Millones de combinaciones posibles son posibles para la biblioteca pública, los sistemas inmunitarios de la mayoría de esas personas generalmente presentan una mayor diversidad que la de un grupo de personas a las que se les ha diagnosticado una enfermedad específica. Por lo tanto, los inventores determinaron que una evaluación y comparación precisas del método de la invención se vería facilitada por la etapa de preparar sub-bibliotecas mediante muestreo/selección al azar de las listas de CDR3 distintas y sus números en la biblioteca pública. El número de CDR3

distintas, representado por una secuencia peptídica única de fragmentos de CDR3, debe ser aproximadamente igual al número de CDR3 distintas identificadas en la biblioteca de enfermedades, o un promedio calculado a partir de más de una biblioteca de enfermedades. La producción de un número significativo de sub-bibliotecas, tales como, por ejemplo, 1 000 sub-bibliotecas o más, producidas por muestreo al azar de la biblioteca pública, aumenta la presencia de una variedad de CDR3 distintas y produce un resultado que, desde el punto de vista estadísticamente significativo, es efectivo para identificar y caracterizar el inmunoperfil de un paciente individual como normal ("sano") o caracterizado por la presencia de un tipo y número de células que se han asociado a una enfermedad determinada.

En los métodos desvelados en el presente documento, un paciente suministra una muestra clínica que comprende, por ejemplo, sangre o tejido, a partir de la cual se amplifican semicuantitativamente y se secuencian distintas CDR3. Esto proporciona la identidad y la abundancia relativa de cada CDR3 para todas las CDR3 distintas. Esta información puede introducirse en un programa que accede a una base de datos que contiene al menos una biblioteca pública y una o más bibliotecas de enfermedades. A través de internet se puede acceder a las bases de datos de los programas informáticos utilizados para la introducción y/o el análisis de los datos o pueden instalarse en un ordenador personal individual, con acceso por internet a la información de secuencias en las bases de datos. Entre el inmunoperfil individual y las diversas bibliotecas y sub-bibliotecas, se obtienen comparaciones y los resultados se generan como se ilustra en líneas generales en las figuras 5 y 6, donde se detectan secuencias de CDR3 específicas, se cuenta el número de esas secuencias de CDR3 distintas detectadas, y se determina si esa CDR3 distinta específica está presente o no tanto en el inmunoperfil de la persona como en una biblioteca específica (es decir, si la persona y la biblioteca "comparten" esa CDR3 distinta específica). Los porcentajes que representan los números de esas CDR3 que se determina que se comparten, se suman para producir una suma que comprende la fracción del total que comprende las CDR3 en el inmunoperfil de la persona que se comparte entre el inmunoperfil de la persona y la biblioteca específica (es decir, un "índice de compartición"). A partir de los resultados obtenidos en las sub-bibliotecas, se calcula un valor de P como la probabilidad de que un porcentaje al azar sea superior o igual al porcentaje observado para una biblioteca de enfermedades determinada, y cuando la fracción de veces que los índices de compartición de muestras supera el índice de compartición original de una biblioteca determinada, se observa un resultado significativo inferior a 0,01, por ejemplo. Si ese índice de compartición representa la relación entre el inmunoperfil de la persona y una biblioteca de enfermedades, entonces se puede informar a la persona sobre la probabilidad de que la persona/paciente tenga la enfermedad representada en la biblioteca de enfermedades específicas. Si los valores de P calculados frente a todas las bibliotecas de enfermedades, son superiores a 0,01, se puede informar a la persona que el inmunoperfil parece normal y que no se ha detectado la enfermedad.

Como los datos de secuencia se recopilan y almacenan en una o más bases de datos para múltiples poblaciones de personas, también puede ser posible asociar determinados índices de compartición a bibliotecas que representan poblaciones con afecciones previas o predisposiciones a determinadas enfermedades. El sistema inmunitario es proactivo y reactivo, y los cambios en el sistema inmunitario, reflejados en el inmunoperfil, pueden proporcionar la primera y, a veces, la única señal de que hay una predisposición, una afección previa, o incluso una enfermedad establecida. Los inventores han utilizado el método para demostrar que determinados tipos de cáncer, enfermedad inflamatoria intestinal y determinadas infecciones víricas, pueden detectarse determinando el índice de compartición entre un paciente y una biblioteca de enfermedades establecida, obtenido mediante la secuenciación de las CDR3 utilizando el método de ARM-PCR para producir un subconjunto del inmunorrepertorio que representa las CDR3 presentes.

Los resultados son aún más fiables cuando se aplica un filtro a los datos de la secuencia. Por ejemplo, los inventores han desarrollado un filtro "INTELIGENTE" para los datos de la secuencia que ayuda a generar resultados significativamente más fiables. Esto se describe más adelante en los Ejemplos.

Como explicación adicional, el siguiente ejemplo puede ser ilustrativo de los métodos desvelados en el presente documento. Antes de la administración de cualquier vacuna, se pueden extraer muestras de sangre de los niños, estableciendo esas muestras de sangre de cada niño, una "referencia" a partir de la cual se pueden evaluar las muestras futuras. Para cada niño, las muestras futuras pueden utilizarse para determinar si ha habido una exposición a un agente que se ha extendido a una población de células que se sabe que están correlacionadas con una enfermedad, y esto puede servir como un "marcador" del riesgo de desarrollar la enfermedad en el futuro. Se puede hacer un seguimiento riguroso de las personas identificadas de esta manera para que sea posible realizar una detección temprana, y se podrá ofrecer cualquier opción de tratamiento disponible en una etapa más temprana del proceso de la enfermedad.

Mediante otro ejemplo, se pueden extraer muestras de sangre de los niños antes de la administración de cualquier vacuna, estableciendo esas muestras de sangre de cada niño, una "referencia" a partir de la cual se pueden evaluar las muestras futuras. Para cada niño y para toda la población de niños en el estudio, esas referencias pueden compararse con los resultados de la secuenciación del ARN de los linfocitos T y B utilizando cebadores selectivos específicos para amplificar el anticuerpo y el receptor de linfocitos T, después de la administración de la vacuna. La comparación puede implicar además la evaluación de datos sobre síntomas, enfermedades diagnosticadas y cualquier otra información asociada para cada persona con las secuencias del anticuerpo y del receptor de linfocitos T correspondientes. Si existe una relación entre la administración de una vacuna y el desarrollo de una enfermedad determinada, las personas que presentan síntomas de esa enfermedad también pueden compartir un anticuerpo o un

receptor de linfocitos T correspondiente, por ejemplo, o un conjunto de anticuerpos o de receptores de linfocitos T correspondiente.

5 El método desvelado en el presente documento puede ser especialmente útil para identificar semejanzas entre personas con enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, y puede proporcionar datos epidemiológicos que describan mejor la correlación entre factores infecciosos y ambientales y enfermedades tales como cardiopatía, aterosclerosis, diabetes y cáncer, proporcionando "biomarcadores" que indican la presencia de una enfermedad o la tendencia a desarrollarla.

10 El método también puede ser útil para el desarrollo de inmunoterapias pasivas. Por ejemplo, después de la exposición a un agente infeccioso, determinados linfocitos B y/o linfocitos T productores de anticuerpos se extienden. El método permite la identificación de anticuerpos protectores, por ejemplo, y esos anticuerpos pueden utilizarse para proporcionar inmunoterapias pasivas en situaciones donde se necesita dicha terapia.

15 El método también puede proporcionar la capacidad de lograr la eliminación selectiva de células con reordenaciones no deseadas, proporcionando el método un medio por el cual se pueden identificar dichas reordenaciones de células.

20 El inventor ha identificado y desarrollado cebadores selectivos específicos para su uso en el método de la invención. En la Tabla 1 se muestran cebadores específicos de linfocitos T y en la Tabla 2 cebadores específicos de anticuerpos. Una realización adicional desvelada en el presente documento se refiere a un método de uso de uno cualquiera de los cebadores mostrados en las Tablas 1 o 2, o de una combinación de los mismos, para amplificar ARN de una muestra de sangre, y más particularmente, para identificar anticuerpos, receptores de linfocitos T y moléculas de HLA en una población de células.

25 También puede utilizarse arm-PCR o tem-PCR para amplificar genes que codifican las moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas en un método de amplificación descrito anteriormente por el inventor (Han et al., 2006. Simultaneous Amplification and Identification of 25 Human Papillomavirus Types with Templex Technology. J. Clin. Micro. 44(11). 4157-4162). En una reacción tem-PCR, se diseñan cebadores específicos de genes anidados para enriquecer las dianas durante el ciclo de PCR inicial. Posteriormente, se utilizan cebadores universales "Super" para amplificar todas las dianas. Los cebadores se denominan de la siguiente manera: F_o (*forward out*, externo directo), F_i (*forward in*, interno directo), R_i (*reverse in*, interno inverso), R_o (*reverse out*, externo inverso), FS (*forward super primer*, supercebador directo) y RS (*reverse super primer*, supercebador inverso), siendo los supercebadores comunes en una variedad de moléculas debido a la adición de un sitio de unión para esos cebadores en el extremo de un cebador selectivo específico. Los cebadores específicos de genes (F_o , F_i , R_i y R_o) se utilizan en concentraciones extremadamente bajas. Diferentes cebadores participan en el proceso de tem-PCR en cada una de las tres etapas principales. En primer lugar, en la fase de "enriquecimiento", a los cebadores específicos de genes de baja concentración se les da suficiente tiempo para encontrar los moldes. Para cada diana prevista, dependiendo de los cebadores que se utilicen, se pueden generar cuatro productos posibles: F_o/R_o , F_i/R_o , F_i/R_i y F_o/R_i . Normalmente, la fase de enriquecimiento se lleva a cabo durante 10 ciclos. En la segunda fase o fase de "etiquetado", la temperatura de hibridación se eleva a 72° C, y solo actuarán los cebadores internos (F_i y R_i) con una longitud de 40 nucleótidos. Después de 10 ciclos de esta fase de etiquetado, todos los productos de PCR estarán "etiquetados" con las secuencias de supercebador universal. Después, en la tercera fase de "amplificación", los supercebadores de alta concentración actúan de manera eficiente para amplificar todas las dianas y marcar los productos de PCR con biotina durante el proceso. Las sondas específicas pueden unirse de manera covalente a perlas de colores Luminex recubiertas.

45 Para amplificar los genes que codifican las moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas, el inventor diseñó cebadores anidados basándose en información de secuencia en el dominio público. Para estudiar la reordenación de VDJ de los linfocitos B y T, el inventor diseñó cebadores para amplificar los ARN reorganizados y expresados. Generalmente, a partir de los genes V se diseña un par de cebadores directos anidados y a partir de los genes J o C un conjunto de cebadores inversos anidados. El tamaño promedio del amplicón es de 250-350 pb. Para los genes IgHV, por ejemplo, hay 123 genes que pueden clasificarse en 7 familias diferentes, y los cebadores actuales están diseñados para ser específicos de la familia. Sin embargo, si se secuencian las secuencias de ADNc amplificadas, existen suficientes diversidades de secuencias para permitir una mayor diferenciación entre los genes de una misma familia. Para el locus del gen MHC, la intención es amplificar el ADN genómico.

55 Ejemplos

Cálculo del índice de compartición

60 Suponiendo que S es un inmunoperfil (IP) de un sujeto, que está representado por N secuencias de CDR3 únicas, $CDR3_1$, $CDR3_2$, ... $CDR3_n$, cada CDR3 tiene su propia frecuencia s_1 , s_2 , ... s_n .

D es una biblioteca de enfermedades, que es la suma de un determinado número de inmunoperfiles de pacientes con M CDR3 únicas. A todos los pacientes de la biblioteca de enfermedades se les diagnosticó la misma enfermedad.

65 P es una biblioteca pública, que es la suma de un gran número de inmunoperfiles de control.

El índice de compartición (*Sharing Index*, SI) se define como la suma de s_x, s_y, \dots, s_z , donde CDR3_x, CDR3_y, ... CDR3_z se comparten en el inmunoperfil del sujeto y una biblioteca. Debe observarse que s_x, s_y, \dots, s_z es la frecuencia de las CDR3 en el inmunoperfil del sujeto, no en la biblioteca.

Suponiendo que en una biblioteca pública (P) siempre hay más CDR3 únicas que en una biblioteca de enfermedades (D), se seleccionan al azar M CDR3 únicas en la biblioteca pública y se utilizan para crear una sub-biblioteca P1 y el índice de compartición (SI_{p1}) entre el sujeto y la sub-biblioteca se calcula de acuerdo con la fórmula anterior. El procedimiento de muestreo se repite 1 000 veces o más y se calculan 1000 SI_{px} o más.

El índice de compartición SI_d entre el sujeto y la biblioteca de enfermedades se calcula de la misma manera. El valor de P se define como la fracción de todos los SI (SI_{p1}, SI_{p2}, ... SI_{px}, SI_d, (Debe observarse que SI_d está incluido), que es igual o mayor que SI_d. Debe observarse que, cuando se muestrean las CDR3 en la biblioteca pública, las CDR3 encontradas en x inmunoperfiles de control tienen x veces de posibilidades de ser muestreadas.

Amplificación de sitios de reordenación de linfocitos T o B

Todos los oligonucleótidos (oligos) se resuspendieron utilizando 1xTE. Todos los oligonucleótidos, excepto 454A y 454B, se resuspendieron a una concentración de 100 pmol/ml. 454A y 454B se resuspendieron a una concentración de 1 000 pmol/ml. 454A y 454B son funcionalmente iguales que los cebadores comunitarios descritos anteriormente, las diferentes secuencias se utilizaron para el seguimiento de los procedimientos de secuenciación de alto rendimiento.

Se prepararon tres mezclas de cebadores diferentes. Una mezcla de cebadores Alpha Delta incluía 82 cebadores (todos de TRAV-C + TRDV-C), una mezcla de cebadores Beta Gamma incluía 79 cebadores (todos de TRBVC y TRGV-C) y una mezcla de cebadores de linfocitos B que incluía un total de 70 cebadores. Los cebadores F_o, F_i y R_i estaban a una concentración de 1 pmol/ml. Los cebadores R_o estaban a una concentración de 5 pmol/ml. 454A y 454B estaban a una concentración de 30 pmol/ml.

Se solicitaron tres muestras de ARN diferentes en ALLCELLS (www.allcells.com). Todas las muestras se diluyeron hasta una concentración final de 4 ng/ul. Las muestras solicitadas fueron:

Tipo de célula:	Fuente:
ALL-PB-MNC	Un paciente con leucemia linfoblástica aguda
Linfocitos T NPB-Pan	Linfocitos T normales
Linfocitos NPB-B	Linfocitos B normales

La RT-PCR se realizó utilizando un kit de RT-PCR de una etapa de Qiagen. Cada muestra contenía lo siguiente:

- 10 ml de tampón Qiagen
- 2 ml de DNTP
- 2 ml de enzima
- 23,5 ml de dH₂O
- 10 ml de la mezcla de cebadores adecuada
- 2,5 ml del molde adecuado (10 ng de ARN total)

Las muestras se procesaron utilizando las siguientes condiciones de ciclado:

- 50° C durante 30 minutos
- 95° C durante 15 minutos
- 94° C durante 30 segundos

15 ciclos de

- 55° C durante 1 minuto
- 72° C durante 1 minuto
- 94° C durante 15 segundos

6 ciclos de

- 70° C durante 1 minuto 30 segundos
- 94° C durante 15 segundos

30 ciclos de

55° C durante 15 segundos
 72° C durante 15 segundos
 72° C durante 3 minutos
 tiempo de espera a 4° C

5 El orden de las muestras colocadas en el gel mostrado en la figura 1a es el siguiente: (1) Escalera (siendo las más grande la de 500 pb disminuyendo al trabajar en etapas de 20 pb, la banda brillante central de la figura 1a tiene 200 pb); (2) mezcla de cebadores $\alpha + \delta$ con molde de linfocitos Pan T 10 ng; (3) mezcla de cebadores $\beta + \gamma$ con molde de linfocitos Pan T 10 ng; (4) mezcla de cebadores de linfocitos B con molde de linfocitos B 10 ng; (5) mezcla de cebadores de linfocitos B con molde de células ALL de 10 ng; (6) mezcla de cebadores $\alpha + \delta$ con molde de células ALL de 10 ng; (7) mezcla de cebadores $\beta + \gamma$ con molde de células ALL de 10 ng; 8. mezcla de cebadores $\alpha + \delta$ en blanco; (9) mezcla de cebadores $\beta + \gamma$ en blanco; (10) mezcla de cebadores de linfocitos B en blanco; (11) Procesamiento del tampón en blanco. Estas muestras se procesaron en un gel ClearSPAGE® SDS al 10 % prefabricado utilizando 1X de tampón de procesamiento natural ClearPAGE® DNA.

15 El experimento inicial mostró que a partir de reacciones de PCR donde se incluyeron moldes se generaba una mancha. Las manchas indican que se generaron diferentes tamaños de productos de PCR que representaban una mezcla de diferentes reordenaciones de VDJ. Hay alguna amplificación de fondo de la reacción de linfocitos B. Se requirió una mejora adicional en esa mezcla de cebadores para limpiar la reacción.

20 Para determinar si los productos de PCR realmente incluían diferentes reordenaciones de VDJ, fue necesario aislar y secuenciar los clones individuales. En lugar de utilizar los procedimientos de clonación habituales, el inventor utilizó una estrategia diferente. Los productos de PCR generados a partir de la mezcla Alpha Delta y la mezcla Beta Gamma (carriles 2 y 3 de la Fig. 1a) se diluyeron a 1:1000 y se utilizó una alícuota de 2 ml como molde de PCR en la siguiente reacción. Después, en lugar de utilizar una mezcla de cebadores dirigida a todo el repertorio, se utilizó un par de cebadores F_i y R_i específicos (5 pmol cada uno) para amplificar solo un producto de PCR específico. Para amplificar las muestras se utilizaron las siguientes condiciones de ciclado:

95° C durante 5 minutos
 30 ciclos de
 94° C durante 30 segundos
 72° C durante 1 minuto
 72° C durante 3 minutos
 tiempo de espera a 4° C

35 Para amplificar los productos se utilizó un kit de PCR de Qiagen. La Mezcla Maestra utilizada para la PCR contenía lo siguiente:

	Por reacción	Mezcla Maestra x12
Tampón de PCR 10x	5 ml	60 ml
dNTP	1 ml	12 ml
HotStartTaq Plus	0,25 ml	3 ml
H ₂ O	39,75 ml	477 ml

40 La fotografía del gel de la Fig. 1b muestra los productos de PCR de las siguientes reacciones: (1) Escalera; (2) TRAV1Fi + TRACRi con producto de PCR alfa delta Pan T; (3) TRAV2Fi + TRACRi con producto de PCR alfa delta Pan T; (4) TRAV3Fi+TRACRi con producto de PCR alfa delta T; (5) TRAV4Fi+TRACRi con producto de PCR alfa delta T; (6) TRAV5Fi+TRACRi con producto de PCR alfa delta T; (7) TRAV1Fi+TRACRi con producto de PCR alfa delta T; (8) TRAV2Fi+TRACRi con producto de PCR alfa delta T; (9) TRAV3Fi+TRACRi con producto de PCR alfa delta T; (10) TRAV4Fi+TRACRi con producto de PCR alfa delta T; (11) TRAV5Fi+TRACRi con producto de PCR alfa delta T; (12) PCR en blanco. Los cebadores F_i son cebadores "internos directos" y los cebadores F_o son cebadores "externos directos", siendo R_i y R_o cebadores "internos inversos" y "externos inversos", respectivamente.

50 Como se ilustra en la figura 1b, se generó un solo producto de PCR a partir de cada reacción. Se generaron bandas de diferente tamaño a partir de diferentes reacciones. Este enfoque de clonación por PCR es exitoso por dos razones principales: (1) Los moldes de PCR utilizados en esta reacción eran productos de PCR diluidos (1:1000) de reacciones anteriores que utilizaron mezclas de cebadores para amplificar todas las posibles reordenaciones de VDJ (por ejemplo, se utilizó una mezcla de cebadores que incluía un total de 82 cebadores para amplificar los genes Alfa y Delta del receptor de linfocitos T) y (2) Solo se utilizó un par de cebadores de PCR, dirigido a un gen V específico, en cada reacción durante este experimento de "clonación". Algunos de estos productos se purificaron en gel y se secuenciaron. Lo siguiente son ejemplos de secuencias obtenidas a partir del protocolo descrito anteriormente. En todos los casos, se obtuvo un solo clon y se identificó un gen V específico del receptor de linfocitos T que se emparejó con el cebador

ES 2 798 119 T3

Fi.

Molde TRAV1 + 454A como cebador de secuenciación:

5 NNNNNNNNNNCNTANTCGGTCTAAGGGTACNGNTACCTCCTTTTGAAGGAGCTCCAGATGAAAGACTCT
GCCTCTTACCTCTGTGCTGTGAGAGATANCAACNATCACTTAATCTTGGGCGCTGGGAGCAGACTAATTA
TAATGCCAGATATCCACAACCCTGACCCTGCCGCGTACCAGCTGAAAGACTATGAACAGGATGGGGAGG
CAGNAGNAG (SEQ ID NO. 1)

10 Molde TRAV1 + 454A como cebador de secuenciación:

15 NNNNNNNNNNGNANGNNCAGGGTTCTGGATATTTGGTTTACAATTAGCTTGGTCCCTGCTCCAAAGATT
AATTTGTAGTTGCTATCCCTCACAGCACAGAGTAAGAGGAAGAGTATTTCTTCTGGAGCTCCTTCAACA
GGAGGAAACTGTACCCTTTATACCTACTAAGGAATGAAGA (SEQ ID NO. 2)

Molde TRAV2 + 454A como cebador de secuenciación:

20 NNNNNNNNNNNNTNCCGTTCTCTTNTCGCTGCTCATCCTCCAGGTGCGGGAGGCAGATGCTGCTGTT
TACTACTGTGCTGTGNANNANGGCANNGACAACAACCTCNTCTTTGGTGGAGGNACCCTACTNNTGGTTA
TNCCNAATANCCANAACCCTGACCCTGCCGAGNAGCAGCANAAAACTNNNAGGGGGGTGGAGAAGNA
NNNNN (SEQ ID NO. 3)

Molde TRAV3 + 454A como cebador de secuenciación:

25 NNNNNNNNNNNNNNGGNNNGNAGCTATGGCTTTGAAGCTGAATTTAACAAGAGCCAAACCTCCTTCCA
CCTGAAGAAACCATCTGCCCTTGTGAGCGACTCCGCTTTGTACTTCTGTGCTGTGAGAGACATCAACGCT
GCCGGCAACAACCTAATTTTGGAGGAAGAACCATGGTGTAGTTAAACCAATATCCATAACCCTGACG
CTGCCGTGTACCAGCTGAAAGACTCTGAGGGGGCTGGAGAGGNAGGNG (SEQ ID NO. 4)

30 Molde TRAV4 + 454A como cebador de secuenciación:

35 NNNNNANNGNNNNNGTTTATCCCTGCCGACAGAAAGTCCAGCACTCTGAGCCTGCCCGGGTTTCCCT
GAGCGACTGCTGTGTACTACTGCCTCGTGGGTGACCGGTCTGGAAACAGCGATGAAATTTTCATCTTA
GGAAGAAGAACGTTCTAGTCATCCANCCCAACATCCACAACCCTGCCGCGGAGNAGCACCAGAAAAA
GATGATGAGGGGGANGNAGNANNNN (SEQ ID NO. 5)

Molde TRAV5 + 454A como cebador de secuenciación:

40 NNNNNNNNNNNNNNNNTCNCTGNTCTATTGAATAAAAAGGATAAACATCTGTCTCTGCGCATTGCAGACA
CCCAGACTGGGGACTCAGCTATCTACTTCTGTGCAGAGAGCCCCGGTGGCGGCAGCAACTTCTTCTTTG
GTGGAGGAGCANTACTACTAGTCGTTCTACATANCCACAACCATGATNCCGCCGAGTACNTGCTGAAAAA
ATATGATGAGGATGGAGAAGAAGNAGCATNAN (SEQ ID NO. 6)

Molde TRBV19Fi + 454A como cebador de secuenciación:

45 NNNNNNNNCTGAGGGTANNCGTCTCTCGGGAGAAGAAGGAATCCTTTCTCTCACTGTGACATCGGCC
AAAAGAACCCGACAGCTTTCTATCTCTGTGCCAGTAGTATGGGGGGGGGGCCTACAATGAGNACGGCG
GCGGGGGAGGGACNNTGCTCGTCTGAGGAGGACATGAAGGTCTTGCCCGCNCNGAGGAAGNTGN
ANANGAACATAAAAATGCGCTGGCTGAANN (SEQ ID NO. 7)

50 Molde TRBV20Fi + 454A como cebador de secuenciación:

55 NNNNNNNNNNGCTCNNNNNNCNATACGAGCAAGGCGTGCAGAAGGACAAGTTTCTCACAACCATGCA
AGCCTGACCTTGTCCACTCTGACAGTGACCAGTGCCATCCTGAAGACAGCAGCTTCTACATCTGCAGTG
CTAGAGGGGGGGGGGGGGGACGACTACTACTTCCGCGGGGGGGGCATGCTGATCGTGGAGGAGGA
GGACATGNAGCTCCTCCCCGCCGCGAGGTTGTTGTGNTNANCATCATACTGNTGGTGGAGNAGNAG
NAGCN (SEQ ID NO. 8)

Molde TRBV21Fi + 454A como cebador de secuenciación:

60 NNNNNNNNNNNNNNNNGNNNNNNNNNNTACTTTTNGAATGAAGAACTTATTAGAAAGCAGAAATAATCA
ATGAGCGATTTTTCAGCCAAATGCTCCAAAACTCATCCTGTACCTTGGAGTTCCAGTCCACGGAGTCAGG
GGACACAGCACTGTATTTCTGTGCCAGCAGCA (SEQ ID NO. 9)

65 Molde TRBV23Fi + 454A como cebador de secuenciación:

NNNGNNNNNNANNGGANANGCACAAGAAGCGATTCTCATCTCAATGCCCAAGAACGCACCCTGCAGC
 CTGGCAATCCTGTCTCAGAACCGGGAGACACGGCACTGTATCTCTGCGCCAGCAGTCAATCGGGGGG
 GGGGGGGAGGGCCGTCCGCAGCGGGGGGGGGGGGGGGCCGGGGGACGGTCCCAAAGAGAAAGAAAAC
 CTGCCCCCGCGCTCGGGCGGTGTGATTGAGCGAAACAGACAGGAAGGNAAGNAAAAAANNNNANCNN
 CNCTCNN (SEQ ID NO. 10)

Molde TRBV24Fi + 454A como cebador de secuenciación:

NNNNNNNGNNANNTCTGATGGANACAGTGTCTCTCGACAGGCACAGGCTAAATTCTCCCTGTCCCTA
 GAGTCTGCCATCCCCAACCAGACAGCTCTTTACTTCTGTGCCACCAGTGANGCGGGGGGCGGGGACCA
 CTACTTCGGGGGGGGGAGGCGGACCAGGGTGTGGTTCGACGAGAAAAAGGAGTCCCCCGCGCGCC
 GCTGTGGTTGTTGCTTCATAATAATCAGGNNGGNGAGGNAGNAGNAANN (SEQ ID NO. 11)

Para investigar el impacto de artefactos sobre el análisis general del repertorio del transcriptoma del TCRβ (receptor β de linfocitos T), los inventores realizaron experimentos de control utilizando moldes de TCRβ CDR3 sintetizados mediante procedimientos químicos. Para ello, mediante procedimientos químicos, los inventores sintetizaron cuatro clones distintos, cada clon se purificó mediante clonación y como moldes se prepararon diferentes mezclas de las cuatro construcciones para la PCR de múltiple rescate con amplicón (ARM)-PCR. Dos mezclas de reacción diferentes se sometieron a dos reacciones de ARM-PCR independientes, y los productos de PCR agrupados se secuenciaron a una longitud de 100 pb desde ambos extremos utilizando el secuenciador Illumina HiSeq2000®. En primer lugar, los inventores reunieron lecturas de ambos extremos a través de una alineación superpuesta con el algoritmo de Needleman-Wunsch modificado, y después mapearon las secuencias combinadas con secuencias de referencia V, D y J de la línea germinal.

Sin limpiar, los inventores obtuvieron un total de 5 729 613 secuencias de la mezcla de moldes que podrían mapearse en los segmentos V, D y J del TCRβ. Sorprendentemente, las lecturas de secuencia representaban supuestamente un total de 36 439 variantes únicas de CDR3. Por lo tanto, dado que en las mezclas de moldes solo había cuatro variantes distintas de CDR3, prácticamente todas las variantes de CDR3 identificadas deben ser no auténticas. Para la segunda mezcla de moldes se obtuvieron resultados similares, en la que se identificó un total de 9 131 681 secuencias mapeadas en VDJ que imitaban la existencia de 50 354 variantes únicas de CDR3 del TCRβ. Los experimentos de secuenciación independientes de los inventores, muestran que solo unas pocas variantes distintas de moldes de CDR3 pueden crear diversidades de repertorios artificializados que compensan con creces la diversidad real de moldes, y por tanto los inventores se propusieron eliminar estos artefactos.

Se considera que la calidad de las lecturas de secuenciación con Illumina en el extremo 3', es generalmente baja. En el contexto de secuenciación de repertorios, esto es problemático porque los cebadores de PCR deben colocarse lo suficientemente lejos de las uniones V(D)J hipervariables para evitar que se produzcan efectos negativos debido al emparejamiento erróneo entre el molde y el cebador. Como consecuencia, los segmentos de interés de la CDR3 generalmente se "desplazan" más cerca del extremo 3' de las lecturas de secuenciación, la región con mayores tasas de error de secuenciación. Otra cuestión técnica que merece atención, es la observación de que los errores de secuenciación son específicos del contexto y, en consecuencia, específicos de cadena. Por lo tanto, es realista suponer que, en una lectura directa, la probabilidad de que un error de secuenciación coincida con el de la lectura inversa correspondiente es poco frecuente.

Teniendo esto en cuenta, basándose en la tecnología Illumina®, los inventores idearon una estrategia de secuenciación de ambos extremos que permitía la secuenciación bicatenaria de segmentos completos de la CDR3 del TCR. En este enfoque, los cebadores de secuenciación directo e inverso, se colocan en la región estructural 3 y en la región J o en el extremo 5' de la región C del TCR, respectivamente. Teniendo en cuenta la longitud promedio de las lecturas de secuenciación de Illumina (actualmente 100-150 pb), este diseño permite secuenciar por completo las dos cadenas definen un segmento de CDR3. En una segunda etapa, las lecturas directa e inversa se analizaron después para detectar emparejamientos erróneos de secuencias y las secuencias de CDR3 que no presentaban identidad de ambas cadenas se eliminaron utilizando un algoritmo de filtrado de ambos extremos recientemente desarrollado.

Aplicando este filtro de error de secuenciación a las 5 729 613 secuencias de CDR3 obtenidas para la mezcla de moldes I, los inventores identificaron un total de 2 751 131 (48%) secuencias de CDR3 que contenían información de secuencia conflictiva en sus cadenas opuestas. El descarte de estas secuencias dio como resultado la eliminación de 35 455 (97,2 %) variantes distintas de CDR3 artificializadas. De acuerdo con esto, el filtro de ambos extremos eliminó 4 308 020 (47 %) secuencias de CDR3 de la mezcla de moldes II, lo que condujo a la eliminación de 49 063 (97,4 %) variantes de CDR3 artificializadas. Un total de 973 y 1271 variantes únicas de CDR3, respectivamente, pasó por el filtro. Estos resultados indican que la secuenciación y el filtrado de ambos extremos reduce el número total de secuencias de CDR3 únicas no auténticas en casi dos órdenes de magnitud.

El análisis detallado de la distribución de frecuencias de las variantes de CDR3 no auténticas después del filtro de error de secuenciación, reveló que en ambas mezclas, aproximadamente el 50 % de todos los artefactos eran secuencias de una sola copia. Aproximadamente el 10 % de estas CDR3 artificializadas mostró > 100 números de copias y representaba > 80 % de todas las variantes de CDR3 artificializadas. Dado que los genes variables del

TCR no sufren hipermutación somática, los inventores desarrollaron un algoritmo de referencia que identificaba y eliminaba lecturas de secuencia de CDR3 que mostraban emparejamientos erróneos de nucleótidos en relación con las secuencias de referencia V, D y J de la línea germinal, ya que estas deben ser artefactos generados a nivel de amplificación o secuenciación por PCR.

5 Aplicando este algoritmo de filtrado a las secuencias de "filtrado de ambos extremos" de la mezcla de moldes I, se eliminó un total de 29 804 secuencias, que correspondía a 609 variantes únicas de CDR3. Para la mezcla de moldes II, se identificaron 54 516 secuencias artificializadas (831 variantes únicas de CDR3). Por tanto, el uso del filtro de secuencia de referencia conduce a una reducción del 60 % de secuencias de CDR3 distintas no auténticas. El filtro de referencia es ineficaz en las uniones V-J y D-J porque los nucleótidos añadidos al azar en estas regiones durante la recombinación somática, no pueden mapearse. Por lo tanto, los inventores implementaron un filtro de PCR después de experimentos de simulación computacional para comprender mejor cuatro variables: el impacto del número de molde inicial, la eficiencia de replicación de cada ciclo, el número de ciclo (n) y la tasa de error (m) de la ADN polimerasa sobre la tasa de error final total. En cambio, los inventores señalaron que la tasa de error de la polimerasa de la PCR, tenía un efecto pronunciado sobre el número de errores acumulados

En los experimentos de secuenciación de control de los inventores, la amplificación por PCR se realizó con 15 ciclos y 45 ciclos en la primera y segunda reacción, utilizando polimerasa Taq (polimerasa de *Thermus aquaticus*). Para simular de manera más realista la acumulación de errores durante las reacciones de ARM-PCR, la eficacia de la PCR se estableció para disminuir el 5 % por ciclo durante los primeros 25 ciclos y el 10 % por ciclo durante los ciclos restantes. La eficacia de la PCR se restableció a 1,0 para cada reacción de PCR nueva. Asimismo, los inventores permitieron la mutación en la segunda posición. Las tasas de error por sustitución publicadas para la enzima Taq, expresadas como errores por pb por ciclo, varían de $0,023 \times 10^{-4}$ a $2,1 \times 10^{-4}$. En los experimentos de simulación, la tasa de error por sustitución se estableció a $2,7 \times 10^{-5}$ y la tasa de error por inserción-delección (indel) se estableció a $1,0 \times 10^{-6}$. Se sabe que la polimerasa Taq tiene una tasa de mutación por inserción y delección (indel) mucho más alta en la región homopolimérica de los moldes. Para una región homopolimérica, la mutación indel en cualquier posición de esta región genera un patrón idéntico. Por lo tanto, la tasa de error indel en una región homopolimérica se estableció como $n \times m$, donde n es la longitud de la región homopolimérica y m es $1,0 \times 10^{-6}$.

Debido a que el impacto del número de molde inicial y la eficiencia de la PCR sobre la tasa de error final es pequeño, en una reacción de PCR múltiple, debería ser seguro aplicar la misma tasa de error final estimada a partir de los experimentos de simulación, a moléculas con diferentes números iniciales y diferentes eficiencias de replicación. Las tasas de error límite (m) se establecieron empíricamente como tasas de error en el punto 9 999 de los 10 000 cuantiles para cada categoría. Para dos secuencias de CDR3 similares, A y B, de frecuencia NA y NB ($NA \gg NB$) que difieren en menos de tres posiciones, si $NA * m \geq NB$, donde m es la tasa de error límite correspondiente, se excluirá la secuencia B de la CDR3. Aplicando este algoritmo de filtrado a las secuencias de "filtrado de referencia" de la mezcla de moldes I, se eliminará un total de 22 369 secuencias, que corresponden a 281 variantes únicas de CDR3. Para la mezcla de moldes II, se identificaron 39 920 secuencias artificializadas (348 variantes únicas de CDR3) (Tabla 1). Por tanto, el uso del filtro de error de amplificación por PCR, conduce a una reducción adicional de secuencias CDR3 distintas no auténticas de aproximadamente un 80 %.

En el conjunto de secuencias que habían pasado por los filtros anteriores, los inventores identificaron varias variantes de CDR3 de alta abundancia, que diferían de sus secuencias molde de entrada más similares en múltiples posiciones. Dado que, según los experimentos de simulación, la aparición de mutaciones por sustitución y/o indel en múltiples posiciones de fragmentos de CDR3, es extremadamente poco frecuente, esas variantes de CDR3 deben surgir de otras fuentes de artefactos. Curiosamente, los inventores señalaron que algunas de estas secuencias estaban compuestas por fragmentos de dos moldes de entrada distintos y que presentaban puntos de corte claros, que los identificó como quimeras. Las secuencias quiméricas son artefactos de la PCR que surgen de la extensión incompleta del cebador o el cambio de molde durante la PCR y forman estructuras de tipo mosaico. A la luz de este artefacto de PCR inesperado, los inventores desarrollaron un "filtro de mosaico" computacional. Utilizando este algoritmo de filtrado, los inventores identificaron un total de 17 y 15 secuencias quiméricas en las mezclas de moldes I y II, respectivamente. Cabe observar que, algunas de estas quimeras de CDR3 muestran números de copia de secuencia > 1000, indicando que el algoritmo de los inventores para el filtro es capaz de identificar secuencias de CDR3 quiméricas de gran abundancia.

La aplicación de los algoritmos de filtrado dio como resultado la eliminación del 99,8 % de las secuencias de CDR3 únicas no auténticas generadas por la secuenciación de alto rendimiento de solo cuatro moldes de CDR3 del TCR definidos. Solo 62 y 73 secuencias de CDR3 artificializadas, respectivamente, pasaron por todos los filtros. Entre estas, las dos secuencias de CDR3 más abundantes fueron idénticas en ambos experimentos de mezcla. Lo más probable es que representen artefactos quiméricos que escaparon al filtrado debido a una única sustitución de nucleótidos ubicada exactamente en el punto de corte. Entre las restantes CDR3 erróneas, el 85 % (n = 53) y el 75 % (n = 55) fueron lecturas únicas, respectivamente. Para eliminar esta fracción minoritaria de artefactos, los inventores proponen que el análisis de datos de alta rigurosidad de los inmunorreperitorios de TCR (receptores de linfocitos T) incluya un filtro adicional que elimine lecturas de CDR3 de copia única (filtro de umbral de frecuencia).

ES 2 798 119 T3

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Secuencia	SEQ ID NO.
TRAV-C	TRAV1Fo	TGCACGTACC AGACATCTGG	12	TGCACGTACCA GACATCTGG	12
	TRAV1Fi	AGGTCGTTTT TCTTCATTCC	13	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAGG TCGTTTTTCTTC ATTCC	14
	TRAV2Fo	TCTGTAATCA CTCTGTGTCC	15	TCTGTAATCACT CTGTGTCC	15
	TRAV2Fi	AGGGACGATA CAACATGACC	16	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAGG GACGATACAAC ATGACC	17
	TRAV3Fo	CTATTCAGTC TCTGGAAACC	18	CTATTCAGTCT CTGGAAACC	18
	TRAV3Fi	ATACATCACA GGGATAACC	19	GCCTCCCTCGC GCCATCAGATA CATCACAGGGG ATAACC	20
	TRAV4Fo	TGTAGCCACA ACAACATTGC	21	TGTAGCCACAA CAACATTGC	21
	TRAV4Fi	AAAGTTACAA ACGAAGTGGC	22	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAAA GTTACAAACGA AGTGGC	23
	TRAV5Fo	GCACTTACAC AGACAGCTCC	24	GCACTTACACA GACAGCTCC	24
	TRAV5Fi	TATGGACATG AAACAAGACC	25	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTAT GGACATGAAAC AAGACC	26
	TRAV6Fo	GCAACTATAC AACTATTCC	27	GCAACTATACA AACTATTCC	27

ES 2 798 119 T3

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Secuencia	SEQ ID NO.
	TRAV6Fi	GTTTTCTTGC TACTCATACG	28	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGTT TTCTTGCTACTC ATACG	29
	TRAV7Fo	TGCACGTACT CTGTCAGTCG	30	TGCACGTACTC TGTCAGTCG	30
	TRAV7Fi	GGATATGAGA AGCAGAAAGG	31	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGGA TATGAGAAGCA GAAAGG	32
	TRAV8Fo	AATCTCTTCT GGTATGTSCA	33	AATCTCTTCTG GTATGTSCA	33
	TRAV8Fi	GGYTTTGAGG CTGAATTTA	34	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGGY TTTGAGGCTGA ATTTA	35
	TRAV9Fo	GTCCAATATC CTGGAGAAG G	36	GTCCAATATCC TGGAGAAGG	36
	TRAV9Fi	AACCACTTCT TTCCAATTGG	37	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAAC CACTTCTTTCCA CTTGG	38
	TRAV10Fo	AATGCAATTA TACAGTGAGC	39	AATGCAATTATA CAGTGAGC	39
	TRAV10Fi	TGAGAACACA AAGTCGAACG	40	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTGA GAACACAAAGT CGAACG	41
	TRAVUFo	TCTTAATTGTA CTTATCAGG	42	TCTTAATTGTAC TTATCAGG	42
	TRAVUFi	TCAATCAAGC CAGAAGGAG C	43	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTCA ATCAAGCCAGA AGGAGC	44
	TRAV12Fo	TCAGTGTTCC AGAGGGAGC C	45	TCAGTGTTCCA GAGGGAGCC	45
	TRAV12Fi	ATGGAAGGTT TACAGCACAG	46	GCCTCCCTCGC GCCATCAGATG GAAGGTTTACA GCACAG	47

ES 2 798 119 T3

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Secuencia	SEQ ID NO.
	TRAV13Fo	ACCCTGAGTG TCCAGGAGG G	48	ACCCTGAGTGT CCAGGAGGG	48
	TRAV13Fi	TTATAGACAT TCGTTCAAAT	49	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTTA TAGACATTCT TCAAAT	50
	TRAV14Fo	TGGACTGCAC ATATGACACC	51	TGGACTGCACA TATGACACC	51
	TRAV14Fi	CAGCAAAATG CAACAGAAGG	52	GCCTCCCTCGC GCCATCAGCAG CAAATGCAAC AGAAGG	53
	TRAV16Fo	AGCTGAAGTG CAACTATTCC	54	AGCTGAAGTGC AACTATTCC	54
	TRAV16Fi	TCTAGAGAGA GCATCAAAGG	55	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTCT AGAGAGAGCAT CAAAGG	56
	TRAV17Fo	AATGCCACCA TGAAGTGCAG	57	AATGCCACCAT GAAGTGCAG	57
	TRAV17Fi	GAAAGAGAGA AACACAGTGG	58	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGAA AGAGAGAAACA CAGTGG	59
	TRAV18Fo	GCTCTGACAT TAACTGCAC	60	GCTCTGACATT AACTGCAC	60
	TRAV18Fi	CAGGAGACG GACAGCAGA GG	61	GCCTCCCTCGC GCCATCAGCAG GAGACGGACAG CAGAGG	62
	TRAV19Fo	ATGTGACCTT GGACTGTGTG	63	ATGTGACCTTG GACTGTGTG	63
	TRAV19Fi	GAGCAAAATG AAATAAGTGG	64	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGAG CAAATGAAAT AAGTGG	65
	TRAV20Fo	ACTGCAGTTA CACAGTCAGC	66	ACTGCAGTTAC ACAGTCAGC	66
	TRAV20Fi	AGAAAGAAAG GCTAAAAGCC	67	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAGA AAGAAAGGCTA AAAGCC	68

ES 2 798 119 T3

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Secuencia	SEQ ID NO.
	TRAV21Fo	ACTGCAGTTT CACTGATAGC	69	ACTGCAGTTTC ACTGATAGC	69
	TRAV21Fi	CAAGTGGAAAG ACTTAATGCC	70	GCCTCCCTCGC GCCATCAGCAA GTGGAAGACTT AATGCC	71
	TRAV22Fo	GGGAGCCAAT TCCACGCTGC	72	GGGAGCCAATT CCACGCTGC	72
	TRAV22Fi	ATGGAAGATT AAGCGCCAC G	73	GCCTCCCTCGC GCCATCAGATG GAAGATTAAGC GCCACG	74
	TRAV23Fo	ATTTCAATTAT AACTGTGC	75	ATTTCAATTATA AACTGTGC	75
	TRAV23Fi	AAGGAAGATT CACAATCTCC	76	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAAG GAAGATTCACA ATCTCC	77
	TRAV24Fo	GCACCAATTT CACCTGCAGC	78	GCACCAATTTT ACCTGCAGC	78
	TRAV24Fi	AGGACGAATA AGTGCCACTC	79	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAGG ACGAATAAGTG CCTC	80
	TRAV25Fo	TCACCACGTA CTGCAATTCC	81	TCACCACGTAC TGCAATTCC	81
	TRAV25Fi	AGACTGACAT TTCAGTTTGG	82	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAGA CTGACATTTCA GTTTGG	83
	TRAV26Fo	TCGACAGATT CMCTCCCAG G	84	TCGACAGATTC MCTCCCAGG	84
	TRAV26Fi	GTCCAGYACC TTGATCCTGC	85	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGTC CAGYACCTTGA TCCTGC	86
	TRAV27Fo	CCTCAAGTGT TTTTCCAGC	87	CCTCAAGTGT TTTTCCAGC	87
	TRAV27Fi	GTGACAGTAG TTACGGGTGG	88	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGTG ACAGTAGTTAC GGGTGG	89

ES 2 798 119 T3

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Secuencia	SEQ ID NO.
	TRAV29Fo	CAGCATGTTT GATTATTTCC	90	CAGCATGTTTG ATTATTTCC	90
	TRAV29Fi	ATCTATAAGT TCCATTAAGG	91	GCCTCCCTCGC GCCATCAGATC TATAAGTTCCAT TAAGG	92
	TRAV30Fo	CTCCAAGGCT TTATATTCTG	93	CTCCAAGGCTT TATATTCTG	93
	TRAV30Fi	ATGATATTAC TGAAGGGTG G	94	GCCTCCCTCGC GCCATCAGATG ATATTAAGTAA GGGTGG	95
	TRAV34Fo	ACTGCACGTC ATCAAAGACG	96	ACTGCACGTC TCAAAGACG	96
	TRAV34Fi	TTGATGATGC TACAGAAAGG	97	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTTG ATGATGCTACA GAAAGG	98
	TRAV35Fo	TGAACTGCAC TTCTTCAAGC	99	TGAACTGCACT TCTTCAAGC	99
	TRAV35Fi	CTTGATAGCC TTATATAAGG	100	GCCTCCCTCGC GCCATCAGCTT GATAGCCTTAT ATAAGG	101
	TRAV36Fo	TCAATTGCAG TTATGAAGTG	102	TCAATTGCAGT TATGAAGTG	102
	TRAV36Fi	TTTATGCTAA CTTCAAGTGG	103	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTTT ATGCTAACTTC AAGTGG	104
	TRAV38Fo	GCACATATGA CACCAGTGAG	105	GCACATATGAC ACCAGTGAG	105
	TRAV38Fi	TCGCCAAGAA GCTTATAAGC	106	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTCG CCAAGAAGCTT ATAAGC	107
	TRAV39Fo	TCTACTGCAA TTATTCAACC	108	TCTACTGCAATT ATTCAACC	108
	TRAV39Fi	CAGGAGGGA	109	GCCTCCCTCGC	110
		CGATTAATGG C		GCCATCAGCAG GAGGGACGATT AATGGC	

ES 2 798 119 T3

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Secuencia	SEQ ID NO.
	TRAV40Fo	TGAACTGCAC ATACACATCC	111	TGAACTGCACA TACACATCC	111
	TRAV40Fi	ACAGCAAAAA CTTCGGAGGC	112	GCCTCCCTCGC GCCATCAGACA GCAAAAACCTC GGAGGC	113
	TRAV41Fo	AACTGCAGTT ACTCGGTAGG	114	AACTGCAGTTA CTCGGTAGG	114
	TRAV41Fi	AAGCATGGAA GATTAATTGC	115	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAAG CATGGAAGATT AATTGC	116
	TRACRo	GCAGACAGAC TTGTCACTGG	117	GCAGACAGACT TGTCACTGG	117
	TRACRi	AGTCTCTCAG CTGGTACACG	118	GCCTTGCCAGC CCGCTCAGAGT CTCTCAGCTGG TACACG	119
TRBV-C	TRBV1Fo	AATGAAACGT GAGCATCTGG	120	AATGAAACGTG AGCATCTGG	120
	TRBV1Fi	CATTGAAAAC AAGACTGTGC	121	GCCTCCCTCGC GCCATCAGCAT TGAAAACAAGA CTGTGC	122
	TRBV2Fo	GTGTCCCAT CTCTAATCAC	123	GTGTCCCATC TCTAATCAC	123
	TRBV2Fi	TGAAATCTCA GAGAAGTCTG	124	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTGA AATCTCAGAGA AGTCTG	125
	TRBV3Fo	TATGTATTGG TATAACAGG	126	TATGTATTGGTA TAAACAGG	126
	TRBV3Fi	CTCTAAGAAA TTTCTGAAGA	127	GCCTCCCTCGC GCCATCAGCTC TAAGAAATTTCT GAAGA	128
	TRBV4Fo	GTCTTTGAAA TGTGAACAAC	129	GTCTTTGAAAT GTGAACAAC	129
	TRBV4Fi	GGAGCTCATG TTTGTCTACA	130	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGGA GCTCATGTTTG TCTACA	131

ES 2 798 119 T3

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Secuencia	SEQ ID NO.
	TRBV5Fo	GATCAAAACG AGAGGACAG C	132	GATCAAAACGA GAGGACAGC	132
	TRBV5aFi	CAGGGGCC CAGTTTATCT T	133	GCCTCCCTCGC GCCATCAGCAG GGCCCCAGTT TATCTT	134
	TRBV5bFi	GAAACARAGG AAACTTCCCT	135	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGAA ACARAGGAAAC TTCCCT	136
	TRBV6aFo	GTGTGCCCAG GATATGAACC	137	GTGTGCCCAGG ATATGAACC	137
	TRBV6bFo	CAGGATATGA GACATAATGC	138	CAGGATATGAG ACATAATGC	138
	TRBV6aF	GGTATCGACA AGACCCAGG C	139	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGGT ATCGACAAGAC CCAGGC	140
	TRBV6bFi	TAGACAAGAT CTAGGACTGG	141	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTAG ACAAGATCTAG GACTGG	142
	TRBV7Fo	CTCAGGTGTG ATCCAATTTTC	143	CTCAGGTGTGA TCCAATTTTC	143
	TRBV7aFi	TCTAATTTACT TCCAAGGCA	144	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTCT AATTTACTTCCA AGGCA	145
	TRBV7bFi	TCCAGAGTG ATGCTCAACG	146	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTCC CAGAGTGATGC TCAACG	147
	TRBV7cFi	ACTTACTTCA ATTATGAAGC	148	GCCTCCCTCGC GCCATCAGACT TACTTCAATTAT GAAGC	149
	TRBV7dFi	CCAGAATGAA GCTCAACTAG	150	GCCTCCCTCGC GCCATCAGCCA GAATGAAGCTC AACTAG	151
	TRBV9Fo	GAGACCTCTC TGTGTACTGG	152	GAGACCTCTCT GTGTACTGG	152

ES 2 798 119 T3

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Secuencia	SEQ ID NO.
	TRBV9Fi	CTCATTTCAGT ATTATAATGG	153	GCCTCCCTCGC GCCATCAGCTC ATTCAGTATTAT AATGG	154
	TRBV10Fo	GGAATCACCC AGAGCCCAAG	155	GGAATCACCCA GAGCCCAAG	155
	TRBV10Fi	GACATGGGCT GAGGCTGATC	156	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGAC ATGGGCTGAGG CTGATC	157
	TRBVHFo	CCTAAGGATC GATTTTCTGC	158	CCTAAGGATCG ATTTTCTGC	158
	TRBV11Fi	ACTCTCAAGA TCCAGCCTGC	159	GCCTCCCTCGC GCCATCAGACT CTCAAGATCCA GCCTGC	160
	TRBV12Fo	AGGTGACAGA GATGGGACAA	161	AGGTGACAGAG ATGGGACAA	161
	TRBV12aFi	TGCAGGGACT GGAATTGCTG	162	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTGC AGGGACTGGAA TTGCTG	163
	TRBV12bFi	GTACAGACAG ACCATGATGC	164	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGTA CAGACAGACCA TGATGC	165
	TRBV13Fo	CTATCCTATC CCTAGACACG	166	CTATCCTATCC CTAGACACG	166
	TRBV13Fi	AAGATGCAGA GCGATAAAGG	167	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAAG ATGCAGAGCGA TAAAGG	168
	TRBV14Fo	AGATGTGACC CAATTTCTGG	169	AGATGTGACCC AATTTCTGG	169
	TRBV14Fi	AGTCTAAACA GGATGAGTCC	170	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAGT CTAAACAGGAT GAGTCC	171
	TRBV15Fo	TCAGACTTTG AACCATAACG	172	TCAGACTTTGA ACCATAACG	172
	TRBV15Fi	AAAGATTTTA ACAATGAAGC	173	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAAA GATTTTAACAAT GAAGC	174

ES 2 798 119 T3

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Secuencia	SEQ ID NO.
	TRBV16Fo	TATTGTGCCC CAATAAAAGG	175	TATTGTGCCCC AATAAAAGG	175
	TRBV16Fi	AATGTCTTTG ATGAAACAGG	176	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAAT GTCTTTGATGA AACAGG	177
	TRBV17Fo	ATCCATCTTC TGGTCACATG	178	ATCCATCTTCT GGTCACATG	178
	TRBV17Fi	AACATTGCAG TTGATTCAGG	179	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAAC ATTGCAGTTGA TTCAGG	180
	TRBV18Fo	GCAGCCCAAT GAAAGGACAC	181	GCAGCCCAATG AAAGGACAC	181
	TRBV18Fi	AATATCATAG ATGAGTCAGG	182	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAAT ATCATAGATGA GTCAGG	183
	TRBV19Fo	TGAACAGAAT TTGAACCACG	184	TGAACAGAATT TGAACCACG	184
	TRBV19Fi	TTTCAGAAAG GAGATATAGC	185	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTTT CAGAAAGGAGA TATAGC	186
	TRBV20FO	TCGAGTGCCG TCCCTGGAC	187	TCGAGTGCCGT TCCCTGGAC	187
	TRBV20Fi	GATGGCAACT TCCAATGAGG	188	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGAT GGCAACTTCCA ATGAGG	189
	TRBV21Fo	GCAAAGATGG ATTGTGTTCC	190	GCAAAGATGGA TTGTGTTCC	190
	TRBV21 Fi	CGCTGGAAGA AGAGCTCAAG	191	GCCTCCCTCGC GCCATCAGCGC TGAAGAAGAG CTCAAG	192
	TRBV23Fo	CATTTGGTCA AAGGAAAAGG	193	CATTTGGTCAA AGGAAAAGG	193
	TRBV23Fi	GAATGAACAA GTTCTTCAAG	194	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGAA TGAACAAGTTC TTCAAG	195
	TRBV24Fo	ATGCTGGAAT GTTCTCAGAC	196	ATGCTGGAATG TTCTCAGAC	196

ES 2 798 119 T3

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Secuencia	SEQ ID NO.
	TRBV24Fi	GTCAAAGATA TAAACAAAGG	197	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGTC AAAGATATAAA CAAAGG	198
	TRBV25Fo	CTCTGGAATG TTCTCAAACC	199	CTCTGGAATGT TCTCAAACC	199
	TRBV25Fi	TAATTCCACA GAGAAGGGA G	200	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTAA TTCCACAGAGA AGGGAG	201
	TRBV26Fo	CCCAGAATAT GAATCATGTT	202	CCCAGAATATG AATCATGTT	202
	TRBV26Fi	ATTCACCTGG CACTGGGAG C	203	GCCTCCCTCGC GCCATCAGATT CACCTGGCACT GGGAGC	204
	TRBV27Fo	TTGTTCTCAG AATATGAACC	205	TTGTTCTCAGA ATATGAACC	205
	TRBV27Fi	TGAGGTGACT GATAAGGGAG	206	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTGA GGTGACTGATA AGGGAG	207
	TRBV28Fo	ATGTGTCCAG GATATGGACC	208	ATGTGTCCAGG ATATGGACC	208
	TRBV28Fi	AAAAGGAGAT	209	GCCTCCCTCGC	210
		ATTCCTGAGG		GCCATCAGAAA AGGAGATATTC CTGAGG	
	TRBV29Fo	TCACCATGAT GTTCTGGTAC	211	TCACCATGATG TTCTGGTAC	211
	TRBV29Fi	CTGGACAGAG CCTGACACTG	212	GCCTCCCTCGC GCCATCAGCTG GACAGAGCCTG ACACTG	213
	TRBV30FO	TGTGGAGGG AACATCAAAC C	214	TGTGGAGGGAA CATCAAACC	214
	TRBV30Fi	TTCTACTCCG TTGGTATTGG	215	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTTC TACTCCGTTGG TATTGG	216

ES 2 798 119 T3

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Secuencia	SEQ ID NO.
	TRBCRo	GTGTGGCCTT TTGGGTGTGG	217	GTGTGGCCTTT TGGGTGTGG	217
	TRBCRi	TCTGATGGCT CAAACACAGC	218	GCCTTGCCAGC CCGCTCAGTCT GATGGCTCAAA CACAGC	219
TRDV-C	TRDV1 Fo	TGTATGAAAC AAGTTGGTGG	220	TGTATGAAACA AGTTGGTGG	220
	TRDV1 Fi	CAGAATGCAA AAAGTGGTCG	221	GCCTCCCTCGC GCCATCAGCAG AATGCAAAAAG TGGTCG	222
	TRDV2Fo	ATGAAAGGAG AAGCGATCGG	223	ATGAAAGGAGA AGCGATCGG	223
	TRDV2Fi	TGGTTTCAAA GACAATTTCC	224	GCCTCCCTCGC GCCATCAGTGG TTTCAAAGACA ATTTCC	225
	TRDV3Fo	GACTGTAT ATTCAAATCC	226	GACTGTATA TTCAAATCC	226
	TRDV3Fi	GCAGATTTTA CTCAAGGACG	227	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGCA GATTTTACTCAA GGACG	228
	TRDCRo	AGACAAGCGA CATTTGTTCC	229	AGACAAGCGAC ATTTGTTCC	229
	TRDCRi	ACGGATGGTT TGGTATGAGG	230	GCCTTGCCAGC CCGCTCAGACG GATGGTTTGGT ATGAGG	231
TRGV-C	TRGV1-5Fo	GGGTCATCTG CTGAAATCAC	232	GGGTCATCTGC TGAAATCAC	232
	TRGV1-5/8Fi	AGGAGGGGA AGGCCCCACA G	233	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAGG AGGGGAAGGC CCCACAG	234
	TRGV8F0	GGGTCATCAG CTGTAATCAC	235	GGGTCATCAGC TGTAATCAC	235

ES 2 798 119 T3

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Secuencia	SEQ ID NO.
	TRGV5pFi	AGGAGGGGA AGACCCACAG G	236	GCCTCCCTCGC GCCATCAGAGG AGGGGAAGACC CCACAG	237
	TRGV9Fo	AGCCCGCCT GGAATGTGTG G	238	AGCCCGCCTGG AATGTGTGG	238
	TRGV9Fi	GCACTGTCAG AAAGGAATCC	239	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGCA CTGTCAGAAAG GAATCC	240
	TRGV10Fo	AAGAAAAGTA TTGACATACC	241	AAGAAAAGTAT TGACATACC	241
	TRGV10Fi	ATATTGTCTC AACAAAATCC	242	GCCTCCCTCGC GCCATCAGATA TTGTCTCAACA AAATCC	243
	TRGVHFo	AGAGTGCCCA CATATCTGG	244	AGAGTGCCAC ATATCTGG	244
	TRGVUFi	GCTCAAGATT GCTCAGGTG G	245	GCCTCCCTCGC GCCATCAGGCT CAAGATTGCTC AGGTGG	246
	TRGCRo	GGATCCCAGA ATCGTGTTC	247	GGATCCCAGAA TCGTGTTC	247
	TRGCRi	GGTATGTTCC AGCCTTCTGG	248	GCCTTGCCAGC CCGCTCAGGGT ATGTTCCAGCC TTCTGG	249

Tabla 2

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Ordenada	SEQ ID NO.
IgHV-J	IgHV1aFo	AGTGAAGGTCTC CTGCAAGG	250	AGTGAAGGTCTC CTGCAAGG	250
	IgHV1bFo	AGTGAAGGTTTC CTGCAAGG	251	AGTGAAGGTTTC CTGCAAGG	251

ES 2 798 119 T3

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Ordenada	SEQ ID NO.
	IgHV1aFi	AGTTCCAGGGCA GAGTCAC	252	GCCTCCCTCGCG CCATCAGAGTTC CAGGGCAGAGTC AC	253
	IgHV1bFi	AGTTTCAGGGCA GGGTCAC	254	GCCTCCCTCGCG CCATCAGAGTTT CAGGGCAGGGTC AC	255
	IgHV1cFi	AGTTCCAGGAAA GAGTCAC	256	GCCTCCCTCGCG CCATCAGAGTTC CAGGAAAGAGTC AC	257
	IgHV1dFi	AATTCAGGACA GAGTCAC	258	GCCTCCCTCGCG CCATCAGAATTC CAGGACAGAGTC AC	259
	IgHV2Fo	TCTCTGGGTTCT CACTCAGC	260	TCTCTGGGTTCT CACTCAGC	260
	IgHV2Fi	AAGGCCCTGGAG TGGCTTGC	261	GCCTCCCTCGCG CCATCAGAAGGC CCTGGAGTGGCT TGC	262
	IgHV3aFo	TCCCTGAGACTC TCCTGTGC	263	TCCCTGAGACTC TCCTGTGC	263
	IgHV3bFo	CTCTCCTGTGCA GCCTCTGG	264	CTCTCCTGTGCA GCCTCTGG	264
	IgHV3cFo	GGTCCCTGAGAC TCTCCTGT	265	GGTCCCTGAGAC TCTCCTGT	265
	IgHV3dFo	CTGAGACTCTCC TGTGTAGC	266	CTGAGACTCTCC TGTGTAGC	266
	IgHV3aFi	CTCCAGGGAAGG GGCTGG	267	GCCTCCCTCGCG CCATCAGCTCCA GGGAAGGGGCT GG	268
	IgHV3bFi	GGCTCCAGGCAA GGGGCT	269	GCCTCCCTCGCG CCATCAGGGCTC CAGGCAAGGGGC T	270

ES 2 798 119 T3

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Ordenada	SEQ ID NO.
	IgHV3cFi	ACTGGGTCCGCC AGGCTCC	271	GCCTCCCTCGCG CCATCAGACTGG GTCCGCCAGGCT CC	272
	IgHV3dFi	GAAGGGGCTGGA GTGGGT	273	GCCTCCCTCGCG CCATCAGGAAGG GGCTGGAGTGGG T	274
	IgHV3eFi	AAAAGGTCTGGA GTGGGT	275	GCCTCCCTCGCG CCATCAGAAAAG GTCTGGAGTGGG T	276
	IgHV4Fo	AGACCCTGTCCC TCACCTGC	277	AGACCCTGTCCC TCACCTGC	277
	IgHV4Fi	AGGGVCTGGAGT GGATTGGG	278	GCCTCCCTCGCG CCATCAGAGGGV CTGGAGTGGATT GGG	279
	IgHV5Fo	GCGCCAGATGCC CGGGAAAG	280	GCGCCAGATGCC CGGGAAAG	280
	IgHV5Fi	GGCCASGTCACC ATCTCAGC	281	GCCTCCCTCGCG CCATCAGGGCCA SGTCACCATCTC AGC	282
	IgHV6Fo	CCGGGGACAGTG TCTCTAGC	283	CCGGGGACAGTG TCTCTAGC	283
	IgHV6Fi	GCCTTGAGTGGC TGGGAAGG	284	GCCTCCCTCGCG CCATCAGGCCTT GAGTGGCTGGGA AGG	285
	IgHV7Fo	GTTTCCTGCAAG GCTTCTGG	286	GTTTCCTGCAAG GCTTCTGG	286
	IgHV7Fi	GGCTTGAGTGGGA TGGGATGG	287	GCCTCCCTCGCG CCATCAGGGCTT GAGTGGATGGGA TGG	288
	IgHJRo	ACCTGAGGAGAC GGTGACC	289	ACCTGAGGAGAC GGTGACC	289

ES 2 798 119 T3

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Ordenada	SEQ ID NO.
	IgHJ1Ri	CAGTGCTGGAAG TATTCAGC	290	GCCTTGCCAGCC CGCTCAGCAGTG CTGGAAGTATTC AGC	291
	IgHJ2Ri	AGAGATCGAAGT ACCAGTAG	292	GCCTTGCCAGCC CGCTCAGAGAGA TCGAAGTACCAG TAG	293
	IgHJ3Ri	CCCCAGATATCA AAAGCATC	294	GCCTTGCCAGCC CGCTCAGCCCCA GATATCAAAAGC ATC	295
	IgHJ4Ri	GGCCCCAGTAGT CAAAGTAG	296	GCCTTGCCAGCC CGCTCAGGGCCC CAGTAGTCAAAG TAG	297
	IgHJ5Ri	CCCAGGGGTCGA ACCAGTTG	298	GCCTTGCCAGCC CGCTCAGCCCAG GGGTCGAACCAG TTG	299
	IgHJ6Ri	CCCAGACGTCCA TGTAGTAG	300	GCCTTGCCAGCC CGCTCAGCCCAG ACGTCCATGTAG TAG	301
IgKV-C	IgKV1Fo	TAGGAGACAGAG TCACCATC	302	TAGGAGACAGAG TCACCATC	302
	IgKV1Fi	TTCAGYGRCACT GGATCTGG	303	GCCTCCCTCGCG CCATCAGTTCAG YGRCACTGGATC TGG	304
	IgKV2Fo	GGAGAGCCGGC CTCCATCTC	305	GGAGAGCCGGC CTCCATCTC	305
	IgKV2aFi	TGGTACCTGCAG AAGCCAGG	306	GCCTCCCTCGCG CCATCAGTGGTA CCTGCAGAAGCC AGG	307
	IgKV2bFi	CTTCAGCAGAGG CCAGGCCA	308	GCCTCCCTCGCG CCATCAGCTTCA GCAGAGGCCAGG CCA	309

ES 2 798 119 T3

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Ordenada	SEQ ID NO.
	IgKV3-7Fo	GCCTGGTACCAG CAGAAACC	310	GCCTGGTACCAG CAGAAACC	310
	IgKV3Fi	GCCAGGTTTCAGT GGCAGTGG	311	GCCTCCCTCGCG CCATCAGGCCAG GTTTCAGTGGCAG TGG	312
	IgKV6-7Fi	TCGAGGTTTCAGT GGCAGTGG	313	GCCTCCCTCGCG CCATCAGTTCGAG GTTTCAGTGGCAG TGG	314
	IgKV4-5Fi	GACCGATTCAGT GGCAGCGG	315	GCCTCCCTCGCG CCATCAGGACCG ATTCAGTGGCAG CGG	316
	IgKCRo	TTCAACTGCTCAT CAGATGG	317	TTCAACTGCTCAT CAGATGG	317
	IgKCRi	ATGAAGACAGAT GGTGCAGC	318	GCCTTGCCAGCC CGCTCAGATGAA GACAGATGGTGC AGC	319
IgLV-C	IgLV1aFo	GGGCAGAGGGTC ACCATCTC	320	GGGCAGAGGGTC ACCATCTC	320
	IgLV1bFo	GGACAGAAGGTC ACCATCTC	321	GGACAGAAGGTC ACCATCTC	321
	ILV1aFi	TGGTACCAGCAG CTCCCAGG		GCCTCCCTCGCG CCATCAGTGGTA CCAGCAGCTCCC AGG	323
	IgLV1bFi	TGGTACCAGCAG CTTCCAGG	324	GCCTCCCTCGCG CCATCAGTGGTA CCAGCAGCTTCC AGG	325
	IgLV2Fo	CTGCACTGGAAC CAGCAGTG	326	CTGCACTGGAAC CAGCAGTG	326
	IgLV2Fi	TCTCTGGCTCCA AGTCTGGC	327	GCCTCCCTCGCG CCATCAGTCTCT GGCTCCAAGTCT GGC	328

ES 2 798 119 T3

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Ordenada	SEQ ID NO.
	IgLV3aFo	ACCAGCAGAAGC CAGGCCAG	329	ACCAGCAGAAGC CAGGCCAG	329
	IgLV3bFo	GAAGCCAGGACA GGCCCCTG	330	GAAGCCAGGACA GGCCCCTG	330
	IgLV3aFi	CTGAGCGATTCT CTGGCTCC	331	GCCTCCCTCGCG CCATCAGCTGAG CGATTCTCTGGC TCC	332
	IgLV3bFi	TTCTCTGGGTCC ACCTCAGG	333	GCCTCCCTCGCG CCATCAGTTCTCT GGGTCCACCTCA GG	334
	IgLV3cFi	TTCTCTGGCTCC AGCTCAGG	335	GCCTCCCTCGCG CCATCAGTTCTCT GGCTCCAGCTCA GG	336
	IgLV4Fo	TCGGTCAAGCTC ACCTGCAC	337	TCGGTCAAGCTC ACCTGCAC	337
	IgLV4Fi	GGGCTGACCGCT ACCTCACC	358	GCCTCCCTCGCG CCATCAGGGGCT GACCGCTACCTC ACC	338
	IgLV5Fo	CAGCCTGTGCTG ACTCAGCC	339	CAGCCTGTGCTG ACTCAGCC	339
	IgLV5Fi	CCAGCCGTTCT CTGGATCC	340	GCCTCCCTCGCG CCATCAGCCAGC CGTTTCTCTGGA TCC	341
	IgLV6Fo	CCATCTCCTGCA CCCGCAGC	342	CCATCTCCTGCA CCCGCAGC	342
	IgLV7-8Fo	TCCCCWGGAGG GACAGTCAC	343	TCCCCWGGAGG GACAGTCAC	343
	IgLV9/11Fo	CTCMCCTGCACC CTGAGCAG	344	CTCMCCTGCACC CTGAGCAG	344
	IgLV10Fo	AGACCGCCACAC TCACCTGC	345	AGACCGCCACAC TCACCTGC	345
	IgLV6/8Fi	CTGATCGSTTCTC TGGCTCC	346	GCCTCCCTCGCG CCATCAGCTGAT CGSTTCTCTGGC TCC	347

(continuación)

Locus	Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.	Ordenada	SEQ ID NO.
	IgLV7Fi	CTGCCCGGTTCT CAGGCTCC	348	CTGCCCGGTTCT CAGGCTCC	348
	IgLV9Fi	ATCCAGGAAGAG GATGAGAG	349	GCCTCCCTCGCG CCATCAGATCCA GGAAGAGGATGA GAG	350
	IgLV10-11Fi	CTCCAGCCTGAG GACGAGGC	351	GCCTCCCTCGCG CCATCAGCTCCA GCCTGAGGACGA GGC	352
	IgLC1-7Ro	GCTCCCGGGTAG AAGTCACT	353	GCTCCCGGGTAG AAGTCACT	353
	IgLC1-7Ri	AGTGTGGCCTTG TTGGCTTG	354	GCCTTGCCAGCC CGCTCAGAGTGT GGCCTTGTTGGC TTG	355
	454A	GCCTCCCTCGCG CCATCAG	356	GCCTCCCTCGCG CCATCAG	356
	454B	GCCTTGCCAGCC CGCTCAG	357	GCCTTGCCAGCC CGCTCAG	357

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> BIOTECNOLOGÍAS CB, INC.
- 5 <120> MÉTODO PARA EVALUAR UN INMUNORREPERTORIO
- <130> 15892-0005
- 10 <140>
- <141>
- <150> 61/763.451
- <151> 11/02/2013
- 15 <160> 358
- <170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1
- <211> 220
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

ES 2 798 119 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

5 <220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(10)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

10 <220>
<221> base_modificada
<222> (12)..(12)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

15 <220>
<221> base_modificada
<222> (15)..(15)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

20 <220>
<221> base_modificada
<222> (31)..(31)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

25 <220>
<221> base_modificada
<222> (33)..(33)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

30 <220>
<221> base_modificada
<222> (98)..(98)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

35 <220>
<221> base_modificada
<222> (103)..(103)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

40 <220>
<221> base_modificada
<222> (212)..(212)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

45 <220>
<221> base_modificada
<222> (215)..(215)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

50 <220>
<221> base_modificada
<222> (218)..(218)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

55 <400> 1

```

nnnnnnnnnn cntantcggt ctaagggtac ngntacctcc ttttgaagga gctccagatg      60
aaagactctg cctcttacct ctgtgctgtg agagatanca acnatcactt aatcttgggc      120
gctgggagca gactaattat aatgccagat atccacaacc ctgaccctgc cgcgtaccag      180
ctgaaagact atgaacagga tggggaggca gnagnagnag                               220

```

<210> 2

ES 2 798 119 T3

<211> 180
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(10)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (16)..(17)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (40)..(40)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 2

nnnnnnnnnn gnangnncag ggttctggat atttggttn acaattagct tggtcctgc 60

tccaaagatt aatttgtagt tgctatcct cacagcacag aggtaagagg aagagtattt 120

35 cttctggagc tccttcaaca ggaggaaact gtacccttta tacctactaa ggaatgaaga 180

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

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(12)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)..(15)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (26)..(27)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

60 <220>

- <221> base_modificada
 <222> (85)..(85)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
- 5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (87)..(88)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
- 10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (90)..(90)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
- 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (95)..(96)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
- 20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (109)..(109)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
- 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (123)..(123)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
- 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (132)..(133)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
- 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (141)..(141)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
- 40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (144)..(144)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
- 45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (149)..(149)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
- 50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (153)..(153)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
- 55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (172)..(172)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
- 60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (180)..(180)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
- 65 <220>
 <221> base_modificada

<222> (188)..(190)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <220>
 5 <221> base_modificada
 <222> (206)..(206)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <220>
 10 <221> base_modificada
 <222> (208)..(212)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <400> 3
 15
 nnnnnnnnnn nntnncgggtt ctcttnntcg ctgctcatcc tccaggtgcg ggaggcagat 60
 gctgctgttt actactgtgc tgtgnannan ggcanngaca acaacctcnt ctttggtgga 120
 ggnaccctac tnntggttat nccnaatanc canaacctcg accctgccga gnagcagcan 180
 aaaaactnnn aggggggtgg agaagnannn nn 212

 <210> 4
 <211> 257
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1). (14)
 30 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)..(19)
 35 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (22). (22)
 40 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (252)..(252)
 45 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (256)..(256)
 50 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <400> 4

ES 2 798 119 T3

nnnnnnnnnn nnnnggnng gnagctatgg ctttgaagct gaatttaaca agagccaaac 60
ctccttccac ctgaagaaac catctgcct tgtgagcgac tccgcttgt acttctgtgc 120
tgtgagagac atcaacgctg ccggcaaca cctaactttt ggaggaagaa ccatggtgct 180
agttaaacca aatatccata accctgacgc tgccgtgtac cagctgaaag actctgaggg 240
ggctggagag gnaggng 257

5 <210> 5
<211> 236
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

15 <220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(5)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

20 <220>
<221> base_modificada
<222> (7)..(8)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

25 <220>
<221> base_modificada
<222> (11)..(15)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

30 <220>
<221> base_modificada
<222> (166)..(166)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

35 <220>
<221> base_modificada
<222> (194)..(194)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

40 <220>
<221> base_modificada
<222> (223)..(223)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

45 <220>
<221> base_modificada
<222> (225)..(225)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

50 <220>
<221> base_modificada
<222> (228)..(228)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

55 <220>
<221> base_modificada
<222> (231)..(231)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<220>
<221> base_modificada

<222> (233)..(236)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <400> 5
 5
 nnnnnanngg nnnnngttta tccttgccga cagaaagtcc agcactctga gcctgccccg 60
 ggtttcctg agcgacactg ctgtgtacta ctgcctcgtg ggtgaccggt ctggaaacag 120
 cgatgaaatt ttcatcttag gaagaagaac gcttctagtc atccanccca acatccacaa 180
 ccctgcccgg gagnagcacc agaaaaaaga tgatgagggg gangnagnag nannnn 236

 <210> 6
 <211> 241
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético
 15

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(16)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 20

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (19)..(19)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 25

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (23)..(23)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 30

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (151)..(151)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 35

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (173)..(173)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 40

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (187)..(187)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 45

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (199)..(199)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 50

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (233)..(233)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 55

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (239)..(239)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

ES 2 798 119 T3

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (241)..(241)
 5 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <400> 6

 nnnnnnnnnn nnnnnntcnc tgntctattg aataaaaagg ataaacatct gtctctgcgc 60
 attgcagaca cccagactgg ggactcagct atctacttct gtgcagagag ccccggtggc 120
 ggcagcaact tcttctttgg tggaggagca ntactactag tcgttctaca tanccacaac 180
 catgatnccg ccgagtacnt gctgaaaaaa tatgatgagg atggagaaga agnagcatna 240

 n 241
 10
 <210> 7
 <211> 237
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

 <220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (1)..(8)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <220>
 25 <221> base_modificada
 <222> (18)..(19)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <220>
 30 <221> base_modificada
 <222> (132)..(132)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <220>
 35 <221> base_modificada
 <222> (152)..(153)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <220>
 40 <221> base_modificada
 <222> (191)..(192)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <220>
 45 <221> base_modificada
 <222> (194)..(194)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <220>
 50 <221> base_modificada
 <222> (202)..(202)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

 <220>
 55 <221> base_modificada
 <222> (205)..(205)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (207)..(207)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (209)..(209)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 10

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (235)..(237)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 15

<400> 7
 nnnnnnnnct gagggtannc gtctctcggg agaagaagga atcctttcct ctcaactgtga 60
 catcggccca aaagaaccgc acagctttct atctctgtgc cagtagtatg gggggggggg 120
 cctacaatga gnacggcggc gggggagggg cnntgctcgt cgtggaggag gacatgaagg 180
 tcttgcccgc nncngaggaa gntgnanang aaccataaaa atgcgctggc tgaannn 237

<210> 8
 <211> 280
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(11)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (16)..(21)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (23)..(23)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (214)..(214)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (245)..(245)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 50

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (247)..(248)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 55

<220>

<221> base_modificada
 <222> (250)..(250)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (261)..(261)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (270)..(270)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (273)..(273)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (276)..(276)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (280)..(280)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 30 <400> 8
 nnnnnnnnnn ngctcnnnnn nncatacga gcaaggcgtc gagaaggaca agtttctcac 60
 aaccatgcaa gcctgacctt gtccactctg acagtgacca gtgcccatcc tgaagacagc 120
 agcttctaca tctgcagtgc tagagggggg gggggggacg actactacta cttcggcggg 180
 gggggcatgc tgatcgtgga ggaggaggac atgnagctcc tccccgccgc cgaggttgtt 240
 gtgtntnnan catcatactg ntggtggagn agnagnagcn 280
 35 <210> 9
 <211> 172
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(15)
 45 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)..(27)
 50 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (35)..(35)
 55 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 <400> 9

ES 2 798 119 T3

	nnnnnnnnnn nnnnngnnnn nnnnnntac tttcngaagtg aagaacttat tcagaaagca	60
	gaaataatca atgagcgatt tttagcccaa tgctccaaaa actcatcctg taccttgag	120
	ttccagtcga cggagtcagg ggacacagca ctgtatttct gtgccagcag ca	172
5	<210> 10 <211> 278 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético	
15	<220> <221> base_modificada <222> (1)..(3) <223> a, c, t, g, desconocida u otra	
20	<220> <221> base modificada <222> (5)..(11) <223> a, c, t, g, desconocida u otra	
25	<220> <221> base_modificada <222> (13)..(14) <223> a, c, t, g, desconocida u otra	
30	<220> <221> base_modificada <222> (18)..(18) <223> a, c, t, g, desconocida u otra	
35	<220> <221> base_modificada <222> (20)..(20) <223> a, c, t, g, desconocida u otra	
40	<220> <221> base_modificada <222> (252)..(252) <223> a, c, t, g, desconocida u otra	
45	<220> <221> base_modificada <222> (256)..(256) <223> a, c, t, g, desconocida u otra	
50	<220> <221> base_modificada <222> (263)..(266) <223> a, c, t, g, desconocida u otra	
55	<220> <221> base_modificada <222> (268)..(268) <223> a, c, t, g, desconocida u otra	
60	<220> <221> base_modificada <222> (270)..(271) <223> a, c, t, g, desconocida u otra	
	<220>	

ES 2 798 119 T3

<221> base_modificada
 <222> (273)..(273)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (277)..(278)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

10

<400> 10

nnngnnnnnn	nanngganan	gcacaagaag	cgatttcat	ctcaatgcc	caagaacgca	60
ccctgcagcc	tggcaatcct	gtcctcagaa	ccgggagaca	cggcactgta	tctctgcgcc	120
agcagtcaat	cggggggggg	ggggagggcc	gtccgcagcg	gggggggggg	gggccggggg	180
acgggtccaa	agagaaagaa	aacctgcccc	ccgcgctcgg	gcggtgtgat	tgagcgaaac	240
agacaggaag	gnaagnaana	aannnnancn	ncnctcnn			278

<210> 11
 <211> 253
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

20

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(8)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(11)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(15)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (25)..(25)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (120)..(120)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (234)..(235)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

50

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (238)..(238)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

55

<220>

ES 2 798 119 T3

<221> base_modificada
 <222> (243)..(243)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (246)..(246)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

10

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (249)..(249)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

15

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (252)..(253)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

20

<400> 11

nnnnnnnnngn nanntctga tgganacagt gtctctcgac aggcacaggc taaattctcc	60
ctgtccctag agtctgccat ccccaaccag acagctcttt acttctgtgc caccagtgan	120
gcgggggggcg gggaccacta cttcggggggg gggaggcgga ccagggtgct ggtcgcagag	180
aaaaggagc tccccccgc cgccgctgtg gttgttgctt cataataatc aggnngnga	240
ggnagnagna ann	253

25

<210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 12
 tgcacgtacc agacatctgg 20

35

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 13
 aggtcgttt tctcattcc 20

45

<210> 14
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

55

<400> 14
 gcctccctcg cgccatcaga ggtcgtttt cttcattcc 39

<210> 15

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 15	
	tctgtaatca ctctgtgtcc	20
10	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 16	
20	agggacgata caacatgacc	20
	<210> 17	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 17	
	gcctccctcg cgccatcaga gggacgatac aacatgacc	39
	<210> 18	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 18	
	ctattcagtc tctggaaacc	20
	<210> 19	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 19	
	atacatcaca ggggataacc	20
55	<210> 20	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 20	
	gcctccctcg cgccatcaga tacatcacag gggataacc	39
65	<210> 21	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 21	
10	tgtagccaca acaacattgc	20
	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 22	
20	aaagtacaa acgaagtggc	20
	<210> 23	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 23	
	gcctccctcg cgccatcaga aagttacaaa cgaagtggc	39
	<210> 24	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 24	
	gcacttacac agacagctcc	20
	<210> 25	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 25	
	tatggacatg aaacaagacc	20
55	<210> 26	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 26	
65	gcctccctcg cgccatcagt atggacatga aacaagacc	39
	<210> 27	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 27	
10	gcaactatac aaactattcc	20
	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 28	
20	gttttctgc tactcatagc	20
	<210> 29	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 29	
30	gcctccctcg cgccatcagg ttttctgct actcatagc	39
	<210> 30	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 30	
	tgacgtact ctgtcagtcg	20
	<210> 31	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 31	
	ggatagaga agcagaaagg	20
55	<210> 32	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 32	
65	gcctccctcg cgccatcagg gatagagaa gcagaaagg	39
	<210> 33	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 33	
	aatctcttct ggtatgtsca	20
10	<210> 34	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 34	
20	ggytttgagg ctgaattta	19
	<210> 35	
	<211> 38	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 35	
	gcctccctcg cgccatcagg gyttaggc tgaattta	38
	<210> 36	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 36	
	gtccaatc ctggagaagg	20
	<210> 37	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 37	
	aaccacttct ttccactgg	20
55	<210> 38	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 38	
	gcctccctcg cgccatcaga accacttct tccactgg	39
65	<210> 39	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 39	
10	aatgcaatta tacagtgagc	20
	<210> 40	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 40	
20	tgagaacaca aagtcgaagc	20
	<210> 41	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 41	
	gcctccctcg cgccatcagt gagaacacaa agtcgaagc	39
	<210> 42	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 42	
	tcttaattgt acttatcagg	20
	<210> 43	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 43	
	tcaatcaagc cagaaggagc	20
55	<210> 44	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 44	
65	gcctccctcg cgccatcagt caatcaagcc agaaggagc	39
	<210> 45	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 45	
10	tcagtgttcc agagggagcc	20
	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 46	
20	atggaagggt tacagcacag	20
	<210> 47	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 47	
	gcctccctcg cgccatcaga tggaagggtt acagcacag	39
	<210> 48	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 48	
	accctgagtg tccaggaggg	20
	<210> 49	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 49	
	ttatagacat tcgttcaaat	20
55	<210> 50	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 50	
65	gcctccctcg cgccatcagt tatagacatt cgttcaaat	39
	<210> 51	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 51	
10	tgactgcac atatgacacc	20
	<210> 52	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 52	
20	cagcaaatg caacagaagg	20
	<210> 53	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 53	
30	gcctccctcg cgccatcagc agcaaatgc aacagaagg	39
	<210> 54	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 54	
	agctgaagtg caactattcc	20
	<210> 55	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 55	
	tctagagaga gcatcaaagg	20
55	<210> 56	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 56	
65	gcctccctcg cgccatcagt ctagagagag catcaaagg	39
	<210> 57	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 57	
	aatgccacca tgaactgcag	20
10	<210> 58	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 58	
20	gaaagagaga aacacagtgg	20
	<210> 59	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 59	
30	gcctccctcg cgccatcagg aaagagagaa acacagtgg	39
	<210> 60	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 60	
	gctctgacat taaactgcac	20
	<210> 61	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 61	
	caggagacgg acagcagagg	20
55	<210> 62	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 62	
	gcctccctcg cgccatcagc aggagacgga cagcagagg	39
65	<210> 63	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 63	
10	atgtgacctt ggactgtgtg	20
	<210> 64	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 64	
20	gagcaaaatg aaataagtgg	20
	<210> 65	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 65	
	gcctccctcg cgccatcagg agcaaaatga aataagtgg	39
	<210> 66	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 66	
	actgcagtta cacagtcagc	20
	<210> 67	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 67	
	agaaagaaag gctaaaagcc	20
55	<210> 68	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 68	
65	gcctccctcg cgccatcaga gaaagaaagg ctaaagcc	39
	<210> 69	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 69	
10	actgcagttt cactgatagc	20
	<210> 70	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 70	
20	caagtggaag acttaatgcc	20
	<210> 71	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 71	
	gcctccctcg cgccatcagc aagtggaaga cttaatgcc	39
	<210> 72	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 72	
	gggagccaat tccacgctgc	20
	<210> 73	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 73	
	atggaagatt aagcgccacg	20
55	<210> 74	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 74	
65	gcctccctcg cgccatcaga tggagatta agcgccacg	39
	<210> 75	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 75	
	atttcaatta taaactgtgc	20
10	<210> 76	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 76	
20	aaggaagatt cacaatctcc	20
	<210> 77	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 77	
	gcctccctcg cgccatcaga aggaagattc acaatctcc	39
	<210> 78	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 78	
	gcaccaattt cacctgcagc	20
	<210> 79	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 79	
	aggacgaata agtgccactc	20
55	<210> 80	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 80	
	gcctccctcg cgccatcaga ggacgaataa gtgccactc	39
65	<210> 81	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 81	
10	tcaccacgta ctgcaattcc	20
	<210> 82	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 82	
20	agactgacat ttcagttgg	20
	<210> 83	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 83	
30	gcctccctcg cgccatcaga gactgacatt tcagttgg	39
	<210> 84	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 84	
	tcgacagatt cmctcccagg	20
	<210> 85	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 85	
	gtccagyacc ttgatcctgc	20
55	<210> 86	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 86	
65	gcctccctcg cgccatcagg tccagyacct tgatcctgc	39
	<210> 87	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 87	
10	cctcaagtgt ttttccagc	20
	<210> 88	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 88	
20	gtgacagtag ttacgggtgg	20
	<210> 89	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 89	
	gcctccctcg cgccatcagg tgacagtagt tacgggtgg	39
	<210> 90	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 90	
	cagcatgttt gattattcc	20
	<210> 91	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 91	
	atctataagt tccattaagg	20
55	<210> 92	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 92	
65	gcctccctcg cgccatcaga tctataagtt ccattaagg	39
	<210> 93	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 93	
10	ctccaaggct ttatattctg	20
	<210> 94	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 94	
20	atgatattac tgaagggtgg	20
	<210> 95	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 95	
	gcctccctcg cgccatcaga tgatattact gaagggtgg	39
	<210> 96	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 96	
	actgcacgtc atcaaagacg	20
	<210> 97	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 97	
	ttgatgatgc tacagaaagg	20
55	<210> 98	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 98	
65	gcctccctcg cgccatcagt tgatgatgct acagaaagg	39
	<210> 99	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 99	
10	tgaactgcac ttctcaagc	20
	<210> 100	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 100	
20	cttgatagcc ttatataagg	20
	<210> 101	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 101	
	gcctccctcg cgccatcagc ttgatagcct tatataagg	39
	<210> 102	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 102	
	tcaattgcag ttatgaagtg	20
	<210> 103	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 103	
	ttatgctaa ctcaagtgg	20
55	<210> 104	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 104	
65	gcctccctcg cgccatcagt ttatgctaac ttcaagtgg	39
	<210> 105	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 105	
10	gcacatatga caccagtgc	20
	<210> 106	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 106	
20	tcgccaagaa gcttataagc	20
	<210> 107	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 107	
	gcctccctcg cgccatcagt cgccaagaag cttataagc	39
	<210> 108	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 108	
	tctactgcaa ttattcaacc	20
	<210> 109	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 109	
	caggaggac gattaatggc	20
55	<210> 110	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 110	
65	gcctccctcg cgccatcagc aggaggacg attaatggc	39
	<210> 111	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 111	
10	tgaactgcac atacacatcc	20
	<210> 112	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 112	
20	acagcaaaaa ctcggagcc	20
	<210> 113	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 113	
	gcctccctcg cgccatcaga cagcaaaaac ttcggagcc	39
	<210> 114	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 114	
	aactgcagtt actcgtagg	20
	<210> 115	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 115	
	aagcatggaa gattaattgc	20
55	<210> 116	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 116	
65	gcctccctcg cgccatcaga agcatggaag attaattgc	39
	<210> 117	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 117	
10	gcagacagac ttgtcactgg	20
	<210> 118	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 118	
20	agtctctcag ctggtacag	20
	<210> 119	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 119	
	gccttgccag cccgctcaga gtctctcagc tggtagacg	39
	<210> 120	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 120	
	aatgaaacgt gagcatctgg	20
	<210> 121	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 121	
	cattgaaaac aagactgtgc	20
55	<210> 122	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 122	
65	gcctccctcg cgccatcagc attgaaaaca agactgtgc	39
	<210> 123	

ES 2 798 119 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 123	
	gtgtcccat ctctaatacac	20
10	<210> 124	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 124	
20	tgaatctca gagaagtctg	20
	<210> 125	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 125	
	gcctccctcg cgccatcagt gaaatctcag agaagtctg	39
	<210> 126	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 126	
	tatgtattgg tataaacagg	20
45	<210> 127	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 127	
55	ctctaagaaa ttctgaaga	20
	<210> 128	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 128	
65	gcctccctcg cgccatcagc tctaagaaat ttctgaaga	39

ES 2 798 119 T3

5	<210> 129 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 129 gtcttgaaa tggaacaac	20
	<210> 130 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 130 ggagctcatg ttgtctaca	20
	<210> 131 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 131 gcctccctcg cgccatcagg gagctcatgt ttgtctaca	39
	<210> 132 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 132 gatcaaaaacg agaggacagc	20
	<210> 133 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 133 caggggcccc agtttatctt	20
	<210> 134 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 134 gcctccctcg cgccatcagc aggggcccga gtttatctt	39
65		

ES 2 798 119 T3

5	<210> 135 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 135 gaaacaragg aaacttcct	20
	<210> 136 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 136 gcctccctcg cgccatcagg aaacaragga aacttcct	39
	<210> 137 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 137 gtgtgccag gatatgaacc	20
	<210> 138 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 138 caggatatga gacataatgc	20
	<210> 139 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 139 ggtatcgaca agaccaggc	20
	<210> 140 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 140 gcctccctcg cgccatcagg gtatcgacaa gaccaggc	39

ES 2 798 119 T3

5	<210> 141 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 141 tagacaagat ctaggactgg	20
	<210> 142 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 142 gcctccctcg cgccatcagt agacaagatc taggactgg	39
	<210> 143 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 143 ctcaggtgtg atccaatttc	20
	<210> 144 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 144 tctaatttac ttccaaggca	20
	<210> 145 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 145 gcctccctcg cgccatcagt ctaatttact tccaaggca	39
	<210> 146 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 146 tcccagagtg atgctcaacg	20

ES 2 798 119 T3

5	<p><210> 147 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
10	<p><400> 147 gcctccctcg cgccatcagt cccagagtga tgctcaacg</p>	39
	<p><210> 148 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
15	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
20	<p><400> 148 actactca attatgaagc</p>	20
	<p><210> 149 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
25	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
30	<p><400> 149 gcctccctcg cgccatcaga cttactcaa ttatgaagc</p>	39
	<p><210> 150 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
35	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
40	<p><400> 150 ccagaatgaa gctcaactag</p>	20
	<p><210> 151 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
45	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
50	<p><400> 151 gcctccctcg cgccatcagc cagaatgaag ctcaactag</p>	39
	<p><210> 152 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
55	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
60	<p><400> 152 gagacctctc tgtgtactgg</p>	20

ES 2 798 119 T3

5	<210> 153 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 153 ctccattcagt attataatgg	20
	<210> 154 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 154 gcctccctcg cgccatcagc tcattcagta ttataatgg	39
	<210> 155 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 155 ggaatcaccg agagcccaag	20
	<210> 156 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 156 gacatgggct gaggctgatc	20
	<210> 157 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 157 gcctccctcg cgccatcagg acatgggctg aggctgatc	39
	<210> 158 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 158 cctaaggatc gattttctgc	20

ES 2 798 119 T3

5	<210> 159 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 159 actctcaaga tccagcctgc	20
	<210> 160 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 160 gcctccctcg cgccatcaga ctctcaagat ccagcctgc	39
	<210> 161 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 161 aggtgacaga gatgggacaa	20
	<210> 162 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 162 tgcagggact ggaattgctg	20
	<210> 163 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 163 gcctccctcg cgccatcagt gcagggactg gaattgctg	39
	<210> 164 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 164 gtacagacag accatgatgc	20

ES 2 798 119 T3

5	<210> 165 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 165 gcctccctcg cgccatcagg tacagacaga ccatgatgc	39
	<210> 166 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 166 ctatcctatc cctagacacg	20
	<210> 167 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 167 aagatgcaga gcgataaagg	20
	<210> 168 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 168 gcctccctcg cgccatcaga agatgcagag cgataaagg	39
	<210> 169 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 169 agatgtgacc caatttctgg	20
	<210> 170 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 170 agtctaaaca ggatgagtcc	20

ES 2 798 119 T3

5	<p><210> 171 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
10	<p><400> 171 gcctccctcg cgccatcaga gtctaaacag gatgagtc</p>	39
	<p><210> 172 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
15	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
20	<p><400> 172 tcagacttg aaccataacg</p>	20
	<p><210> 173 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
25	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
30	<p><400> 173 aaagattta acaatgaagc</p>	20
	<p><210> 174 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
35	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
40	<p><400> 174 gcctccctcg cgccatcaga aagatttaa caatgaagc</p>	39
	<p><210> 175 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
45	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
50	<p><400> 175 tattgtgcc caataaaagg</p>	20
	<p><210> 176 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
55	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
60	<p><400> 176 aatgtcttg atgaaacagg</p>	20

ES 2 798 119 T3

5	<p><210> 177 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
10	<p><400> 177 gcctccctcg cgccatcaga atgtcttga tgaacagg</p>	39
15	<p><210> 178 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
20	<p><400> 178 atccatcttc tggcacatg</p>	20
25	<p><210> 179 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
30	<p><400> 179 aacattgcag ttgattcagg</p>	20
35	<p><210> 180 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
40	<p><400> 180 gcctccctcg cgccatcaga acattgcagt tgattcagg</p>	39
45	<p><210> 181 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
50	<p><400> 181 gcagcccaat gaaaggacac</p>	20
55	<p><210> 182 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
60	<p><400> 182 aatatcatag atgagtcagg</p>	20

ES 2 798 119 T3

5	<p><210> 183 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
10	<p><400> 183 gcctccctcg cgccatcaga atatcataga tgagtcagg</p>	39
15	<p><210> 184 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
20	<p><400> 184 tgaacagaat tgaaccagc</p>	20
25	<p><210> 185 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
30	<p><400> 185 ttcagaaag gagatagc</p>	20
35	<p><210> 186 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
40	<p><400> 186 gcctccctcg cgccatcagt ttcagaaagg agatagc</p>	39
45	<p><210> 187 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
50	<p><400> 187 tcgagtgccg ttcctggac</p>	20
55	<p><210> 188 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
60	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
65	<p><400> 188 gatggcaact tccaatgagg</p>	20

ES 2 798 119 T3

5 <210> 189
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 189
 10 gcctccctcg cgccatcagg atggcaactt ccaatgagg 39
 <210> 190
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 20 <400> 190
 gcaaagatgg attgtgtcc 20
 <210> 191
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 30 <400> 191
 cgctggaaga agagctcaag 20
 <210> 192
 <211> 39
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 40 <400> 192
 gcctccctcg cgccatcagc gctggaagaa gagctcaag 39
 <210> 193
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 193
 55 catttgtca aaggaaaagg 20
 <210> 194
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 194
 65 gaatgaacaa gttcttcaag 20

ES 2 798 119 T3

5	<p><210> 195 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
10	<p><400> 195 gcctccctcg cgccatcagg aatgaacaag ttctcaag</p>	39
15	<p><210> 196 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
20	<p><400> 196 atgctggaat gttctcagac</p>	20
25	<p><210> 197 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
30	<p><400> 197 gtcaaagata taaacaaagg</p>	20
35	<p><210> 198 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
40	<p><400> 198 gcctccctcg cgccatcagg tcaaagatat aaacaaagg</p>	39
45	<p><210> 199 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
50	<p><400> 199 ctctggaatg ttctcaaacc</p>	20
55	<p><210> 200 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
60	<p><400> 200 taattccaca gagaaggag</p>	20
65		

ES 2 798 119 T3

5	<210> 201 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 201 gcctccctcg cgccatcagt aattccacag agaaggag	39
15	<210> 202 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 202 cccagaatat gaatcatgtt	20
25	<210> 203 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 203 attcactgg cactgggagc	20
35	<210> 204 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 204 gcctccctcg cgccatcaga ttcactggc actgggagc	39
45	<210> 205 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 205 ttgttctcag aatatgaacc	20
55	<210> 206 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 206 tgagtgact gataaggag	20

ES 2 798 119 T3

5	<210> 207 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 207 gcctccctcg cgccatcagt gaggtgactg ataagggag	39
	<210> 208 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 208 atgtgtccag gatatggacc	20
	<210> 209 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 209 aaaaggagat attcctgagg	20
	<210> 210 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 210 gcctccctcg cgccatcaga aaaggagata ttctgagg	39
	<210> 211 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 211 tcaccatgat gttctggtac	20
	<210> 212 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 212 ctggacagag cctgacactg	20

ES 2 798 119 T3

5	<p><210> 213 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
10	<p><400> 213 gcctccctcg cgccatcagc tggacagagc ctgacactg</p>	39
	<p><210> 214 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
15	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
20	<p><400> 214 tgtggaggga acatcaaacc</p>	20
	<p><210> 215 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
25	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
30	<p><400> 215 ttctactccg ttgtattgg</p>	20
	<p><210> 216 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
35	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
40	<p><400> 216 gcctccctcg cgccatcagt tctactccgt ttgtattgg</p>	39
	<p><210> 217 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
45	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
50	<p><400> 217 gtgtggcctt tgggtgtgg</p>	20
	<p><210> 218 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
55	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
60	<p><400> 218 tctgatggct caaacacagc</p>	20
	<p><210> 218 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
65	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	

ES 2 798 119 T3

5	<210> 219 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 219 gccttgccag cccgctcagt ctgatggctc aaacacagc	39
	<210> 220 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 220 tgtatgaaac aagttggtg	20
	<210> 221 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 221 cagaatgcaa aaagtgtcg	20
	<210> 222 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 222 gcctccctcg cgccatcagc agaatgcaaa aagtgtcg	39
	<210> 223 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 223 atgaaaggag aagcgatcgg	20
	<210> 224 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 224 tggttcaaa gacaattcc	20

ES 2 798 119 T3

5	<p><210> 225 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
10	<p><400> 225 gcctccctcg cgccatcagt ggttcaaag acaattcc</p>	39
	<p><210> 226 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
15	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
20	<p><400> 226 gacactgtat attcaaatcc</p>	20
	<p><210> 227 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
25	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
30	<p><400> 227 gcagatttta ctcaaggacg</p>	20
	<p><210> 228 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
35	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
40	<p><400> 228 gcctccctcg cgccatcagg cagattttac tcaaggacg</p>	39
	<p><210> 229 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
45	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
50	<p><400> 229 agacaagcga catttgtcc</p>	20
	<p><210> 230 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
55	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
60	<p><400> 230 acggatgggt tggtatgagg</p>	20
	<p><210> 230 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
65	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	

ES 2 798 119 T3

5	<210> 231 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 231 gccttgccag cccgctcaga cggatggttt ggtatgagg	39
	<210> 232 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 232 gggatcatctg ctgaaatcac	20
	<210> 233 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 233 aggaggggaa ggccccacag	20
	<210> 234 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 234 gcctccctcg cgccatcaga ggaggggaag gccccacag	39
	<210> 235 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 235 gggatcatcag ctgtaatcac	20
	<210> 236 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 236 aggaggggaa gacccccacag	20

ES 2 798 119 T3

5	<210> 237 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 237 gcctccctcg cgccatcaga ggaggggaag accccacag	39
15	<210> 238 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 238 agcccgctg gaatgtgtg	20
25	<210> 239 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 239 gcactgtcag aaaggaatcc	20
35	<210> 240 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 240 gcctccctcg cgccatcagg cactgtcaga aaggaatcc	39
45	<210> 241 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 241 aagaaaagta tgacatacc	20
55	<210> 242 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
65	<400> 242 atattgtctc acaaaaatcc	20

ES 2 798 119 T3

5
 <210> 243
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

10
 <400> 243
 gcctccctcg cgccatcaga tattgtctca acaaaatcc 39

15
 <210> 244
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

20
 <400> 244
 agagtgccca catatcttg 20

25
 <210> 245
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

30
 <400> 245
 gctcaagatt gctcaggtg 20

35
 <210> 246
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

40
 <400> 246
 gcctccctcg cgccatcagg ctcaagattg ctcaggtg 39

45
 <210> 247
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

55
 <400> 247
 ggatcccaga atcgtgtgc 20

60
 <210> 248
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

65
 <400> 248
 ggtatgtcc agccttctg 20

ES 2 798 119 T3

5	<210> 249 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 249 gccttgccag cccgctcagg gtatgtcca gccttctgg	39
	<210> 250 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 250 agtgaaggtc tctgcaagg	20
	<210> 251 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 251 agtgaaggtt tctgcaagg	20
	<210> 252 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 252 agttccaggg cagagtcac	19
	<210> 253 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 253 gcctccctcg cgccatcaga gttccagggc agagtcac	38
	<210> 254 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 254 agtttcaggg cagggtcac	19

ES 2 798 119 T3

5	<210> 255 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 255 gcctccctcg cgccatcaga gtttcagggc agggtcac	38
	<210> 256 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 256 agtccagga aagagtcac	19
	<210> 257 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 257 gcctccctcg cgccatcaga gtccaggaa agagtcac	38
	<210> 258 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 258 aattccagga cagagtcac	19
	<210> 259 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 259 gcctccctcg cgccatcaga attccaggac agagtcac	38
	<210> 260 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 260 tctctgggtt ctactcagc	20

ES 2 798 119 T3

5	<p><210> 261 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
10	<p><400> 261 aaggcctgg agtggtgc</p>	20
15	<p><210> 262 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
20	<p><400> 262 gcctccctcg cgccatcaga aggcctgga gttggtgc</p>	39
25	<p><210> 263 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
30	<p><400> 263 tcctgagac tctctgtgc</p>	20
35	<p><210> 264 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
40	<p><400> 264 ctctctgtg cagcctctgg</p>	20
45	<p><210> 265 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
50	<p><400> 265 ggtccctgag actctctgt</p>	20
55	<p><210> 266 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
60	<p><400> 266 ctgagactct cctgtgtagc</p>	20
65		

ES 2 798 119 T3

5	<p><210> 267 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
10	<p><400> 267 ctccagggaa ggggctgg</p>	18
15	<p><210> 268 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
20	<p><400> 268 gcctccctcg cgccatcagc tccaggaag gggctgg</p>	37
25	<p><210> 269 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
30	<p><400> 269 ggctccaggc aagggct</p>	18
35	<p><210> 270 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
40	<p><400> 270 gcctccctcg cgccatcagg gctccaggca aggggct</p>	37
45	<p><210> 271 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
50	<p><400> 271 actgggtccg ccaggctcc</p>	19
55	<p><210> 272 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
60	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
65	<p><400> 272 gcctccctcg cgccatcaga ctgggtccgc caggctcc</p>	38

ES 2 798 119 T3

5	<p><210> 273 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
10	<p><400> 273 gaaggggctg gagtgggt</p>	18
15	<p><210> 274 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
20	<p><400> 274 gcctccctcg cgccatcagg aaggggctgg agtgggt</p>	37
25	<p><210> 275 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
30	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
	<p><400> 275 aaaaggtctg gagtgggt</p>	18
35	<p><210> 276 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
40	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
45	<p><400> 276 gcctccctcg cgccatcaga aaaggtctgg agtgggt</p>	37
50	<p><210> 277 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
55	<p><400> 277 agacctgtc cctcacctgc</p>	20
60	<p><210> 278 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
65	<p><400> 278 agggvctgga gtggattgg</p>	20

ES 2 798 119 T3

5 <210> 279
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 279
 10 gcctccctcg cgccatcaga gggvctggag tggattggg 39
 <210> 280
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 20 <400> 280
 gcgccagatg cccgggaaag 20
 <210> 281
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 30 <400> 281
 ggccasgtca ccatctcagc 20
 <210> 282
 <211> 39
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 40 <400> 282
 gcctccctcg cgccatcagg gccasgtcac catctcagc 39
 <210> 283
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 283
 55 ccggggacag tgtctctagc 20
 <210> 284
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 284
 65 gccttgagtg gctggaagg 20

ES 2 798 119 T3

5	<210> 285 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 285 gcctccctcg cgccatcagg ccttgagtgg ctggaagg	39
15	<210> 286 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 286 gtttctgca aggctctgg	20
25	<210> 287 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 287 ggcttgagt gatggatgg	20
35	<210> 288 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 288 gcctccctcg cgccatcagg gcttgagtgg atgggatgg	39
45	<210> 289 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 289 acctgaggag acggtgacc	19
55	<210> 290 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
65	<400> 290 cagtgctgga agtattcagc	20

ES 2 798 119 T3

5	<p><210> 291 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
10	<p><400> 291 gccttgccag cccgctcagc agtgctgga gtttcagc</p>	39
	<p><210> 292 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
15	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
20	<p><400> 292 agagatcgaa gtaccagtag</p>	20
	<p><210> 293 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
25	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
30	<p><400> 293 gccttgccag cccgctcaga gagatcgaag taccagtag</p>	39
	<p><210> 294 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
35	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
40	<p><400> 294 cccagatat caaaagcatc</p>	20
	<p><210> 295 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
45	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
50	<p><400> 295 gccttgccag cccgctcagc cccagatatc aaaagcatc</p>	39
	<p><210> 296 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
55	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
60	<p><400> 296 ggccccagta gtcaaagtag</p>	20

ES 2 798 119 T3

5	<210> 297 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 297 gccttgccag cccgctcagg gccccagtag tcaaagtag	39
	<210> 298 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 298 cccaggggtc gaaccagttg	20
	<210> 299 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 299 gccttgccag cccgctcagc ccaggggtcg aaccagttg	39
	<210> 300 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 300 cccagacgtc catgtagtag	20
	<210> 301 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 301 gccttgccag cccgctcagc ccagacgtcc atgtagtag	39
	<210> 302 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 302 taggagacag agtcaccatc	20

ES 2 798 119 T3

5	<210> 303 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 303 ttcagygrca gtggatctgg	20
15	<210> 304 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 304 gcctccctcg cgccatcagt tcagygrcag tggatctgg	39
25	<210> 305 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 305 ggagagccgg cctccatctc	20
35	<210> 306 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 306 tggtaactgc agaagccagg	20
45	<210> 307 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 307 gcctccctcg cgccatcagt ggtacctgca gaagccagg	39
55	<210> 308 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
65	<400> 308 cttcagcaga gccaggcca	20

ES 2 798 119 T3

5	<210> 309 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 309 gcctccctcg cgccatcagc ttcagcagag gccaggcca	39
	<210> 310 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 310 gcctggtacc agcagaaacc	20
	<210> 311 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 311 gccaggttca gtggcagtgg	20
	<210> 312 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 312 gcctccctcg cgccatcagg ccaggttcag tggcagtgg	39
	<210> 313 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 313 tcgaggttca gtggcagtgg	20
	<210> 314 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 314 gcctccctcg cgccatcagt cgaggttcag tggcagtgg	39
	<210> 314 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	

ES 2 798 119 T3

5	<p><210> 315 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
10	<p><400> 315 gaccgattca gtggcagcgg</p>	20
	<p><210> 316 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
15	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
20	<p><400> 316 gcctccctcg cgccatcagg accgattcag tggcagcgg</p>	39
	<p><210> 317 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
25	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
30	<p><400> 317 ttcaactgct catcagatgg</p>	20
	<p><210> 318 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
35	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
40	<p><400> 318 atgaagacag atggtgcagc</p>	20
	<p><210> 319 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
45	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
50	<p><400> 319 gccttgccag cccgctcaga tgaagacaga tggcagc</p>	39
	<p><210> 320 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
55	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	
60	<p><400> 320 gggcagaggg tcaccatctc</p>	20
	<p><210> 320 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
65	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético</p>	

ES 2 798 119 T3

5	<210> 321 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 321 ggacagaagg tcaccatctc	20
	<210> 322 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 322 tggaccagc agctcccagg	20
	<210> 323 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 323 gcctccctcg cgccatcagt ggtaccagca gctcccagg	39
	<210> 324 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 324 tggaccagc agctcccagg	20
	<210> 325 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 325 gcctccctcg cgccatcagt ggtaccagca gctcccagg	39
	<210> 326 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 326 ctgcactgga accagcagtg	20

ES 2 798 119 T3

5	<210> 327 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 327 tctctggctc caagtctggc	20
	<210> 328 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 328 gcctccctcg cgccatcagt ctctggctcc aagtctggc	39
	<210> 329 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 329 accagcagaa gccaggccag	20
	<210> 330 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 330 gaagccagga caggcccctg	20
	<210> 331 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 331 ctgagcgatt ctctggctcc	20
	<210> 332 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 332 gcctccctcg cgccatcagc tgagcgattc tctggctcc	39

ES 2 798 119 T3

5	<210> 333 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 333 ttctctgggt ccacctcagg	20
	<210> 334 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 334 gcctccctcg cgccatcagt tctctgggtc cacctcagg	39
	<210> 335 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 335 ttctctggct ccagctcagg	20
	<210> 336 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 336 gcctccctcg cgccatcagt tctctgggtc cagctcagg	39
	<210> 337 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 337 tcggtcaagc tcacctgcac	20
	<210> 338 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 338 gcctccctcg cgccatcagg ggctgaccgc tacctcacc	39
	<210> 338 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	

ES 2 798 119 T3

5	<210> 339 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 339 cagcctgtgc tgactcagcc	20
	<210> 340 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 340 ccagccgctt ctctggatcc	20
	<210> 341 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 341 gcctccctcg cgccatcagc cagccgcttc tctggatcc	39
	<210> 342 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 342 ccatctcctg caccgcagc	20
	<210> 343 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 343 tccccwggag ggacagtcac	20
	<210> 344 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 344 ctcnctgca ccctgagcag	20
	<210> 344 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	

ES 2 798 119 T3

5	<210> 345 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 345 agaccgccac actcacctgc	20
15	<210> 346 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 346 ctgatcgstt ctctggctcc	20
25	<210> 347 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 347 gcctccctcg cgccatcagc tgatcgsttc tctggctcc	39
35	<210> 348 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 348 ctgcccgggtt ctcaggctcc	20
45	<210> 349 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 349 atccaggaag aggatgagag	20
55	<210> 350 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
65	<400> 350 gcctccctcg cgccatcaga tccaggaaga ggatgagag	39

ES 2 798 119 T3

5	<210> 351 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 351 ctccagcctg aggacgaggc	20
	<210> 352 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 352 gcctccctcg cgccatcagc tccagcctga ggacgaggc	39
	<210> 353 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 353 gctcccgggt agaagtcaact	20
	<210> 354 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 354 agtgtggcct tgttgcttg	20
	<210> 355 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 355 gccttgccag cccgctcaga gtgtggcctt gttggcttg	39
	<210> 356 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 356 gcctccctcg cgccatcag	19

ES 2 798 119 T3

5	<210> 357 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 357 gccttgccag cccgctcag	19
15	<210> 358 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 358 gggctgaccg ctacctcacc	20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método implementado por ordenador para analizar informaciones de secuencia semicuantitativas para identificar y caracterizar el inmunoperfil de un ser humano o animal como normal o como que es probable que indique la presencia de una enfermedad, comprendiendo el método las etapas de:
- 10 (a) identificar una o más secuencias distintas de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que se comparten entre el inmunoperfil del sujeto y un inmunoperfil acumulativo de una biblioteca de enfermedades que representa una enfermedad específica almacenada en una base de datos;
- 15 (b) sumar un número total de las secuencias detectadas del sujeto que corresponden a esas secuencias distintas de CDR3 compartidas;
- (c) calcular el porcentaje del número total de secuencias detectadas en el inmunoperfil del sujeto que son representativas de esas CDR3 distintas compartidas entre el inmunoperfil del sujeto y la biblioteca de enfermedades para crear uno o más índices de compartición originales;
- 20 (d) seleccionar al azar secuencias de una biblioteca pública almacenada en una base de datos para formar una sub-biblioteca, comprendiendo la sub-biblioteca un número de secuencias de CDR3 distintas que es aproximadamente igual al número de secuencias de CDR3 distintas en la biblioteca de enfermedades;
- (e) identificar una o más secuencias de CDR3 distintas que se comparten entre el inmunoperfil del sujeto y la sub-biblioteca;
- 25 (f) sumar un número total de secuencias detectadas que corresponden a esas secuencias de CDR3 compartidas y calcular un porcentaje del número total de secuencias detectadas en el inmunoperfil del sujeto que se comparten entre el inmunoperfil del sujeto y la sub-biblioteca, para crear un índice de compartición de muestreo;
- (g) repetir las etapas (d) - (f) durante una cantidad de veces suficiente para producir un resultado que sea estadísticamente significativo para identificar y caracterizar el inmunoperfil de dicho sujeto como normal o como que es probable que indique la presencia de una enfermedad;
- 30 (h) estimar el valor de P como la fracción de veces que los índices de compartición de muestras son mayores que o iguales al índice de compartición original entre el inmunoperfil de dicho sujeto y la biblioteca de enfermedades;
- (i) caracterizar el inmunoperfil del sujeto como normal si el valor de P estimado es superior a 0,01, o caracterizar el inmunoperfil del sujeto como que es probable que indique la presencia de la enfermedad representada por la biblioteca de enfermedades, si el valor de P estimado es inferior a 0,01.
- 35 2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa (g) comprende repetir las etapas (d) - (f) al menos 1 000 veces o más.
- 40 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la etapa (a) está precedida por una amplificación semicuantitativa y una secuenciación de CDR3 distintas de dicho sujeto, en donde dicha amplificación semicuantitativa y secuenciación comprende las etapas de:
- 45 (i) aislar una subpoblación de leucocitos de dicho sujeto;
- (ii) aislar ARN de la subpoblación de células;
- (iii) amplificar el ARN utilizando RT-PCR en una primera reacción de amplificación para producir amplicones utilizando cebadores anidados, comprendiendo al menos una parte de los cebadores anidados, nucleótidos adicionales para incorporar en un amplicón resultante un sitio de unión para un cebador comunitario;
- 50 (iv) separar los amplicones de la primera reacción de amplificación de uno o más cebadores no utilizados de la primera reacción de amplificación;
- (v) amplificar, mediante la adición de cebadores comunitarios en una segunda reacción de amplificación, teniendo los amplicones de la primera reacción de amplificación, al menos un sitio de unión para un cebador comunitario, en donde el producto de la segunda reacción de amplificación es los polinucleótidos que comprenden CDR3 distintas; y
- 55 (vi) secuenciar los amplicones de la segunda reacción de amplificación para identificar reordenaciones de anticuerpos y/o receptores en la subpoblación de células;
- en donde la amplificación y secuenciación de las etapas (v) y (vi) proporcionan información de secuencias semicuantitativas para distintas CDR3 del sujeto.
- 60 4. El método de la reivindicación 3, en donde la etapa de aislar una subpoblación de leucocitos se realiza por citometría de flujo.
- 65 5. El método de la reivindicación 3, en donde la subpoblación de leucocitos comprende linfocitos T.
6. El método de la reivindicación 5, en donde los linfocitos T se seleccionan del grupo que consiste en linfocitos T vírgenes, linfocitos T maduros y linfocitos T de memoria.
7. El método de la reivindicación 3, en donde la subpoblación de leucocitos comprende linfocitos B.
8. El método de la reivindicación 7, en donde los linfocitos B se seleccionan del grupo que consiste en linfocitos B

vírgenes, linfocitos B maduros y linfocitos B de memoria.

- 5 9. El método de la reivindicación 3, en donde las reordenaciones en las subpoblaciones de células se seleccionan del grupo que consiste en reordenaciones de cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) de linfocitos B, cadenas ligeras kappa de linfocitos B, lambda de linfocitos B, receptor Beta de linfocitos T, Gamma de linfocitos T y Delta de linfocitos T.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

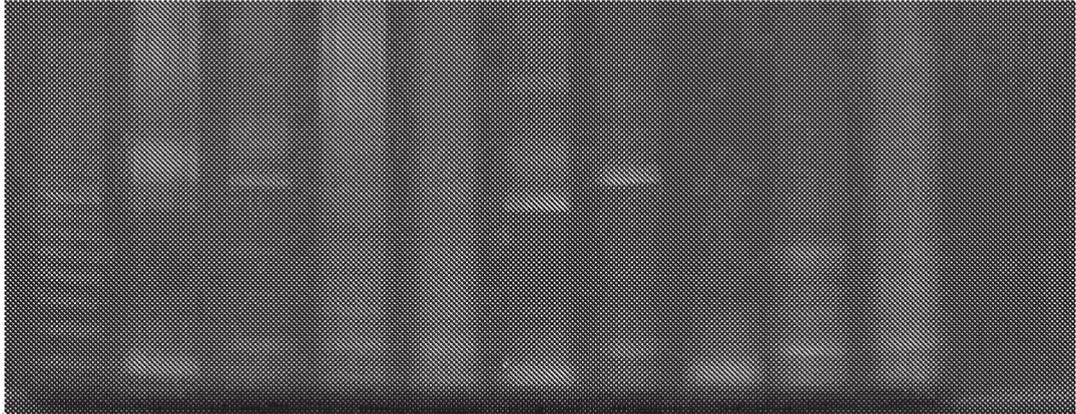


FIG. 1a

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

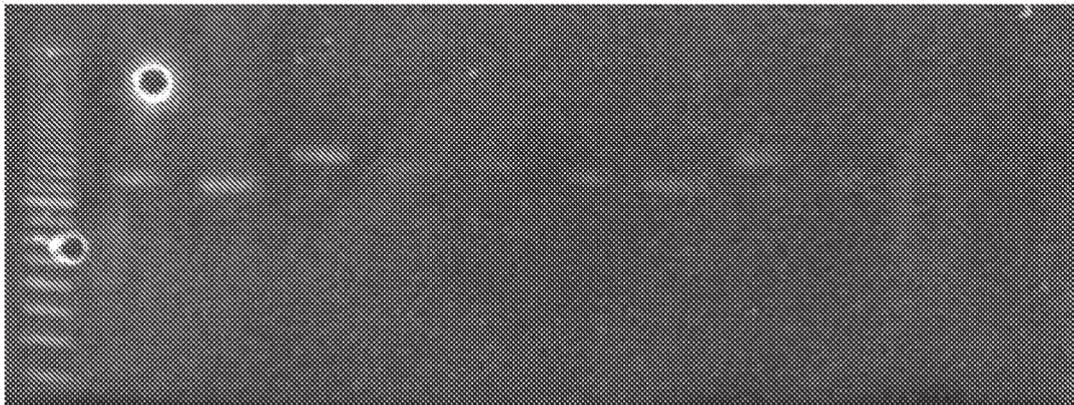


FIG. 1b

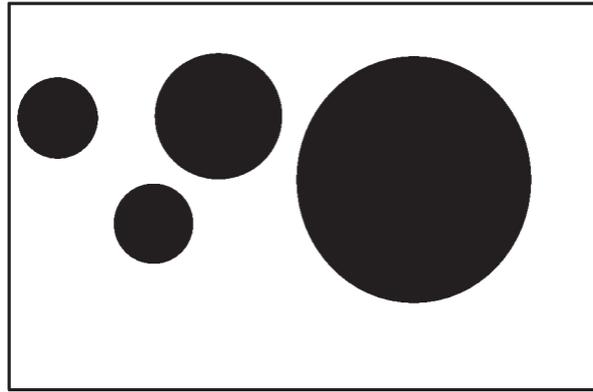


FIG. 2a

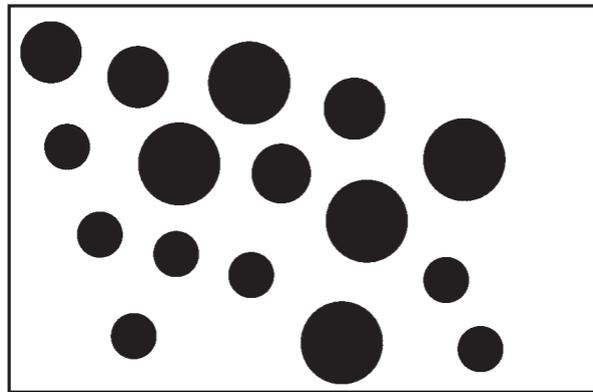


FIG. 2b

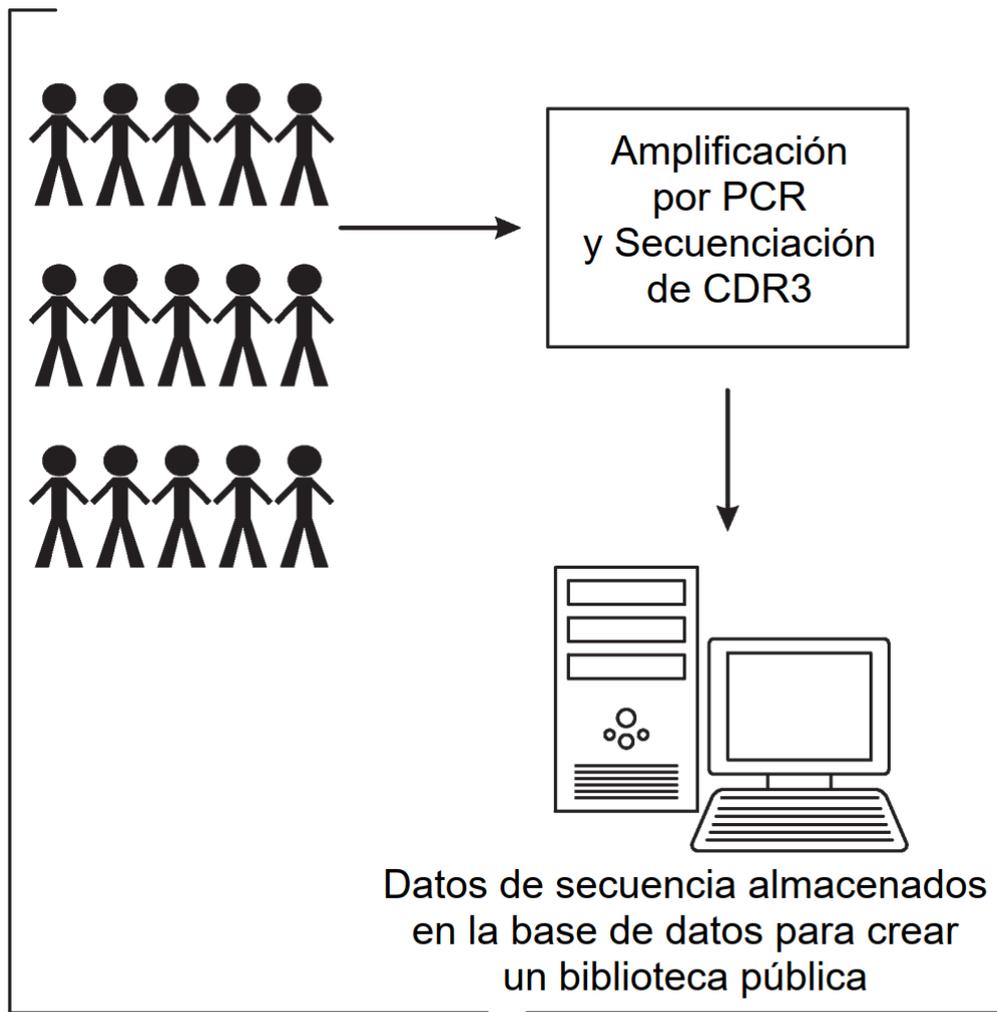


FIG. 3

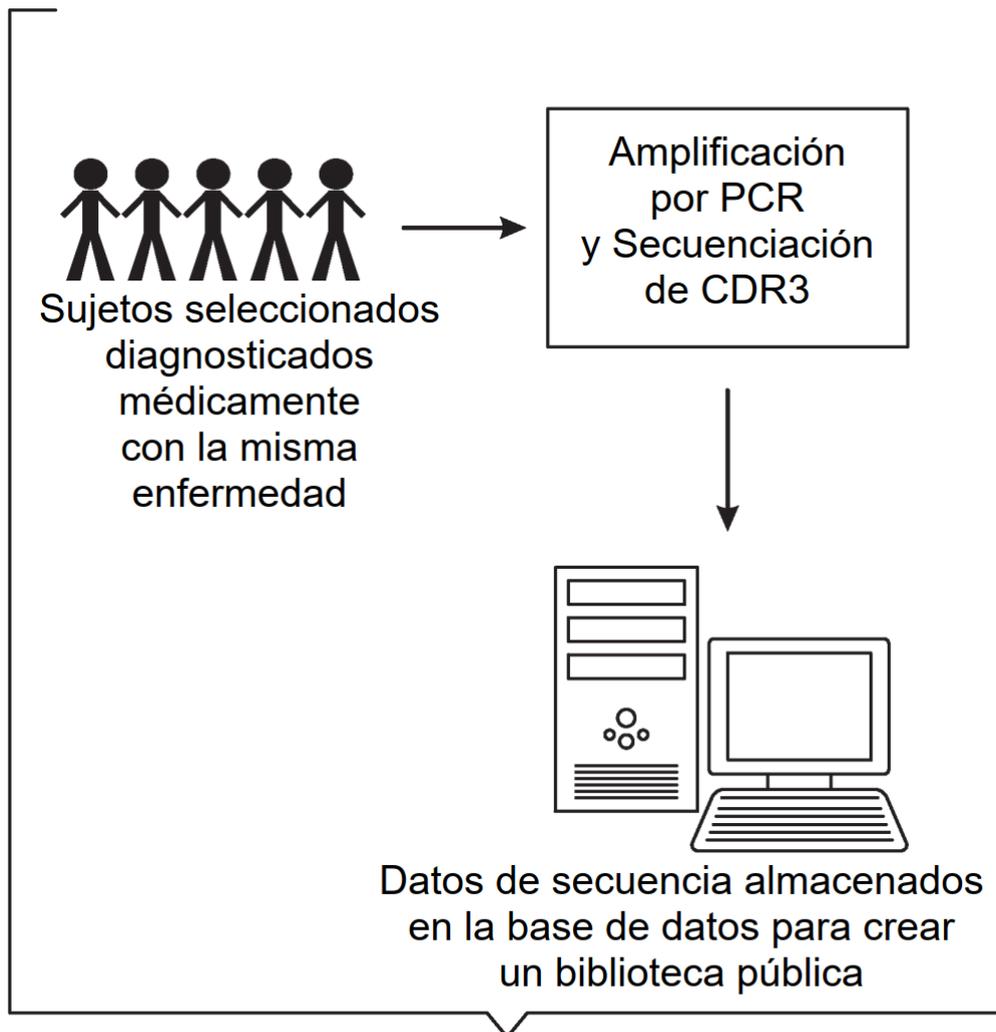


FIG. 4

CDR3	Recuento de lectura	Porcentaje	¿Se comparte?
CDR3 ₁	120345	0,0602%	Sí
CDR3 ₂	1542	0,0008%	No
CDR3 ₃	4530	0,0023%	No
CDR3 ₄	8762	0,0044%	Sí
CDR3 ₅	689	0,0003%	No
CDR3 ₆	325	0,0002%	No
CDR3 ₇	8452	0,0042%	Sí
CDR3 ₈	23540	0,0118%	Sí
CDR3 ₉	3841	0,0019%	No
CDR3 _n	20	0,0000%	No
Suma			0,0805495%

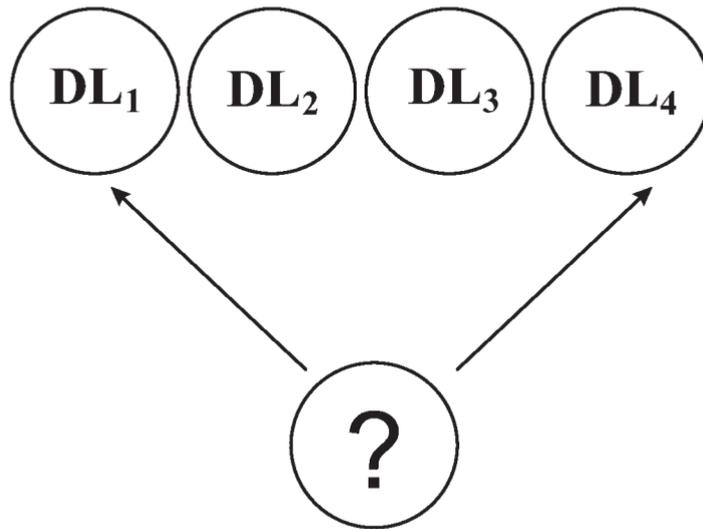
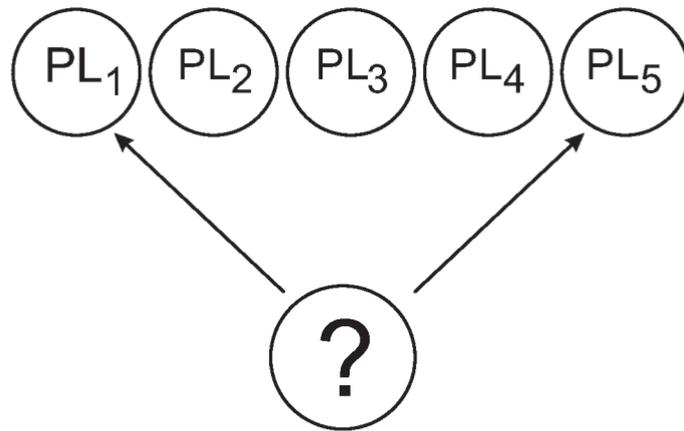


FIG. 5



CDR3	Recuento de lectura	Porcentaje	¿Se comparte?
CDR3 ₁	120345	0,0602%	N
CDR3 ₂	1542	0,0008%	S
CDR3 ₃	4530	0,0023%	S
CDR3 ₄	8762	0,0044%	N
CDR3 ₅	689	0,0003%	S
CDR3 ₆	325	0,0002%	S
CDR3 ₇	8452	0,0042%	N
CDR3 ₈	23540	0,0118%	N
CDR3 ₉	3841	0,0019%	N
CDR3 _n	20	0,0000%	S
Suma			0,003553%

FIG. 6

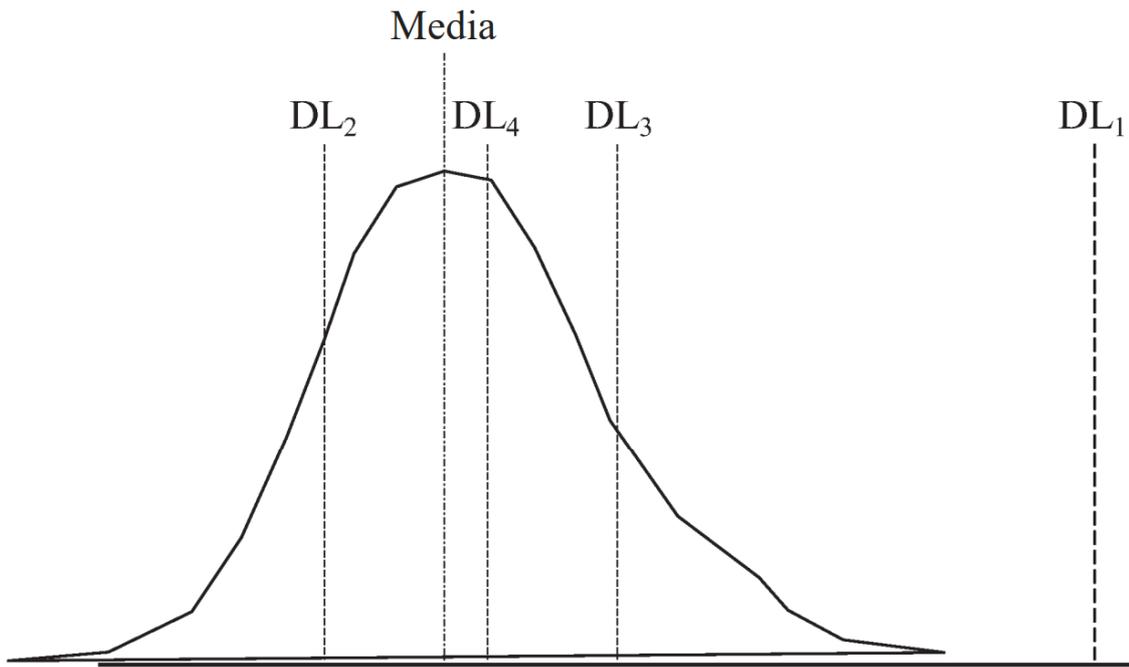


FIG. 7