(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 346 967**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04702177 .9**
(96) Fecha de presentación : **14.01.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1587957**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

(54) Título: **Marcadores de expresión génica para la prognosis del cáncer de mama.**

(30) Prioridad: **15.01.2003 US 440861 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.10.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.10.2010

(73) Titular/es: **Genomic Health, Inc.**
301 Penobscot Drive
Redwood City, California 94063, US
Rush University Medical Center

(72) Inventor/es: **Cobleigh, Melody, A.;**
Shak, Steve;
Baker, Joffre, B. y
Cronin, Maureen, T.

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Marcadores de expresión génica para la prognosis del cáncer de mama.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

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

Descripción de la técnica afín

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

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

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

Adicionalmente, WO 02/10436 A2 describe series particulares de genes que se expresan diferencialmente en tumores caracterizados como tumores de MAI alta o MAI baja, series de genes que pueden utilizarse para discriminar entre tumores de MAI alta y baja, así como ensayos de diagnóstico para clasificación de tumores, predicción del desenlace de un tumor, selección y monitorización de regímenes de tratamiento y monitorización de la progresión/regresión del tumor.

Van't Veer L.J. *et al*., "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer", Nature. 2002 Jan 31; 415(6871):530-6, describen el uso del análisis de microrredes de DNA en tumores de mama primarios de 117 pacientes jóvenes, y la aplicación de una clasificación supervisada para identificar una huella de la expresión génica fuertemente predictiva de un intervalo corto para metástasis distantes (huella de "mala prognosis") en pacientes sin células tumorales en ganglios linfáticos locales en el momento de la diagnosis (ganglio linfático negativo).

Leek R.D. *et al*., "Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma", Cancer Res. 1996 Oct 15;56(20):4625-9, después de haber cuantificado la infiltración de macrófagos utilizando la morfometría de recuento de Chalkley en una serie de carcinomas de mama invasivos, describen que existía una coloración positiva importante entre el grado vascular alto y el índice de macrófagos incrementado (P = 0,03), y se observó una fuerte relación entre los recuentos incrementados de macrófagos y la supervivencia reducida sin recaída (P = 0,006) y la supervivencia global reducida (P = 0,004) como variable independiente de pronóstico.

Sin embargo, ninguno de estos tres documentos describe los métodos o usos de la presente invención.

Aunque la biología y la bioquímica moleculares modernas han descubierto centenares de genes cuyas actividades influyen en el comportamiento de las células tumorales, el estado de su diferenciación, y su sensibilidad o resistencia a ciertos fármacos terapéuticos, con unas pocas excepciones, el estado de estos genes no ha sido aprovechado para el

propósito de tomar rutinariamente decisiones clínicas acerca de los tratamiento con fármacos. Una excepción notable es el uso de la expresión de la proteína receptora de estrógenos (ER) en carcinomas de mama para seleccionar pacientes para el tratamiento con fármacos anti-estrógenos, tales como tamoxifeno. Otro ejemplo excepcional es el uso de la expresión de la proteína ErbB2 (Her2) en carcinomas de mama para seleccionar pacientes con el fármaco antagonista de Her2 Herceptina® (Genentech, Inc., South San Francisco, CA).

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

Sumario de la invención

La invención se refiere a un método de predicción de la probabilidad de supervivencia a largo plazo de un paciente de cáncer con mama sin recurrencia del cáncer de mama, que comprende determinar el nivel de expresión del transcrito de RNA de CD68 en una muestra de tejido de cáncer de mama obtenida de dicho paciente, normalizado contra el nivel de expresión de todos los transcritos de RNA o sus productos en dicha muestra, o de una serie de referencia de transcritos de RNA o sus productos de expresión, en donde la expresión de CD68 indica una probabilidad reducida de supervivencia a largo plazo sin recurrencia del cáncer de mama.

El cáncer de mama puede ser carcinoma ductal de mama invasivo.

En una realización, el método comprende adicionalmente determinar los niveles de expresión de los transcritos de RNA de cualquiera de los genes siguientes: GRB7, CTSL, Chk1, Her2, STK15, AIB1, SURV, EGFR, MYBL2, HIF1α, o sus productos de expresión, en donde la expresión de dichos genes o sus productos de expresión por encima de un umbral de expresión definido, indica una probabilidad reducida de supervivencia a largo plazo sin recurrencia del cáncer de mama.

En otra realización, el método comprende adicionalmente determinar los niveles de expresión de los transcritos de RNA de los genes siguientes: CTSL, FBX05, SURV, CCNB1, MCM2, Chk1, MYBL2, HIF1A, cMET, EGFR, TS, y STK15, o sus productos de expresión, en donde la expresión de dichos genes o sus productos de expresión por encima de un umbral de expresión definido indica una probabilidad reducida de supervivencia a largo plazo sin recurrencia del cáncer de mama.

Dicho RNA puede aislarse de un espécimen de tejido de cáncer de mama fijado incrustado en parafina de dicho paciente.

En una realización, la invención concierne al uso de una red que comprende polinucleótidos que se hibridan a los genes siguientes:

(a) CD68, GRB7, CTSL, Chk1, Her2, STK15, AIB1, SURV, EGFR, MYBL2, y HIF1α; o

(b) CD68, GRB7, TOP2A, Bcl2, DIABLO, CD3, ID1, PPM1D, MCM6, y WISP1; o

(c) CD68, BBC3, GRB7, PRAME, TOP2A, CCNB1, EPHX1, CTSL, GSTM1, y APC; o

(d) CD68, CD9, GRB7, TOP2A, Bcl2, CCNB1, CD3, DIABLO, ID1, y PPM1D; o

(e) CD68, CTSL, FBX05, SURV, CCNB1, MCM2, Chk1, MYBL2, HIF1A, cMET, EGFR, TS, y STK15

para predecir la probabilidad de supervivencia a largo plazo de un paciente de cáncer de mama sin recurrencia del cáncer de mama.

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

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

Se describe también un método de predicción de la probabilidad de supervivencia a largo plazo de un paciente de cáncer de mama sin la recurrencia del cáncer de mama, que comprende determinar el nivel de expresión de uno o más transcritos de RNA de pronóstico o sus productos de expresión en una muestra de tejido de cáncer de mama obtenida del paciente, normalizado contra el nivel de expresión de todos los transcritos de RNA o sus productos en la muestra de tejido de cáncer de mama, o de una serie de referencia de transcritos de RNA o sus productos de expresión, en donde el transcrito de RNA de pronóstico es el transcrito de uno o más genes seleccionados del grupo constituido por TP53BP2, GRB7, PR, CD68, Bcl2, KRT14, IRS1, CTSL, EstR1, Chk1, IGFBP2, BAG1, CEGP1, STK15, GSTM1, FHIT, RIZ1, AIB1, SURV, BBC3, IGF1R, p27, GATA3, ZNF217, EGFR, CD9, MYBL2, HIF1α, pS2, ErbB3, TOP2B, MDM2, RAD51C, KRT19, TS, Her2, KLK10, β-Catenina, γ-Catenina, MCM2, PI3KC2A, IGF1, TBP, CCNB1, FBX05, y DR5,

en donde la expresión de uno o más de GRB7, CD68, CTSL, Chk1, AIB1, CCNB1, MCM2, FBX05, Her2, STK15, SURV, EGFR, MYBL2, HIF1α, y TS indica una probabilidad reducida de supervivencia a largo plazo sin la recurrencia del cáncer de mama, y

la expresión de uno o más de TP53BP2, PR, Bcl2, KRT14, EstR1, IGFBP2, BAG1, CEGP1, KLK10, β-Catenina, γ-Catenina, DR5, PI3KCA2, RAD51C, GSTM1, FHIT, RIZ1, BBC3, TBP, p27, IRS1, IGF1R, GATA3, ZNF217, CD9, pS2, ErbB3, TOP2B, MDM2, IGF1, y KRT19 indica una probabilidad incrementada de supervivencia a largo plazo sin recurrencia del cáncer de mama.

Los niveles de expresión de al menos dos o al menos 5, o al menos 10, o al menos 15 de los transcritos de RNA de pronóstico o sus productos de expresión pueden determinarse. El método puede comprender la determinación de los niveles de expresión de todos los transcritos de pronóstico de RNA o sus productos de expresión.

El cáncer de mama puede ser un carcinoma de mama invasivo.

El RNA puede aislarse de un espécimen de tejido de cáncer de mama fijado incrustado en cera, del paciente. El aislamiento puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo a partir de tejido de biopsia de núcleo o células de aspirado con aguja fina.

Se describe también una red que comprende polinucleótidos que se hibridan a dos o más de los genes siguientes: α-Catenina, AIB1, AKT1, AKT2, β-actina, BAG1, BBC3, Bcl2, CCNB1, CCND1, CD68, CD9, CDH1, CEGP1, Chk1, CIAP1, cMet.2, Cóntigo 27882, CTSL, DR5, EGFR, EIF4E, EPHX1, ErbB3, EstR1, FBX05, FHIT1, FRP1, GAPDH, GATA3, G-Catenina, GRB7, GRO1, GSTM1, GUS, HER2, HIF1A, HNF3A, IGF1R, IGFBP2, KLK10, KRT14, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5, Maspin, MCM2, MCM3, MDM2, MMP9, MTA1, MYBL2, P14ARF, p27, P53, PI3KC2A, PR, PRAME, pS2, RAD51C, 3RB1, RIZ1, STK15, STMY3, SURV, TGFA, TOP2B, TP53BP2, TRAIL, TS, upa, VDR, VEGF, y ZNF217.

La red puede comprender polinucleótidos que se hibridan a al menos 10, o al menos 15, o al menos 20, o a la totalidad de los genes arriba enumerados.

La red puede comprender polinucleótidos que se hibridan a los genes siguientes: TP53BP2, GRB7, PR, CD68, Bcl2, KRT14, IRS1, CTSL, EstR1, Chk1, IGFBP2, BAG1, CEGP1, STK15, GSTM1, FHIT, RIZ1, AIB1, SURV, BBC3, IGF1R, p27, GATA3, ZNF217, EGFR, CD9, MYBL2, HIF1α, pS2, RIZ1, ErbB3, TOP2B, MDM2, RAD51C, KRT19, TS, Her2, KLK10, β-Catenina, γ-Catenina, MCM2, PI3KC2A, IGF1, TBP, CCNB1, FBX05 y DR5.

Los polinucleótidos pueden ser cDNAs, u oligonucleótidos, y la superficie sólida sobre la cual se presentan los mismos puede ser por ejemplo vidrio.

Se describe también un método de predicción de la probabilidad de supervivencia a largo plazo de un paciente diagnosticado de cáncer de mama invasivo, sin la recurrencia del cáncer de mama, que comprende los pasos de:

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

(a) TP53BP2, Bcl2, BAD, EPHX1, PDGFRβ, DIABLO, XIAP, YB1, CA9, y KRT8;

(c) PR, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, IGFBP2, TIMP1, CA9, MMP9, y COX2;

(e) Bcl2, TP53BP2, BAD, EPHX1, PDGFRβ, DIABLO, XIAP, YB1, CA9, y KRT8;

(f) KRT14, KRT5, PRAME, TP53BP2, GUS1, AIB1, MCM3, CCNE1, MCM6, e ID1;

(g) PRAME, TP53BP2, EstR1, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, BBC3, y VEGFB;

(h) CTSL2, GRB7, TOP2A, CCNB1, Bcl2, DIABLO, PRAME, EMS1, CA9, y EpCAM;

(i) EstR1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, BBC3, y VEGFB;

(k) Chk1, PRAME, TP53BP2, GRB7, CA9, CTSL, CCNB1, TOP2A, "tumor size", e IGFBP2;

(l) IGFBP2, GRB7, PRAME, DIABLO, CTSL, β-Catenina, PPM1D, Chk1, WISP1, y LOT1;

(m) HER2, TP53BP2, Bcl2, DIABLO, TIMP1, EPHX1, TOP2A, TRAIL, CA9, y AREG;

(n) BAG1, TP53BP2, PRAME, IL6, CCNB1, PAI1, AREG, "tumor size", CA9, y Ki67;

(o) CEGPI, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, STK15, AKT2, y FGF18;

(p) STK15, TP53BP2, PRAME, 1L6, CCNE1, AKT2, DIABLO, cMet, CCNE2, y COX2;

(q) KLK10, EstR1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, y BBC3;

(r) AIB1, TP53BP2, Bcl2, DIABLO, TIMP1, CD3, p53, CA9, GRB7, y EPHX1

(w) EGFR, KRT14, GRB7, TOP2A, CCNB1, CTSL, Bcl2, TP, KLK10, y CA9;

(x) HIF1a, PR, DIABLO, PRAME, Chk1, AKT2, GRB7, CCNE1, TOP2A, y CCNB1;

(y) MDM2, TP53BP2, DIABLO, Bcl2, AIB1, TIMP1, CD3, p53, CA9, y HER2;

(z) MYBL2, TP53BP2, PRAME, IL6, Bcl2, DIABLO, CCNE1, EPHX1, TIMP1, y CA9;

(aa) p27, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, STK15, AKT2, e ID1;

(ac) SURV, GRB7, TOP2A, PRAME, CTSL, GSTM1, CCNB1, VDR, CA9, y CCNE2;

(ad) TOP2B, TP53BP2, DIABLO, Bcl2, TIMP1, AIB1, CA9, p53, KRT8, y BAD;

(ae) ZNF217, GRB7, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, APC4, y β- Catenina,

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

(2) someter los datos obtenidos en el paso (1) a análisis estadístico; y

(3) determinar si la probabilidad de dicha supervivencia a largo plazo ha aumentado o disminuido.

Se describe también un método de predicción de la probabilidad de supervivencia a largo plazo de un paciente diagnosticado con cáncer de mama invasivo positivo a los receptores de estrógenos (ER), sin la recurrencia del cáncer de mama, que comprende los pasos de:

(1) determinar los niveles de expresión de los transcritos de RNA o los productos de expresión génica de una serie de genes seleccionado del grupo constituido por CD68; CTSL; FBX05; SURV; CCNB1; MCM2; Chk1; MYBL2; HIF1A; cMET; EGFR; TS; STK15, IGFR1; BC12; HNF3A; TP53BP2; GATA3; BBC3; RAD51C; BAG1; IGFBP2; PR; CD9; RB1; EPHX1; CEGP1; TRAIL; DR5; p27; p53; MTA; RIZ1; ErbB3; TOP2B; EIF4E,, en donde la expresión de los genes siguientes en un cáncer ER-positivo es indicativa de una probabilidad reducida de supervivencia sin recurrencia del cáncer después de cirugía: CD68; CTSL; FBXO5; SURV; CCNB1; MCM2; Chk1; MYBL2; HIF1A; cMET; EGFR; TS; STK15, y en donde la expresión de los genes siguientes es indicativa de una mejor prognosis para la supervivencia sin recurrencia del cáncer después de cirugía: IGFR1; BC12; HNF3A; TP53BP2; GATA3; BBC3; RAD51C; BAG1; IGFBP2; PR; CD9; RB1; EPHX1; CEGP1; TRAIL; DR5; p27; p53; MTA; RIZ1; ErbB3; TOP2B; EIF4E.

(2) someter los datos obtenidos en el paso (1) a análisis estadístico; y

(3) determinar si la probabilidad de dicha supervivencia a largo plazo ha aumentado o disminuido.

Se describe también un método de predicción de la probabilidad de supervivencia a largo plazo de un paciente diagnosticado con cáncer de mama invasivo negativo a los receptores de estrógenos (ER), sin la recurrencia del cáncer de mama, que comprende determinar los niveles de expresión de los transcritos de RNA o los productos de expresión de los genes de la serie de genes CCND1; UPA; HNF3A; CDH1; Her2; GRB7; AKT1; STMY3; α-Catenina; VDR; GRO1; KT14; KLK10; Maspin, TGFα, y FRP1, en donde la expresión de los genes siguientes es indicativa de una probabilidad reducida de supervivencia sin recurrencia del cáncer: CCND1; UPA; HNF3A; CDH1; Her2; GRB7;

AKT1; STMY3; α -Catenina; VDR; GRO1, y en donde la expresión de los genes siguientes es indicativa de una mejor prognosis para supervivencia sin recurrencia del cáncer: KT14, KLK10, Maspin, TGFα, y FRP1.

Se describe también un método de preparación de un perfil genómico personalizado para un paciente, que comprende los pasos de:

(a) someter RNA extraído de un tejido de mama obtenido del paciente a análisis de la expresión génica;

(b) determinar el nivel de expresión de uno o más genes seleccionados de la serie de genes de cáncer de mama enumerados en una cualquiera de las Tablas 1-5, en donde el nivel de expresión está normalizado contra un gen o genes de control y se compara opcionalmente con la cantidad encontrada en una serie de tejidos de referencia del cáncer de mama; y

(c) crear un informe que resume los datos obtenidos por el análisis de expresión génica.

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

Se describe también un método para amplificación de un gen enumerado en las Tablas 5A y B por la reacción en cadena de polimerasa (PCR), que comprende realizar dicha PCR por utilización de un amplicón enumerado en las Tablas 5A y B y una serie de iniciadores-sonda enumerados en las tablas 6A-F.

Se describe también un amplicón PCR enumerado en las tablas 5A y B.

Se describe también una serie de iniciadores-sonda PCR enumerados en las Tablas 6A-F.

Se describe también un método de pronóstico que comprende:

(a) someter una muestra que comprende células de cáncer de mama obtenidas de un paciente a análisis cuantitativo del nivel de expresión del transcrito de RNA de al menos un gen seleccionado del grupo constituido por GRB7, CD68, CTSL, Chk1, AIB1, CCNB1, MCM2, FBX05, Her2, STK15, SURV, EGFR, MYBL2, HIF1α, y TS, o su producto, y

(b) identificar el paciente como propenso a tener una probabilidad reducida de supervivencia a largo plazo sin recurrencia del cáncer de mama si los niveles de expresión normalizados del gen o genes, o sus productos, se elevan por encima de un umbral de expresión definido.

Se describe también un método de pronóstico que comprende:

(a) someter una muestra que comprende células de cáncer de mama obtenidas de un paciente a análisis cuantitativo del nivel de expresión del transcrito de RNA de al menos un gen seleccionado del grupo constituido por TP53BP2, PR, Bcl2, KRT14, EstR1, IGFBP2, BAG1, CEGP1, KLK10, β-Catenina, γ-Catenina, DR5, PI3KCA2, RAD51C, GSTM1, FHIT, RIZ1, BBC3, TBP, p27, IRS1, IGF1R, GATA3, ZNF217, CD9, pS2, ErbB3, TOP2B, MDM2, IGF1, y KRT19, y

(b) identificar al paciente como propenso a tener una probabilidad incrementada de supervivencia a largo plazo sin recurrencia del cáncer de mama si los niveles de expresión normalizados del o genes, o sus productos, se elevan por encima de un umbral de expresión definido.

Se describe también un kit que comprende uno o más de (1) tampón de extracción/reactivos y protocolo; (2) tampón de transcripción inversa/reactivos y protocolo; y (3) tampón qPCR/reactivos protocolo adecuados para la realización de cualquiera de los métodos anteriores.

Breve descripción de los dibujos

La Tabla 1 es una lista de genes, cuya expresión se correlaciona con supervivencia del cáncer de mama. Resultados de una prueba clínica retrospectiva. Análisis estadístico binario.

La Tabla 2 es una lista de genes, cuya expresión se correlaciona con la supervivencia del cáncer de mama en pacientes positivos a receptores de estrógenos (ER). Resultados de una prueba clínica retrospectiva. Análisis estadístico binario.

La Tabla 3 es una lista de genes, cuya expresión se correlaciona con la supervivencia del cáncer de mama en pacientes negativos a receptores de estrógenos (ER). Resultados de una prueba clínica retrospectiva. Análisis estadístico binario.

La Tabla 4 es una lista de genes, cuya expresión se correlaciona con la supervivencia del cáncer de mama. Resultados de una prueba clínica retrospectiva. Análisis estadístico binario de riesgos proporcionales de Cox.

Las Tablas 5A y B muestran una lista de genes, cuya expresión se correlaciona con la supervivencia del cáncer de mama. Resultados de una prueba clínica retrospectiva. La tabla incluye números de acceso para los genes, y secuencias amplicón utilizadas para amplificación de la PCR.

Tablas 6A-6F. La tabla incluye secuencias para los iniciadores directo e inverso (designados por "f" y "r", respectivamente) y sondas (designadas por "p") utilizadas para amplificación PCR de los amplicones enumerados en las Tablas 5A-B.

Descripción detallada de la realización preferida

A. *Definiciones*

A no ser que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que es comprendido comúnmente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención. Singleton *et al*., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (Nueva York, NY 1992), proporcionan a un experto en la técnica una guía general para muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.

Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria, que podrían utilizarse en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita en modo alguno a los métodos y materiales descritos. Para los propósitos de la presente invención, se definen a continuación los términos siguientes.

El término "microrred" se refiere a una disposición ordenada de elementos de red hibridables, preferiblemente sondas de polinucleótidos, sobre un sustrato.

El término "polinucleótido", tanto si se utiliza en singular como en plural, se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser RNA o DNA no modificado o RNA o DNA modificado. Así, por ejemplo, los polinucleótidos que se definen en esta memoria incluyen, sin limitación, DNA mono- y bicatenario, DNA que incluye regiones mono- y bicatenarias, RNA mono- y bicatenario, y RNA que incluye regiones mono- y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden DNA y RNA que puede ser monocatenario o, más típicamente, bicatenario o que incluyen regiones mono- y bicatenarias. Adicionalmente, el término "polinucleótido" como se utiliza en esta memoria se refiere a regiones de triple hélice que comprenden RNA o DNA o a la vez RNA y DNA. Las cadenas en tales regiones pueden ser de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir la totalidad de una o más de las moléculas, pero más típicamente implican sólo una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región de triple hélice es a menudo un oligonucleótido. El término "polinucleótido" incluye específicamente cDNAs. El término incluye DNAs (con inclusión de cDNAs) y RNAs que contiene una o más bases modificadas. Así, DNAs o RNAs con cadenas principales modificadas por estabilidad o por otras razones son "polinucleótidos" tal como se entiende dicho término en esta memoria. Además, DNAs o RNAs que comprenden bases poco comunes, tales como inosina, o bases modificadas, por ejemplo bases tritiadas, se incluyen dentro del término "polinucleótidos" como se define en esta memoria. En general, el término "polinucleótido" abarca todas las formas química, enzimática y/o metabólicamente modificadas de polinucleótidos sin modificar, así como las formas químicas de DNA y RNA características de virus y células, con inclusión de células simples y complejas.

El término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido relativamente corto, que incluye, sin limitación, desoxirribonucleótidos monocatenarios, ribonucleótidos mono- o bicatenarios, híbridos RNA:DNA y DNAs bicatenarios. Oligonucleótidos, tales como oligonucleótidos sonda de DNA monocatenario, se sintetizan a menudo por métodos químicos, por ejemplo utilizando sintetizadores automáticos de oligonucleótidos que están disponibles comercialmente. Sin embargo, los oligonucleótidos pueden fabricarse por una diversidad de otros métodos, con inclusión de técnicas mediadas por DNA recombinante *in vitro* y por expresión de DNAs en células y organismos.

Los términos "gen expresado diferencialmente", "expresión génica diferencial" y sus sinónimos, que se utilizan de modo intercambiable, se refieren a un gen cuya presión está activada en un nivel mayor o menor en un individuo que sufre una enfermedad, especialmente cáncer, tal como cáncer de mama, con relación a su expresión en un individuo normal o de control. Los términos incluyen también genes cuya expresión está activada en un nivel mayor o menor en diferentes etapas de la misma enfermedad. Se entiende también que un gen expresado diferencialmente puede estar activado o inhibido al nivel del ácido nucleico o al nivel de proteínas, o puede estar sometido a remodelación alternativa para dar como resultado un producto polipeptídico diferente. Tales diferencias pueden evidenciarse por un cambio en los niveles de mRNA, expresión superficial, secreción u otra distribución de un polipéptido, por ejemplo. La expresión diferencial de genes puede incluir una comparación de la expresión entre dos o más genes o sus productos génicos, o una comparación de las relaciones de la expresión entre dos o más genes o sus productos génicos, o incluso una comparación de dos productos del mismo gen procesados diferentemente, que difieren entre individuos normales e individuos que padecen una enfermedad, específicamente cáncer, o entre diversos estadios de la misma enfermedad. La expresión diferencial incluye diferencias tanto cuantitativas como cualitativas en el patrón de expresión temporal o celular en un gen o sus productos de expresión entre, por ejemplo, células normales y enfermas, o entre células que han sufrido sucesos o estadios de enfermedad diferentes. Para el propósito de esta invención, se considera que está presente "expresión diferencial de genes" cuando existe al menos una diferencia aproximada de 2 veces, de modo

preferible al menos aproximadamente de 4 veces, de modo más preferible al menos aproximadamente de 6 veces, y de modo muy preferible al menos aproximadamente de 10 veces entre la expresión de un gen dado en individuos normales y enfermos, o en diversos estadios del desarrollo de la enfermedad en un individuo enfermo.

La expresión "amplificación génica" se refiere a un proceso por el cual se forman copias múltiples de un gen o fragmento de gen en una célula o línea de células particular. La región duplicada (un tramo de DNA amplificado) se conoce a menudo como "amplicón". Usualmente, la cantidad del RNA mensajero (mRNA) producida, es decir, el nivel de expresión génica, aumenta también en la proporción del número de copias producidas del gen particular expresado.

El término "diagnosis" se utiliza en esta memoria para hacer referencia a la identificación de un estado, enfermedad o afección molecular o patológica, tal como la identificación de un subtipo molecular de cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, u otro tipo de cáncer.

El término "prognosis" se utiliza en esta memoria para hacer referencia a la predicción de la probabilidad de muerte atribuida al cáncer o progresión, con inclusión de recurrencia, propagación metastásica, y resistencia a los fármacos, de una enfermedad neoplástica, tal como cáncer de mama.

El término "predicción" se utiliza en esta memoria para hacer referencia a la probabilidad de que un paciente responda favorable o desfavorablemente a un fármaco o serie de fármacos, así como el grado de dichas respuestas, o de que de un paciente sobreviva, después de eliminación quirúrgica del tumor primario y/o quimioterapia durante cierto tiempo sin recurrencia del cáncer. Los métodos predictivos de la presente invención pueden utilizarse clínicamente para tomar decisiones acerca del tratamiento por selección de las modalidades de tratamiento más apropiadas para cualquier paciente particular. Los métodos predictivos de la presente invención son instrumentos valiosos en la predicción de si un paciente tiene probabilidad de responder favorablemente a un régimen de tratamiento, tal como intervención quirúrgica, quimioterapia con un fármaco o combinación de fármacos dado(a), y/o terapia de radiación, o si es probable la supervivencia a largo plazo del paciente, después de cirugía y/o finalización de la quimioterapia u otras modalidades de tratamiento.

El término supervivencia a "largo plazo" se utiliza en esta memoria para hacer referencia a la supervivencia durante al menos 3 años, más preferiblemente durante al menos 8 años, muy preferiblemente durante al menos 10 años después de cirugía u otro tratamiento.

El término "tumor", como se utiliza en esta memoria, hace referencia a todo crecimiento y proliferación de células neoplásticas, sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos.

Los términos "cáncer" y "canceroso" hacen referencia a o describen la afección fisiológica en los mamíferos que se caracteriza típicamente por crecimiento celular descontrolado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero sin carácter limitante, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma, y cáncer cerebral.

La "patología" del cáncer incluye todos los fenómenos que ponen en peligro el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, crecimiento celular anormal o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de las células vecinas, liberación de citoquinas u otros productos de secreción a niveles anormales, supresión o agravación de la respuesta inflamatoria o inmunológica, neoplasia, premalignidad, malignidad, invasión de los tejidos u órganos circundantes o distantes, tales como ganglios linfáticos, etc.

"La severidad" de las reacciones de hibridación puede ser determinada fácilmente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica, y en general es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sales. En general, las sondas más largas requieren mayores temperaturas para reasociación apropiada, en tanto que las sondas más cortas precisan temperaturas más bajas. La hibridación depende por lo general de la capacidad del DNA desnaturalizado para reasociarse cuando están presentes cadenas complementarias en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, tanto mayor es la temperatura relativa que puede utilizarse. Como resultado, se sigue que las temperaturas relativas más altas tenderían a hacer más severas las condiciones de la reacción, en tanto que las temperaturas más bajas harían lo contrario. Para detalles y explicación adicionales de la severidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel *et al., Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers (1995).

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

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

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

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

B. *Descripción Detallada*

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

1. *Determinación del Perfil de la Expresión Génica*

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

2. *PCR de Transcriptasa Inversa (RT-PCR)*

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

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

Los métodos generales para extracción de mRNA son bien conocidos en la técnica y se describen en libros de texto estándar de biología molecular, con inclusión de Ausubel *et al., Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1997). Métodos para extracción de RNA a partir de tejidos incrustados en parafina se describen, por ejemplo, en Rupp y Locker, *Lab. Invest*. 56: A67 1987), y De Andrés *et al., BioTechniques* 18:42044 (1995). En particular, el

aislamiento del RNA puede realizarse utilizando kit de purificación, series de tampones y proteasa de fabricantes comerciales, tales como Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, el RNA total de células en cultivo puede aislarse utilizando mini-columnas Qiagen RNeasy. Otros kits de aislamiento de RNA disponibles comercialmente incluyen MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (EPICENTRE®, Madison, WI), y Paraffin Block RNA Isolation Kit (Ambion, Inc.). El RNA total de muestras de tejido puede aislarse utilizando RNA Stat-60 (Tel-Test). El RNA preparado a partir de un tumor puede aislarse, por ejemplo, por centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio.

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

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

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

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

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

Una variación más reciente de la técnica RT-PCR es la PCR cuantitativa en tiempo real, que mide la acumulación de productos PCR mediante una sonda fluorígena de doble etiquetado (a saber, la sonda TaqMan®). La PCR en tiempo real es compatible no sólo con la PCR competitiva cuantitativa, en la que se utiliza un competidor interno para cada secuencia diana para la normalización, sino también con la PCR cuantitativa comparativa que utiliza un gen de normalización contenido en la muestra, o un gen interno para RT-PCR. Para detalles adicionales véase, v.g. Held *et al., Genome Research* 6: 986-994 (1996).

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

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

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

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

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

3. *Microrredes*

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

En una realización específica de la técnica de microrredes, se aplican inserciones amplificadas por PCR de clones de cDNA a un sustrato en una red densa. Preferiblemente, se aplican al sustrato al menos 10.000 secuencias de nucleótidos. Los genes dispuestos en microrredes, inmovilizados en el microchip a 10.000 elementos cada uno, son adecuados para hibridación en condiciones severas. Pueden generarse sondas de cDNA marcadas fluorescentemente por incorporación de nucleótidos fluorescentes mediante transcripción inversa de RNA extraído de los tejidos de interés. Las sondas de cDNA marcadas aplicadas al chip se hibridan con especificidad a cada mancha de DNA en la red. Después de lavado severo para eliminar las sondas no fijadas específicamente, se escanea el chip por microscopia láser confocal o por otro método de detección, tal como una cámara CCD. La cuantificación de la hibridación de cada elemento dispuesto en red permite la evaluación de la abundancia de mRNA correspondiente. Con la fluorescencia dual en color, las sondas de CDNA marcadas por separado generadas por dos fuentes de RNA se hibridan por pares a la red. La abundancia relativa de los transcritos de las dos fuentes correspondientes a cada gen especificado se determina de este modo simultáneamente. La escala miniaturizada de la hibridación proporciona una evaluación conveniente y rápida del patrón de expresión para grandes números de genes. Se ha demostrado que dichos métodos tienen la sensibilidad requerida para detectar transcritos raros, que se expresan a razón de un pequeño número de copias por célula, y para detectar reproduciblemente al menos aproximadamente diferencias de dos veces en los niveles de expresión (Schena *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (2): 106-149 (1996)). El análisis de microrredes puede realizarse por medio de equipos disponibles comercialmente, siguiendo protocolos del fabricante, por ejemplo por utilización de la tecnología Affymetrix GenChip, o la tecnología de microrredes de Incyte.

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

4. *Análisis Serial de la Expresión Génica (SAGE)*

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

5. *Tecnología MassARRAY*

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

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

Este método, descrito por Brenner *et al., Nature Biotechnology* 18: 630-634 (2000), es un método de secuenciación que combina la secuenciación de firmas no basadas en gel con clonación *in vitro* de millones de moldes sobre microcuentas separadas de 5 μm de diámetro. En primer lugar, se construye una biblioteca de microcuentas de moldes de DNA por clonación *in vitro*. Esto va seguido por el ensamblaje de una red planar de las microcuentas que contienen moldes en una celda de flujo a una densidad elevada (típicamente mayor que 3×10^6 microcuentas/cm^2). Los extremos libres de los moldes clonados en cada microcuenta se analizan simultáneamente, utilizando un método de secuenciación de firmas Basándose en fluorescencia que no requiere separación de los fragmentos de DNA. Se ha demostrado que este método proporciona simultánea y exactamente, en una sola operación, centenares de miles de secuencias firma de genes a partir de una biblioteca de cDNA de levadura.

7. *Inmunohistoquímica*

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

8. *Proteómica*

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

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

Los pasos de un protocolo representativo para la determinación del perfil de la expresión génica utilizando tejidos fijos incrustados en parafina como la fuente de RNA, que incluyen aislamiento del mRNA, purificación, extensión con iniciadores y amplificación, se dan en diversos artículos de revistas publicados {por ejemplo: T.E. Godfrey *et al*. J.

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

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

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

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

Ejemplo

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

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

Diseño del Estudio

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

Materiales y Métodos

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

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

Análisis de la Expresión Génica

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

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

Análisis y Resultados

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

Los resultados se clasificaron como:

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

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

El análisis se realizó por:

1. Análisis de la relación entre la expresión génica normalizada y los desenlaces binarios de 0 ó 1.

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

Análisis de Pacientes con Carcinoma de Mama Invasivo por Enfoque Binario

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

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

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

	Media		valor t	df	p	N válido	N
Bcl2	-0.15748	-1.22816	4.00034	75	0.000147	35	42
PR	-2.67225	-5.49747	3.61540	75	0.000541	35	42
IGF1R	-0.59390	-1.71506	3.49158	75	0.000808	35	42
BAG1	0.18844	-0.68509	3.42973	75	0.000985	35	42
CD68	-0 52275	0.10983	-3 41186	75	0.001043	35	42
EstR1	-0.35581	-3.00699	3.32190	75	0.001384	35	42
CTSL	-0.64894	-0.09204	-3.26781	75	0.001637	35	42
IGFBP2	-0.81181	-1.78398	3 24158	75	0.001774	35	42
GATA3	1.80525	0.57428	3.15608	75	0.002303	35	42
TP53BP2	-4.71118	-6.09289	3 02888	75	0.003365	35	42
EstR1	3.67801	1.64693	3.01073	75	0.003550	35	42
CEGP1	-2.02566	-4.25537	2.85620	75	0.005544	35	42
SURV	-3.67493	-2.96982	-2.70544	75	0.008439	35	42
p27	0 80789	0.28807	2.55401	75	0.012678	35	42
Chk1	-3.37981	-2.80389	-2.46979	75	0.015793	35	42
BBC3	-4.71789	-5 62957	2.46019	75	0.016189	35	42
ZNF217	1.10038	0.62730	2.42282	75	0.017814	35	42
EGFR	-2.88172	-2.20556	-2.34774	75	0.021527	35	42
CD9	1.29955	0.91025	2.31439	75	0.023386	35	42
MYBL2	-3.77489	-3.02193	-2.29042	75	0.024809	35	42
HIF1A	-0.44248	0.03740	-2.25950	75	0.026757	35	42
GRB7	-1.96063	-1.05007	-2.25801	75	0.026854	35	42
pS2	-1 00691	-3.13749	2.24070	75	0.028006	35	42
RIZ1	-7 62149	-8 38750	2.20226	75	0.030720	35	42
ErbB3	-6.89508	-7.44326	2.16127	75	0.033866	35	42
TOP2B	0.45122	0.12665	2.14616	75	0.035095	35	42
MDM2	1 09049	0 69001	2.10967	75	0.038223	35	42
PRAME	-6.40074	-7.70424	2.08126	75	0.040823	35	42
GUS	-1.51683	-1.89280	2.05200	75	0.043661	35	42
RAD51C	-5 85618	-6.71334	2.04575	75	0 044288	35	42
AIB1	-3.08217	-2.28784	-2.00600	75	0.048462	35	42
STK15	-3.11307	-2.59454	-2 00321	75	0 048768	35	42
GAPDH	-0.35829	-0.02292	-1.94326	75	0 055737	35	42
FHIT	-3.00431	-3.67175	1.86927	75	0.065489	35	42
KRT19	2 52397	2 01694	1 85741	75	0.067179	35	42
TS	-2.83607	-2.29048	-1 83712	75	0 070153	35	42
GSTM1	-3.69140	-4.38623	1.83397	75	0.070625	35	42
G-Catenina	0.31875	-0.15524	1.80823	75	0.074580	35	42
AKT2	0.78858	0 46703	1.79276	75	0.077043	35	42
CCNB1	-4.26197	-3.51628	-1.78803	75	0.077810	35	42
PI3KC2A	-2.27401	-2.70265	1 76748	75	0.081215	35	42
FBXO5	-4.72107	-4.24411	-1.75935	75	0.082596	35	42
DR5	-5.80850	-6.55501	1.74345	75	0.085353	35	42
CIAP1	-2.81825	-3.09921	1.72480	75	0.088683	35	42
MCM2	-2.87541	-2 50683	-1.72061	75	0.089445	35	42
CCND1	1.30995	0.80905	1.68794	75	0.095578	35	42
EIF4E	-5 37657	-6.47156	1.68169	75	0.096788	35	42

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

Basándose en los datos indicados en la tabla 1, la expresión de cualquiera de los genes siguientes en el cáncer de mama por encima de un umbral de expresión definido indica una probabilidad reducida de supervivencia sin recurrencia de cáncer después de la cirugía: Grb7, CD68, CTSL, Chk1, Her2, STK15, AIB1, SURV, EGFR, MYBL2, HIF 1α.

Basándose en los datos indicados en la Tabla 1, la expresión de cualquiera de los genes siguientes en el cáncer de mama por encima de un umbral de expresión definido indica un mejor pronóstico para supervivencia sin recurrencia de cáncer de mama después de cirugía: TP53BP2, PR, Bcl2, KRT14, EstR1, IGFBP2, BAG1, CEGP1, KLK10, β-Catenina, GSTM1, FHIT, Riz1, IGF1, BBC3, IGFR1, TBP, p27, IRS1, IGF1R, GATA3, CEGP1, ZNF217, CD9, pS2, ErbB3, TOP2B, MDM2, RAD51, y KRT19.

Análisis de los Pacientes ER-positivos por Enfoque Binario

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

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

	Media		valor t	df	p	N válido	N
IGF1R	-0.13975	-1.00435	3.65063	55	0.000584	30	27
Bcl2	0.15345	-0.70480	3.55488	55	0.000786	30	27
CD68	-0.54779	0.19427	-3.41818	55	0.001193	30	27
HNF3A	0.39617	-0.63802	3.20750	55	0.002233	30	27
CTSL	-0.66726	0.00354	-3.20692	55	0.002237	30	27
TP53BP2	-4.81858	-6.44425	3.13698	55	0.002741	30	27
GATA3	2.33386	1.40803	3.02958	55	0.003727	30	27
BBC3	-4.54979	-5.72333	2.91943	55	0.005074	30	27
RAD51C	-5.63363	-6.94841	2.85475	55	0.006063	30	27
BAG1	0.31087	-0.50669	2.61524	55	0.011485	30	27
IGFBP2	-0.49300	-1.30983	2.59121	55	0.012222	30	27
FBXO5	-4.86333	-4.05564	-2.56325	55	0.013135	30	27
EstR1	0.68368	-0.66555	2.56090	55	0.013214	30	27
PR	-1.89094	-3.86602	2.52803	55	0.014372	30	27
SURV	-3.87857	-3.10970	-2.49622	55	0.015579	30	27
CD9	1.41691	0.91725	2.43043	55	0.018370	30	27
RB1	-2.51662	-2.97419	2.41221	55	0.019219	30	27
EPHX1	-3.91703	-5.85097	2.29491	55	0.025578	30	27
CEGP1	-1.18600	-2.95139	2.26608	55	0.027403	30	27
CCNB1	-4.44522	-3.35763	-2.25148	55	0.028370	30	27
TRAIL	0.34893	-0.56574	2.20372	55	0.031749	30	27
EstR1	4.60346	3.60340	2.20223	55	0.031860	30	27
DR5	-5.71827	-6.79088	2.14548	55	0.036345	30	27
MCM2	-2.96800	-2.48458	-2.10518	55	0.039857	30	27
Chk1	-3.46968	-2.85708	-2.08597	55	0.041633	30	27
p27	0.94714	0.49656	2.04313	55	0.045843	30	27
MYBL2	-3.97810	-3.14837	-2.02921	55	0.047288	30	27
GUS	-1.42486	-1.82900	1.99758	55	0.050718	30	27
P53	-1.08810	-1.47193	1.92087	55	0.059938	30	27
HIF1A	-0.40925	0.11688	-1.91278	55	0.060989	30	27
cMet	-6.36835	-5.58479	-1.88318	55	0.064969	30	27
EGFR	-2.95785	-2.28105	-1.86840	55	0.067036	30	27
MTA1	-7.55365	-8.13656	1.81479	55	0.075011	30	27
RIZ1	-7.52785	-8.25903	1.79518	55	0.078119	30	27
ErbB3	-6.62488	-7.10826	1.79255	55	0.078545	30	27
TOP2B	0.54974	0.27531	1.74888	55	0.085891	30	27
EIF4E	-5.06603	-6.31426	1.68030	55	0.098571	30	27
TS	-2.95042	-2.36167	-1.67324	55	0.099959	30	27
STK15	-3.25010	-2.72118	-1.64822	55	0.105010	30	27

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

Basándose en la serie de datos indicados en la Tabla 2, la expresión de los genes siguientes en el cáncer ER-positivo por encima de un nivel de expresión definido es indicativa de una probabilidad reducida de supervivencia sin recurrencia de cáncer después de cirugía: CD68; CTSL; FBX05; SURV; CCNB1; MCM2; Chk1; MYBL2; HIF1A; cMET; EGFR; TS; STK15. Muchos de estos genes (CD68, CTSL, SURV, CCNB1, MCM2, Chk1, MYBL2, EGFR, y STK15) se identificaron también como indicadores de mal pronóstico en el análisis previo, que no estaba limitado al cáncer de mama ER-positivo. Basándose en la serie de datos indicada en la Tabla 2, la expresión de los genes siguientes en el cáncer ER-positivo por encima de un nivel de expresión definido es indicativa de un mejor pronóstico para la supervivencia sin recurrencia de cáncer después de cirugía: IGFR1; BC12; HNF3A; TP53BP2; GATA3;

BBC3; RAD51C; BAG1; IGFBP2; PR; CD9; RB1; EPHX1; CEGP1; TRAIL; DR5; p27; p53; MTA; RIZ1; ErbB3; TOP2B; EIF4E. De los últimos genes, IGFR1; BC12; TP53BP2; GATA3; BBC3; RAD51C; BAG1; IGFBP2; PR; CD9; CEGP1; DR5; p27; RIZ1; ErbB3; TOP2B; EIF4E se han identificado también como indicadores de buen pronóstico en el análisis previo, no limitado a cáncer de mama ER-positivo.

Análisis de pacientes ER-negativos por enfoque binario

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

TABLA 3

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

Basándose en la serie de datos indicados en la Tabla 3, la expresión de los genes siguientes en el cáncer ER-negativo por encima de un nivel de expresión definido es indicativa de una probabilidad reducida de supervivencia sin recurrencia de cáncer (p<0,05): CCND1; UPA; HNF3A; CDH1; Her2; GRB7; AKT1; STMY3; α-Catenina; VDR; GRO1. Únicamente 2 de estos genes (Her2 y Grb7) se identificaron también como indicadores de mal pronóstico en el análisis previo, no limitado a cáncer de mama ER-negativo. Basándose en la serie de datos indicada en la Tabla 3, la expresión de los genes siguientes en el cáncer ER-negativo por encima de un nivel de expresión definido es indicativa de un mejor pronóstico para supervivencia sin recurrencia de cáncer (KT14; KLK10; Maspin, TGFα, y FRP1). De los últimos genes, únicamente KLK10 ha sido identificado como indicador de buen pronóstico en el análisis previo, no limitado a cáncer de mama ER-negativo.

Análisis de genes múltiples e indicadores de desenlace

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

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

De acuerdo con un segundo enfoque (enfoque de tiempo hasta el acontecimiento), se definió para cada gen un modelo de Riesgo Proporcional de Cox (véase, v.g., Cox, D.R., y Oakes, D. (1984), *Analysis of Survival Data*, Chapman and Hall, Londres, Nueva York) con el tiempo hasta recurrencia o muerte como variable dependiente, y el nivel de expresión del gen como la variable independiente. Se identificaron los genes que tienen un valor $p < 0,10$ en el modelo de Cox. Para cada gen, el modelo de Cox proporciona el riesgo relativo (RR) de recurrencia o muerte para un cambio unidad en la expresión del gen. Puede seleccionarse distribuir los pacientes en subgrupos para cualquier valor umbral de la expresión medida (en la escala CT), en la cual todos los pacientes con valores de expresión superiores al umbral presentan mayor riesgo, y todos los pacientes con valores de expresión inferiores al umbral presentan un riesgo menor, o viceversa, dependiendo de si el gen es un indicador de pronóstico malo ($RR > 1,01$) o bueno ($RR < 1,01$). Así, cualquier valor umbral definirá subgrupos de pacientes con riesgo respectivamente incrementado o reducido. Los desenlaces se resumen en la Tabla 4. La tercera columna, con el encabezamiento: exp(coef) muestra los valores RR.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 4

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

Los análisis binarios y de tiempo hasta el acontecimiento, con pocas excepciones, identificaban los mismos genes como marcadores de pronóstico. Por ejemplo, la comparación de las Tablas 1 y 4 muestra que 10 genes estaban representados en los 15 primeros genes en ambas listas. Adicionalmente, cuando ambos análisis identificaban el mismo gen a [$p < 0,10$], lo que ocurría para 21 genes, los mismos eran siempre concordantes con respecto a la dirección (signo positivo o negativo) de la correlación con supervivencia/recurrencia. Globalmente, estos resultados respaldan la conclusión de que los marcadores identificados tienen valor de pronóstico significativo.

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

El análisis multivariante se realiza utilizando la ecuación siguiente:

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

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

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

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

(a) TP53BP2, Bcl2, BAD, EPHX1, PDGFRβ, DIABLO, XIAP, YB1, CA9, y KRT8.

(b) GRB7, CD68, TOP2A, Bcl2, DIABLO, CD3, ID1, PPM1D, MCM6, y WISP1.

(c) PR, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, IGFBP2, TIMP1, CA9, MMP9, y COX2.

(d) CD68, GRB7, TOP2A, Bcl2, DIABLO, CD3, ID1, PPM1D, MCM6, y WISP1.

(e) Bcl2, TP53BP2, BAD, EPHX1, PDGFRβ, DIABLO, XIAP, YB1, CA9, y KRT8.

(f) KRT14, KRT5, PRAME, TP53BP2, GUS1, AIB1, MCM3, CCNE1, MCM6, e ID1.

(g) PRAME, TP53BP2, EstR1, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, BBC3, y VEGFB.

(h) CTSL2, GRB7, TOP2A, CCNB1, Bcl2, DIABLO, PRAME, EMS1, CA9, y EpCAM.

(i) EstR1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, BBC3, y VEGFB.

(k) Chk1, PRAME, p53BP2, GRB7, CA9, CTSL, CCNB1, TOP2A, "tumor size", e IGFBP2.

(l) IGFBP2, GRB7, PRAME, DIABLO, CTSL, (β-Catenina, PPM1D, Chk1, WISP1, y LOT1.

(m) HER2, TP53BP2, Bcl2, DIABLO, TIMP1, EPHX1, TOP2A, TRAIL, CA9, y AREG.

(n) BAG1, TP53BP2, PRAME, IL6, CCNB1, PAI1, AREG, "tumor size", CA9, y Ki67.

(o) CEGP1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, STK15, AKT2, y FGF18.

(p) STK15, TP53BP2, PRAME, IL6, CCNE1, AKT2, DIABLO, cMet, CCNE2, y COX2.

(q) KLK10, EstR1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, y BBC3.

(r) AIB1, TP53BP2, Bcl2, DIABLO, TIMP1, CD3, p53, CA9, GRB7, y EPHX1.

(s) BBC3, GRB7, CD68, PRAME, TOP2A, CCNB1, EPHX1, CTSL, GSTM1, y APC.

(t) CD9, GRB7, CD68, TOP2A, Bcl2, CCNB1, CD3, DIABLO, ID1, y PPM1D.

(w) EGFR, KRT14, GRB7, TOP2A, CCNB1, CTSL, Bcl2, TP, KLK10, y CA9.

(x) HIF1α, PR, DIABLO, PRAME, Chk1, AKT2, GRB7, CCNE1, TOP2A, y CCNB1.

(y) MDM2, TP53BP2, DIABLO, Bcl2, AIB1, TIMP1, CD3, p53, CA9, y HER2.

(z) MYBL2, TP53BP2, PRAME, IL6, Bcl2, DIABLO, CCNE1, EPHX1, TIMP1, y CA9.

(aa) p27, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, STK15, AKT2, e ID1.

(ab) RAD51, GRB7, CD68, TOP2A, CIAP2, CCNB1, BAG1, IL6, FGFR1, y TP53BP2.

(ac) SURV, GRB7, TOP2A, PRAME, CTSL, GSTM1, CCNB1, VDR, CA9, y CCNE2.

(ad) TOP2B, TP53BP2, DIABLO, Bcl2, TIMP1, AIB1, CA9, p53, KRT8, y BAD.

(ae) ZNF217, GRB7, p53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, APC4, y β-Catenina.

Si bien la presente invención se ha descrito con referencia a lo que se considera son las realizaciones específicas, debe entenderse que la invención no está limitada a tales realizaciones. Por el contrario, debe entenderse que la invención abarca diversas modificaciones y equivalentes incluidos dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

(Tabla pasa a página siguiente)

Gen	Acceso	Sec
AIB1	NM_006534	GCGGCGAGTTTCCGATTTAAAGCTGAGCTGCGAGGAAAATGGCGGCGGGAGGATCAAAATACTTGCTGGATGGTGGAC
AKT1	NM_005163	CGCTTCTATGGCGCTGAGATTGTGTCAGCCCTGGACTACCTGCACTCGGAGAAGAACGTGGTGTACCGGGA
AKT2	NM_001626	TCCTGCCACCCTTCAAACCTCAGGTCACGTCCGAGGTCGACACAAGGTACTTCGATGATGAATTTACCGCC
APC	NM_000038	GGACAGCAGGAATGTGTTTCTCCATACAGGTCACGGGGAGCCAATGGTTCAGAAACAAATCGAGTGGGT
AREG	NM_001657	TGTGAGTGAAATGCCTTCTAGTAGTGAACCGTCCTCGGGAGCCGACTATGACTACTCAGAAGAGTATGATAACGAACCA
Bactina	NM_001101	CAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTATGACGAGTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGC
Bcatenina	NM_001904	GGCTCTTGTGCGTACTGTCCTTCGGGCTGGTGACAGGGAAGACATCACTGAGCCTGCCATCTGTGCTCTTCGTCATCTC
BAD	NM_032989	GGGTCAGGTGCCTCGAGATCGGGCTTGGGCCCAGAGCATGTTCCAGATCCCAGAGTTTGAGCCGAGTGAGCAG
BAG1	NM_004323	CGTTGTCAGCACTTGGAATACAAGATGGTTGCCGGGTCATGTTAATTGGGAAAAAGAACAGTCCACAGGAAGAGGTTGA
BBC3	NM_014417	CCTGGAGGGTCCTGTACAATCTCATCATGGGACTCCTGCCCTTACCCAGGGGCCACAGAGCCCCCGAGATGGAGCCC
Bcl2	NM_000633	CAGATGGACCTAGTACCCACTGAGATTTCCACGCCGAAGGACAGCGATGGGAAAAATGCCCTTAAATCATAGG
CA9	NM_001216	ATCCTAGCCCTGGTTTTTGGCCTCCTTTTTGCTGTCACCAGCGTCGCGTTCCTTGTGCAGATGAGAAGGCAG
CCNB1	NM_031966	TTCAGGTTGTTGCAGGAGACCATGTACATGACTGTCTCCATTATTGATCGGTTCATGCAGAATAATTGTGTGCCCAAGA
CCND1	NM_001758	GCATGTTCGTGGCCTCTAAGATGAAGGAGACCATCCCCCTGACGGCCGAGAAGCTGTGCATCTACACCG
CCNE1	NM_001238	AAAGAAGATGATGACCGGGTTTACCCAAACTCAACGTGCAAGCCTCGGATTATTGCACCATCCAGAGGCTC
CCNE2	NM_057749	ATGCTGTGGCTCCTTCCTAACTGGGGCTTTCTTGACATGTAGGTTGCTTGGTAATAACCTTTTTGTATATCACAATTTGG
CD3z	NM_000734	AGATGAAGTGGAAGGCGCTTTTCACCGCGGCCATCCTGCAGGCACAGTTGCCGATTACAGAGGCA
CD68	NM_001251	TGGTTCCCAGCCCTGTGTCCACCTCCAAGCCCAGATTCAGATTCGAGTCATGTACACAACCCAGGGTGGAGGAG
CD9	NM_001769	GGGCGTGGAACAGTTTATCTCAGACATCTGCCCCAAGAAGGACGTACTCGAAACCTTCACCGTG
CDH1	NM_004360	TGAGTGTCCCCCGGTATCTTCCCCGCCCTGCCAATCCCGATGAAATTGGAAATTTTATTGATGAAAATCTGAAAGCGGC
CEGP1	NM_020974	TGACAATCAGCACACCTGCATTCACCGCTCGGAAGAGGGCCTGAGCTGCATGAATAAGGATCACGGCTGTAGTCACA
Chk1	NM_001274	GATAAATTGGTACAAGGGATCAGCTTTTCCCAGCCCACATGTCCTGATCATATGCTTTTGAATAGTCAGTTACTTGGCAC
CIAP1	NM_001166	TGCCTGTGGTGGGAAGCTCAGTAACTGGGAACCAAAGGATGATGCTATGTCAGAACACCGGAGGCATTTTCC
cIAP2	NM_001165	GGATATTTCCGTGGCTCTTATTCAAACTCTCCATCAAATCCTGTAAACTCCAGAGCAAATCAAGATTTTTCTGCCTTGATC
cMet	NM_000245	GACATTTCCAGTCCTGCAGTCAATGCCTCTCTGCCCCACCCTTTGTTCAGTGTGGCTGGTGCCACGACAAATGTGTGCC
Contiço 278	AK000618	GGCATCCTGGCCCAAAGTTTCCCAAATCCAGGCGGCTAGAGGCCCCACTGCTTCCCAACTACCAGCTGAGGGGGTC
COX2	NM_000963	TCTGCAGAGTTGGAAGCACTCTATGGTGACATCGATGCTGTGGAGCTGTATCCTGCCCTTCTGGTAGAAAAGCCTCGG
CTSL	NM_001912	GGGAGGCTTATCTCACTGAGTGAGCAGAATCTGGTAGACTGCTCTGGGCCTCAAGGCAATGAAGGCTGCAATGG
CTSL2	NM_001333	TGTCTCACTGAGCGAGCAGAATCTGGTGGACTGTTCGCGTCCTCAAGGCAATCAGGGCTGCAATGGT
DAPK1	NM_004938	CGCTGACATCATGAATGTTCCTCGACCGGCTGGAGGCGAGTTTGGATATGACAAAGACACATCGTTGCTGAAAGAGA
DIABLO	NM_019887	CACAATGGCGGCTCTGAAGAGTTGGCTGTCGCGCAGCGTAACTTCATTCTTCAGGTACAGACAGTGTTTGTGT
DR5	NM_003842	CTCTGAGACAGTGCTTCGATGACTTTGCAGACTTGGTGCCCTTTGACTCCTGGGAGCCGCTCATGAGGAAGTTGGGCC
EGFR	NM_005228	TGTCGATGGACTTCCAGAACCACCTGGGCAGCTGCCAAAAGTGTGATCCAAGCTGTCCCAAT
EIF4E	NM_001968	GATCTAAGATGGCGACTGTCGAACCGGAAACCACCCCTACTCCTAATCCCCCGACTACAGAAGAGGAGAAAACGGAAT
EMS1	NM_005231	GGCAGTGTCACTGAGTCCTTGAAATCCTCCCCTGCCCCGCGGGTCTCTGGATTGGGACGCACAGTGCA
EpCAM	NM_002354	GGGCCCTCCAGAACAATGATGGGCTTTATGATCCTGACTGCGATGAGAGCGGGCTCTTTAAGGCCAAGCAGTGCA
EPHX1	NM_000120	ACCGTAGGCTCTGCTCTGAATGACTCTCCTGTGGGTCTGGCTGCCTATATTCTAGAGAAGTTTTCCACCTGGACCA
ErbB3	NM_001982	CGGTTATGTCATGCCAGATACACACCTCAAAGGTACTCCCTCCTCCCGGGAAGGCACCCTTTCTTCAGTGGGTCTCAG
EstR1	NM_000125	CGTGGTGCCCCTCTATGACCTGCTGCTGGAGATGCTGGACGCCCACCGCCTACATGCGCCCACTAGCC
FBXO5	NM_012177	GGCTATTCCTCATTTTCTCTACAAAGTGGCCTCAGTGAACATGAAGAAGGTAGCCTCCTGGAGGAGAATTTCGGTGACA
FGF18	NM_003862	CGGTAGTCAAGTCCGGATCAAGGGCAAGGAGACGGAATTCTACCTGTGCATGAACCGCAAAGGCAAGC
FGFR1	NM_023109	CACGGGACATTCACCACATCGACTACTATAAAAAGACAACCAACGGCCGACTGCCTGTGAAGTGGATGGCACCC
FHIT	NM_002012	CCAGTGGAGCGCTTCCATGACCTGCGTCCTGATGAAGTGGCCGATTTGTTTCAGACGACCCAGAGAG
FRP1	NM_003012	TTGGTACCTGTGGGTTAGCATCAAGTTCTCCCCAGGGTAGAATTCAATCAGAGCTCCAGTTTGCATTTGGATGTG
G-catenina	NM_002230	TCAGCAGCAAGGGCATCATGGAGGAGGATGAGGCCTGCGGGCGCCAGTACACGCTCAAGAAAACCACC
GAPDH	NM_002046	ATTCCACCCATGGCAAATTCCATGGCACCGTCAAGGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCATCAATGGAAATCCCATC
GATA3	NM_002051	CAAAGGAGCTCACTGTGGTGTCTGTGTTCCAACCACTGAATCTGGACCCCATCTGTGAATAAGCCATTCTGACTC
GRB7	NM_005310	CCATCTGCATCCATCTTGTTTGGGCTCCCCACCCTTGAGAAGTGCCTCAGATAATACCCTGGTGGCC
GRO1	NM_001511	CGAAAAGATGCTGAACAGTGACAAATCCAACTGACCAGAAGGGAGGAGGAAGCTCACTGGTGGCTGTTCCTGA
GSTM1	NM_000561	AAGCTATGAGGAAAAGAAGTACACGATGGGGGACGCTCCTGATTATGACACGAAGCCAGTGGCTGAATGAAAAATTCAA
GUS	NM_000181	CCCACTCAGTAGCCAAGTCACAATGTTTGGAAAACAGCCCGTTTACTTGAGCAAGACTGATACCACCTGCGTG
HER2	NM_004448	CGGTGTGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGTGCCCGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACTTGCGAGAGG
HIF1A	NM_001530	TGAACATAAAGTCTGCAACATGGAAGGTATTGCACTGCACAGGCCACATTCACGTATATGATACCAACAGTAACCAACC
HNF3A	NM_004496	TCCAGGATGTTAGGAACTGTGAAGATGGAAGGGCATGAAACCAGCGACTGGAACAGCTACTACGCAGACAGC
ID1	NM_002165	AGAACCGCAAGGTGAGCAAGGTGGAGATTCTCCAGCACGTCATCGACTACATCAGGGACCTTCAGTTGGA
IGF1	NM_000618	TCCGGAGCTGTGATCTAAGGAGGCTGGAGATGTATTGCGCACCCCTCAAGCCTGCCAAGTCAGCTCGCTCTGTCCG
IGF1R	NM_000875	GCATGGTAGCCGAAGATTTCACAGTCAAAATCGGAGATTTTGGTATGACGCGAGATATCTATGAGACAGACTATTACCC
IGFBP2	NM_000597	GTGGACAGCACCATGAACATGTTGGGCGGGGGAGGCAGTGCTGGCCGGAAGCCCCTCAAGTCGGGTATGAAGG
IL6	NM_000600	CCTGAACCTTCCAAAGATGGCTGAAAAAGATGGATGCTTCCAATCTGGATTCAATGAGGAGACTTGCCTGGT
IRS1	NM_005544	CCACAGCTCACCTTCTGTCAGGTGTCCATCCCAGCTCCAGCCAGCTCCGAGAGAGGAAGAGACTGGCACTGAGG
KI-67	NM_002417	CGGACTTTGGGTGCGACTTGACGAGCGGTGGTTCGACAAGTGGCCTTGCGGGCCGGATCGTCCCAGTGGAAGAGTTC
KLK10	NM_002776	GCCCAGAGGCTCCATCGTCCATCCTCTTCCTCCCCAGTCGGCTGAACTCTCCCCTTGTCTGCACTGTTCAAACCTCTG
KRT14	NM_000526	GGCCTGCTGAGATCAAAGACTACAGTCCCTACTTCAAGACCATTGAGGACCTGAGGAACAAGATTCTCACAGCCACAG
KRT17	NM_000422	CGAGGATTGGTTCTTCAGCAAGACAGAGGAACTGAACCGCGAGGTGGCCACCAACAGTGAGCTGGTGCAGAGT
KRT18	NM_000224	AGAGATCGAGGCTCTCAAGGAGGAGCTGCTCTTCATGAAGAAGAACCACGAAGAGGAAGTAAAAGGCC
KRT19	NM_002276	TGAGCGGCAGAATCAGGAGTACCAGCGGCTCATGGACATCAAGTCGCGGCTGGAGCAGGAGATTGCCACCTACCGCA
KRT5	NM_000424	TCAGTGGAGAAGGAGTTGGACCAGTCAACATCTCTGTTGTCACAAGCAGTGTTTCCTCTGGATATGGCA
KRT8	NM_002273	GGATGAAGCTTACATGAACAAGGTAGAGCTGGAGTCTCGCCTGGAAGGGCTGACCGACGAGATCAACTTCCTCAGGC
LOT1 varia	NM_002656	GGAAAGACCACCTGAAAAACCACCTCCAGACCCACGACCCCAACAAAATGGCCTTTGGGTGTGAGGAGTGTGGGAAG
Maspin	NM_002639	CAGATGGCCACTTTGAGAACATTTTAGCTGACAACAGTGTGAACGACCAGACCAAAATCCTTGTGGTTAATGCTGCC
MCM2	NM_004526	GACTTTTGCCCGCTACCTTTCATTCCGGCGTGACAACAATGAGCTGTTGCTCTTCATACTGAAGCAGTTAGTGGC
MCM3	NM_002388	GGAGAACAATCCCCTTGAGACAGAATATGGCCTTTCTGTCTACAAGGATCACCAGACCATCACCATCCAGGAGAT
MCM6	NM_005915	TGATGGTCCTATGTGTCACATTCATCACAGGTTTCATACCAACACAGGCTTCAGCACTTCCTTTGGTGTGTTTCCTGTC
MDM2	NM_002392	CTACAGGGACGCCATCGAATCCGGATCTTGATGCTGGTGTAAGTGAACATTCAGGTGATTGGTTGGAT
MMP9	NM_004994	GAGAACCAATCTCACCGACAGGCAGCTGGCAGAGGAATACCTGTACCGCTATGGTTACACTCGGGTG
MTA1	NM_004689	CCGCCCTCACCTGAAGAGAAACGCGCTCCTTGGCGGACACTGGGGGAGGAGAAGGCGCGGCTAACTTATTCC
MYBL2	NM_002466	GCCGAGATCGCCAAGATGTTGCCAGGGAGGACAGACAATGCTGTGAAGAATCACTGGAACTCTACCATCAAAAG
P14ARF	S78535	CCCTCGTGCTGATGCTACTGAGGAGCCAGCGTCTAGGGCAGCAGCCGCTTCCTAGAAGACCAGGTCATGATG
p27	NM_004064	CGGTGGACCACGAAGAGTTAACCCGGGACTTGGAGAAGCACTGCAGAGACATGGAAGAGGCGAGCC
P53	NM_000546	CTTTGAACCCTTGCTTGCAATAGGTGTGCGTCAGAAGCACCCAGGACTTCCATTTGCTTTGTCCCGGG
PAI1	NM_000602	CCGCAACGTGGTTTTCTCACCCTATGGGGTGGCCTCGGTGTTGGCCATGCTCCAGCTGACAACAGGAGGAGAAACCC
PDGFRb	NM_002609	CCAGCTCTCCTTCCAGCTACAGATCAATGTCCCTGTCCGAGTGCTGGAGCTAAGTGAGAGCCACCC
PI3KC2A	NM_002645	ATACCAATCACCGCACAAACCCAGGCTATTTGTTAAGTCCAGTCACAGCGCAAAGAAACATATGCGGAGAAAATGCTAC
PPM1D	NM_003620	GCCATCCGCAAAGGCTTTCTCGCTTGTCACCTTGCCATGTGGAAGAAACTGGCGGAATGGCC
PR	NM_000926	GCATCAGGCTGTCATTATGGTGTCCTTACCTGTGGGAGCTGTAAGGTCTTCTTTAAGAGGGCAATGGAAGGGCAGCAC
PRAME	NM_006115	TCTCCATATCTGCCTTGCAGAGTCTCCTGCAGCACCTCATCGGGCTGAGCAATCTGACCCACGTGC
pS2	NM_003225	GCCCTCCCAGTGTGCAAATAAGGGCTGCTGTTTCGACGACACCGTTCGTGGGGTCCCCTGGTGCTTCTATCCTAATAC
RAD51C	NM_058216	GAACTTCTTGAGCAGGAGCATACCCAGGGCTTCATAATCACCTTCTGTTCAGCACTAGATGATATTCTTGGGGGTGGA
RB1	NM_000321	CGAAGCCCTTACAAGTTTCCTAGTTCACCCTTACGGATTCCTGGAGGGAACATCTATATTTCACCCCTGAAGAGTCC
RIZ1	NM_012231	CCAGACGAGCGATTAGAAGCGGCAGCTTGTGAGGTGAATGATTTGGGGGAAGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAGGA
STK15	NM_003600	CATCTTCCAGGAGGACCACTCTCTGTGGCACCCTGGACTACCTGCCCCCTGAAATGATTGAAGGTCGGA
STMY3	NM_005940	CCTGGAGGCTGCAACATACCTCAATCCTGTCCCAGGCCGGATCCTCCTGAAGCCCTTTTCGCAGCACTGCTATCCTCC

TABLA 5B

SURV	NM_001168	TGTTTTGATTCCCGCGCTTACCAGGTGAGAAGTGAGGGAGGAAGAAGGCAGTGTCCCTTTTGCTAGAGCTGACAGCTTTG
TBP	NM_003194	GCCCGAAACGCCGAATATAATCCCAAGCGGTTTGCTGCGGTAATCATGAGGATAAGAGAGCCACG
TGFA	NM_003236	GGTGTGCCACAGACCTTCCTACTTGGCCTGTAATCACCTGTGCAGCCTTTTGTGGGCCTTCAAAACTCTGTCAAGAACTCCGT
TIMP1	NM_003254	TCCCTGCGGTCCCAGATAGCCTGAATCCTGCCCGGAGTGGAACTGAAGCCTGCACAGTGTCCACCCTGTTCCCAC
TOP3A	NM_004067	AATCCAAGGGGGAGAGTGATGACTTCCATATGGACTTTGACTCAGCTGTGGCTCCTCGGGCAAAATCTGTAC
TOP2B	NM_001068	TGTGGACATCTTCCCCTCAGACTTCCCTACTGAGCCACCTTCTCTGCCACGAACCCGGTCGGGCTAG
TP	NM_001953	CTATATGCAGCCAGAGATGTGACAGCCACCGTGGACAGCCTGCCACTCATCACAGCCTCCATTCTCAGTAAGAAACTCGTGG
TP53BP2	NM_005426	GGGCCAAATATTCAGAAGCTTTTATATCACAGGACCACCATAGCGGCCATGGAGACCATCTCTGTCCCATCATACCCATCC
TRAIL	NM_003810	CTTCACAGTGCTCCTGCAGTCTCTCTGTGTGGCTGTAACTTACGTGTACTTTACCAACGAGCTGAAGCAGATG
TS	NM_001071	GCCTCGGTGTGCCTTTCAACATCGCCAGCTACGCCCTGCTCACGTACATGATTGCGCACATCACG
uPa	NM_002658	GTGGATGTGCCCTGAAGGACAAGCCAGGCGTCTACACGAGAGTCTCACACTTCTTACCCTGGATCCGCAG
VDR	NM_000376	GCCCTGGATTTCAGAAAGAGCCAAGTCTGGATCTGGGACCCTTTCCTTCCTTCCCTGGCTTCTAACT
VEGF	NM_003376	CTGCTGTCTTGGGTGCATTGGAGCCTTGCCTTGCTGCTCTACCTCCACCATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGC
VEGFB	NM_003377	TGACGATGGCCTGGAGTGTGTGCCCACTGGGCAGCACCAAGTCCGGATGCAGATCCTCATGATCCGGTACC
WISP1	NM_003882	AGAGGCATCCATGAACTTCACACTTGCGGGCTGCATCAGCACACGCTCCTATCAACCCAAGTACTGTGGAGTTTG
XIAP	NM_001167	GCAGTTGGAAGACACAGGAAAGTATCCCCAAATTGCAGATTTATCAACGGCTTTTATCTTGAAAATAGTGCCACGCA
YB-1	NM_004559	AGACTGTGGAGTTTGATGTTGTTGAAGGAGAAAAGGGTGCGGAGGCAGCAAATGTTACAGGTCCTGGTGGTGTTCC
ZNF217	NM_006526	ACCCAGTAGCAAGGAGAAGCCCACTCACTGCTCCGAGTGCCGCAAAGCTTTCAGAACCTACCACCAGCTG

Gen	Acceso	Nombre de Sonda	Sec.	Long.
AIB1	NM_006534	S1994/AIB1.f3	GCGGCGAGTTTCCGATTTA	19
AIB1	NM_006534	S1995/AIB1.r3	TGAGTCCACCATCCAGCAAGT	21
AIB1	NM_006534	S5055/AIB1.p3	ATGGCGGCGGGAGGATCAAAA	21
AKT1	NM_005163	S0010/AKT1.f3	CGCTTCTATGGCGCTGAGAT	20
AKT1	NM_005163	S0012/AKT1.r3	TCCCGGTACACCACGTTCTT	20
AKT1	NM_005163	S4776/AKT1.p3	CAGCCCTGGACTACCTGCACTCGG	24
AKT2	NM_001626	S0828/AKT2.f3	TCCTGCCACCCTTCAAACC	19
AKT2	NM_001626	S0829/AKT2.r3	GGCGGTAAATTCATCATCGAA	21
AKT2	NM_001626	S4727/AKT2.p3	CAGGTCACGTCCGAGGTCGACACA	24
APC	NM_000038	S0022/APC.f4	GGACAGCAGGAATGTGTTTC	20
APC	NM_000038	S0024/APC.r4	ACCCACTCGATTTGTTTCTG	20
APC	NM_000038	S4888/APC.p4	CATTGGCTCCCCGTGACCTGTA	22
AREG	NM_001657	S0025/AREG.f2	TGTGAGTGAAATGCCTTCTAGTAGTGA	27
B-actina	NM_001657	S0027/AREG.r2	TTGTGGTTCGTTATCATACTCTTCTGA	27
B-actina	NM_001657	S4889/AREG.p2	CCGTCCTCGGGAGCCGACTATGA	23
B-actina	NM_001101	S0034/B-acti.f2	CAGCAGATGTGGATCAGCAAG	21
B-Catenina	NM_001101	S0036/B-acti.r2	GCATTTGCGGTGGACGAT	18
B-Catenina	NM_001101	S4730/B-acti.p2	AGGAGTATGACGAGTCCGGCCCC	23
B-Catenina	NM_001904	S2150/B-Cate.f3	GGCTCTTGTGCGTACTGTCCTT	22
B-Catenin	NM_001904	S2151/B-Cate.r3	TCAGATGACGAAGAGCACAGATG	23
B-Catenin	NM_001904	S5046/B-Cate.p3	AGGCTCAGTGATGTCTTCCCTGTCACCAG	29
BAD	NM_032989	S2011/BAD.f1	GGGTCAGGTGCCTCGAGAT	19
BAD	NM_032989	S2012/BAD.r1	CTGCTCACTCGGCTCAAACTC	21
BAD	NM_032989	S5058/BAD.p1	TGGGCCCAGAGCATGTTCCAGATC	24
BAG1	NM_004323	S1386/BAG1.f2	CGTTGTCAGCACTTGGAATACAA	23
BAG1	NM_004323	S1387/BAG1.r2	GTTCAACCTCTTCCTGTGGACTGT	24
BAG1	NM_004323	S4731/BAG1.p2	CCCAATTAACATGACCCGGCAACCAT	26
BBC3	NM_014417	S1584/BBC3.f2	CCTGGAGGGTCCTGTACAAT	20
BBC3	NM_014417	S1585/BBC3.r2	CTAATTGGGCTCCATCTCG	19
BBC3	NM_014417	S4890/BBC3.p2	CATCATGGGACTCCTGCCCTTACC	24
Bcl2	NM_000633	S0043/Bcl2.f2	CAGATGGACCTAGTACCCACTGAGA	25
Bcl2	NM_000633	S0045/Bcl2.r2	CCTATGATTTAAGGGCATTTTTCC	24
Bcl2	NM_000633	S4732/Bcl2.p2	TTCCACGCCGAAGGACAGCGAT	22
CA9	NM_001216	S1398/CA9.f3	ATCCTAGCCCTGGTTTTTGG	20
CA9	NM_001216	S1399/CA9.r3	CTGCCTTCTCATCTGCACAA	20
CA9	NM_001216	S4938/CA9.p3	TTTGCTGTCACCAGCGTCGC	20
CCNB1	NM_031966	S1720/CCNB1.f2	TTCAGGTTGTTGCAGGAGAC	20
CCNB1	NM_031966	S1721/CCNB1.r2	CATCTTCTTGGGCACACAAT	20
CCNB1	NM_031966	S4733/CCNB1.p2	TGTCTCCATTATTGATCGGTTCATGCA	27
CCND1	NM_001758	S0058/CCND1.f3	GCATGTTCGTGGCCTCTAAGA	21
CCND1	NM_001758	S0060/CCND1.r3	CGGTGTAGATGCACAGCTTCTC	22
CCND1	NM_001758	S4986/CCND1.p3	AAGGAGACCATCCCCCTGACGGC	23
CCNE1	NM_001238	S1446/CCNE1.f1	AAAGAAGATGATGACCGGGTTTAC	24
CCNE1	NM_001238	S1447/CCNE1.r1	GAGCCTCTGGATGGTGCAAT	20
CCNE1	NM_001238	S4944/CCNE1.p1	CAAACTCAACGTGCAAGCCTCGGA	24
CCNE2	NM_057749	S1458/CCNE2.f2	ATGCTGTGGCTCCTTCCTAACT	22
CCNE2	NM_057749	S1459/CCNE2.r2	ACCCAAATTGTGATATACAAAAAGGTT	27
CCNE2	NM_057749	S4945/CCNE2.p2	TACCAAGCAACCTACATGTCAAGAAAGCCC	30
CD3z	NM_000734	S0064/CD3z.f1	AGATGAAGTGGAAGGCGCTT	20
CD3z	NM_000734	S0066/CD3z.r1	TGCCTCTGTAATCGGCAACTG	21
CD3z	NM_000734	S4988/CD3z.p1	CACCGCGGCCATCCTGCA	18
CD68	NM_001251	S0067/CD68.f2	TGGTTCCCAGCCCTGTGT	18
CD68	NM_001251	S0069/CD68.r2	CTCCTCCACCCTGGGTTGT	19
CD68	NM_001251	S4734/CD68.p2	CTCCAAGCCCAGATTCAGATTCGAGTCA	28
CD9	NM_001769	S0686/CD9.f1	GGGCGTGGAACAGTTTATCT	20
CD9	NM_001769	S0687/CD9.r1	CACGGTGAAGGTTTCGAGT	19
CD9	NM_001769	S4792/CD9.p1	AGACATCTGCCCCAAGAAGGACGT	24
CDH1	NM_004360	S0073/CDH1.f3	TGAGTGTCCCCCGGTATCTTC	21
CDH1	NM_004360	S0075/CDH1.r3	CAGCCGCTTTCAGATTTTCAT	21
CDH1	NM_004360	S4990/CDH1.p3	TGCCAATCCCGATGAAATTGGAAATTT	27
CEGP1	NM_020974	S1494/CEGP1.f2	TGACAATCAGCACACCTGCAT	21

CEGP1	NM_020974	S1495/CEGP1.r2	TGTGACTACAGCCGTGATCCTTA	23
CEGP1	NM_020974	S4735/CEGP1.p2	CAGGCCCTCTTCCGAGCGGT	20
Chk1	NM_001274	S1422/Chk1.f2	GATAAATTGGTACAAGGGATCAGCTT	26
Chk1	NM_001274	S1423/Chk1.r2	GGGTGCCAAGTAACTGACTATTCA	24
Chk1	NM_001274	S4941/Chk1.p2	CCAGCCCACATGTCCTGATCATATGC	26
CIAP1	NM_001166	S0764/CIAP1.f2	TGCCTGTGGTGGGAAGCT	18
CIAP1	NM_001166	S0765/CIAP1.r2	GGAAAATGCCTCCGGTGTT	19
CIAP1	NM_001166	S4802/CIAP1.p2	TGACATAGCATCATCCTTTGGTTCCCAGTT	30
cIAP2	NM_001165	S0076/cIAP2.f2	GGATATTTCCGTGGCTCTTATTCA	24
cIAP2	NM_001165	S0078/cIAP2.r2	CTTCTCATCAAGGCAGAAAAATCTT	25
cIAP2	NM_001165	S4991/cIAP2.p2	TCTCCATCAAATCCTGTAAACTCCAGAGCA	30
cMet	NM_000245	S0082/cMet.f2	GACATTTCCAGTCCTGCAGTCA	22
cMet	NM_000245	S0084/cMet.r2	CTCCGATCGCACACATTTGT	20
cMet	NM_000245	S4993/cMet.p2	TGCCTCTCTGCCCCACCCTTTGT	23
Contig 27882	AK000618	S2633/Contig.f3	GGCATCCTGGCCCAAAGT	18
Contig 27882	AK000618	S2634/Contig.r3	GACCCCCTCAGCTGGTAGTTG	21
Contig 27882	AK000618	S4977/Contig.p3	CCCAAATCCAGGCGGCTAGAGGC	23
COX2	NM_000963	S0088/COX2.f1	TCTGCAGAGTTGGAAGCACTCTA	23
COX2	NM_000963	S0090/COX2.r1	GCCGAGGCTTTTCTACCAGAA	21
COX2	NM_000963	S4995/COX2.p1	CAGGATACAGCTCCACAGCATCGATGTC	28
CTSL	NM_001912	S1303/CTSL.f2	GGGAGGCTTATCTCACTGAGTGA	23
CTSL	NM_001912	S1304/CTSL.r2	CCATTGCAGCCTTCATTGC	19
CTSL	NM_001912	S4899/CTSL.p2	TTGAGGCCCAGAGCAGTCTACCAGATTCT	29
CTSL2	NM_001333	S4354/CTSL2.f1	TGTCTCACTGAGCGAGCAGAA	21
CTSL2	NM_001333	S4355/CTSL2.r1	ACCATTGCAGCCCTGATTG	19
CTSL2	NM_001333	S4356/CTSL2.p1	CTTGAGGACGCGAACAGTCCACCA	24
DAPK1	NM_004938	S1768/DAPK1.f3	CGCTGACATCATGAATGTTCCT	22
DAPK1	NM_004938	S1769/DAPK1.r3	TCTCTTTCAGCAACGATGTGTCTT	24
DAPK1	NM_004938	S4927/DAPK1.p3	TCATATCCAAACTCGCCTCCAGCCG	25
DIABLO	NM_019887	S0808/DIABLO.f1	CACAATGGCGGCTCTGAAG	19
DIABLO	NM_019887	S0809/DIABLO.r1	ACACAAACACTGTCTGTACCTGAAGA	26
DIABLO	NM_019887	S4813/DIABLO.p1	AAGTTACGCTGCGCGACAGCCAA	23
DR5	NM_003842	S2551/DR5.f2	CTCTGAGACAGTGCTTCGATGACT	24
DR5	NM_003842	S2552/DR5.r2	CCATGAGGCCCAACTTCCT	19
DR5	NM_003842	S4979/DR5.p2	CAGACTTGGTGCCCTTTGACTCC	23
EGFR	NM_005228	S0103/EGFR.f2	TGTCGATGGACTTCCAGAAC	20
EGFR	NM_005228	S0105/EGFR.r2	ATTGGGACAGCTTGGATCA	19
EGFR	NM_005228	S4999/EGFR.p2	CACCTGGGCAGCTGCCAA	18
EIF4E	NM_001968	S0106/EIF4E.f1	GATCTAAGATGGCGACTGTCGAA	23
EIF4E	NM_001968	S0108/EIF4E.r1	TTAGATTCCGTTTTCTCCTCTTCTG	25
EIF4E	NM_001968	S5000/EIF4E.p1	ACCACCCCTACTCCTAATCCCCCGACT	27
EMS1	NM_005231	S2663/EMS1.f1	GGCAGTGTCACTGAGTCCTTGA	22
EMS1	NM_005231	S2664/EMS1.r1	TGCACTGTGCGTCCCAAT	18
EMS1	NM_005231	S4956/EMS1.p1	ATCCTCCCCTGCCCCGCG	18
EpCAM	NM_002354	S1807/EpCAM.f1	GGGCCCTCCAGAACAATGAT	20
EpCAM	NM_002354	S1808/EpCAM.r1	TGCACTGCTTGGCCTTAAAGA	21
EpCAM	NM_002354	S4984/EpCAM.p1	CCGCTCTCATCGCAGTCAGGATCAT	25
EPHX1	NM_000120	S1865/EPHX1.f2	ACCGTAGGCTCTGCTCTGAA	20
EPHX1	NM_000120	S1866/EPHX1.r2	TGGTCCAGGTGGAAAACTTC	20
EPHX1	NM_000120	S4754/EPHX1.p2	AGGCAGCCAGACCCACAGGA	20
ErbB3	NM_001982	S0112/ErbB3.f1	CGGTTATGTCATGCCAGATACAC	23
ErbB3	NM_001982	S0114/ErbB3.r1	GAACTGAGACCCACTGAAGAAAGG	24
ErbB3	NM_001982	S5002/ErbB3.p1	CCTCAAAGGTACTCCCTCCTCCCGG	25
EstR1	NM_000125	S0115/EstR1.f1	CGTGGTGCCCCTCTATGAC	19
EstR1	NM_000125	S0117/EstR1.r1	GGCTAGTGGGCGCATGTAG	19
EstR1	NM_000125	S4737/EstR1.p1	CTGGAGATGCTGGACGCCC	19
FBXO5	NM_012177	S2017/FBXO5.r1	GGATTGTAGACTGTCACCGAAATTC	25
FBXO5	NM_012177	S2018/FBXO5.f1	GGCTATTCCTCATTTTCTCTACAAAGTG	28
FBXO5	NM_012177	S5061/FBXO5.p1	CCTCCAGGAGGCTACCTTCTTCATGTTCAC	30
FGF18	NM_003862	S1665/FGF18.f2	CGGTAGTCAAGTCCGGATCAA	21
FGF18	NM_003862	S1666/FGF18.r2	GCTTGCCTTTGCGGTTCA	18
FGF18	NM_003862	S4914/FGF18.p2	CAAGGAGACGGAATTCTACCTGTGC	25

FGFR1	NM_023109	S0818/FGFR1.f3	CACGGGACATTCACCACATC	20
FGFR1	NM_023109	S0819/FGFR1.r3	GGGTGCCATCCACTTCACA	19
FGFR1	NM_023109	S4816/FGFR1.p3	ATAAAAAGACAACCAACGGCCGACTGC	27
FHIT	NM_002012	S2443/FHIT.f1	CCAGTGGAGCGCTTCCAT	18
FHIT	NM_002012	S2444/FHIT.r1	CTCTCTGGGTCGTCTGAAACAA	22
FHIT	NM_002012	S2445/FHIT.p1	TCGGCCACTTCATCAGGACGCAG	23
FHIT	NM_002012	S4921/FHIT.p1	TCGGCCACTTCATCAGGACGCAG	23
FRP1	NM_003012	S1804/FRP1.f3	TTGGTACCTGTGGGTTAGCA	20
FRP1	NM_003012	S1805/FRP1.r3	CACATCCAAATGCAAACTGG	20
FRP1	NM_003012	S4983/FRP1.p3	TCCCCAGGGTAGAATTCAATCAGAGC	26
G-Catenina	NM_002230	S2153/G-Cate.f1	TCAGCAGCAAGGGCATCAT	19
G-Catenina	NM_002230	S2154/G-Cate.r1	GGTGGTTTTCTTGAGCGTGTACT	23
G-Catenina	NM_002230	S5044/G-Cate p1	CGCCCGCAGGCCTCATCCT	19
GAPDH	NM_002046	S0374/GAPDH.f1	ATTCCACCCATGGCAAATTC	20
GAPDH	NM_002046	S0375/GAPDH.r1	GATGGGATTTCCATTGATGACA	22
GAPDH	NM_002046	S4738/GAPDH.p1	CCGTTCTCAGCCTTGACGGTGC	22
GATA3	NM_002051	S0127/GATA3.f3	CAAAGGAGCTCACTGTGGTGTCT	23
GATA3	NM_002051	S0129/GATA3.r3	GAGTCAGAATGGCTTATTCACAGATG	26
GATA3	NM_002051	S5005/GATA3.p3	TGTTCCAACCACTGAATCTGGACC	24
GRB7	NM_005310	S0130/GRB7.f2	CCATCTGCATCCATCTTGTT	20
GRB7	NM_005310	S0132/GRB7.r2	GGCCACCAGGGTATTATCTG	20
GRB7	NM_005310	S4726/GRB7.p2	CTCCCCACCCTTGAGAAGTGCCT	23
GRO1	NM_001511	S0133/GRO1.f2	CGAAAAGATGCTGAACAGTGACA	23
GRO1	NM_001511	S0135/GRO1.r2	TCAGGAACAGCCACCAGTGA	20
GRO1	NM_001511	S5006/GRO1.p2	CTTCCTCCTCCCTTCTGGTCAGTTGGAT	28
GSTM1	NM_000561	S2026/GSTM1.r1	GGCCCAGCTTGAATTTTTCA	20
GSTM1	NM_000561	S2027/GSTM1.f1	AAGCTATGAGGAAAAGAAGTACACGAT	27
GSTM1	NM_000561	S4739/GSTM1.p1	TCAGCCACTGGCTTCTGTCATAATCAGGAG	30
GUS	NM_000181	S0139/GUS.f1	CCCACTCAGTAGCCAAGTCA	20
GUS	NM_000181	S0141/GUS.r1	CACGCAGGTGGTATCAGTCT	20
GUS	NM_000181	S4740/GUS.p1	TCAAGTAAACGGGCTGTTTTCCAAACA	27
HER2	NM_004448	S0142/HER2.f3	CGGTGTGAGAAGTGCAGCAA	20
HER2	NM_004448	S0144/HER2.r3	CCTCTCGCAAGTGCTCCAT	19
HER2	NM_004448	S4729/HER2.p3	CCAGACCATAGCACACTCGGGCAC	24
HIF1A	NM_001530	S1207/HIF1A.f3	TGAACATAAAGTCTGCAACATGGA	24
HIF1A	NM_001530	S1208/HIF1A.r3	TGAGGTTGGTTACTGTTGGTATCATATA	28
HIF1A	NM_001530	S4753/HIF1A.p3	TTGCACTGCACAGGCCACATTCAC	24
HNF3A	NM_004496	S0148/HNF3A.f1	TCCAGGATGTTAGGAACTGTGAAG	24
HNF3A	NM_004496	S0150/HNF3A.r1	GCGTGTCTGCGTAGTAGCTGTT	22
HNF3A	NM_004496	S5008/HNF3A.p1	AGTCGCTGGTTTCATGCCCTTCCA	24
ID1	NM_002165	S0820/ID1.f1	AGAACCGCAAGGTGAGCAA	19
ID1	NM_002165	S0821/ID1.r1	TCCAACTGAAGGTCCCTGATG	21
ID1	NM_002165	S4832/ID1.p1	TGGAGATTCTCCAGCACGTCATCGAC	26
IGF1	NM_000618	S0154/IGF1.f2	TCCGGAGCTGTGATCTAAGGA	21
IGF1	NM_000618	S0156/IGF1.r2	CGGACAGAGCGAGCTGACTT	20
IGF1	NM_000618	S5010/IGF1.p2	TGTATTGCGCACCCCTCAAGCCTG	24
IGF1R	NM_000875	S1249/IGF1R.f3	GCATGGTAGCCGAAGATTTCA	21
IGF1R	NM_000875	S1250/IGF1R.r3	TTTCCGGTAATAGTCTGTCTCATAGATATC	30
IGF1R	NM_000875	S4895/IGF1R.p3	CGCGTCATACCAAAATCTCCGATTTTGA	28
IGFBP2	NM_000597	S1128/IGFBP2.f1	GTGGACAGCACCATGAACA	19
IGFBP2	NM_000597	S1129/IGFBP2.r1	CCTTCATACCCGACTTGAGG	20
IGFBP2	NM_000597	S4837/IGFBP2.p1	CTTCCGGCCAGCACTGCCTC	20
IL6	NM_000600	S0760/IL6.f3	CCTGAACCTTCCAAAGATGG	20
IL6	NM_000600	S0761/IL6.r3	ACCAGGCAAGTCTCCTCATT	20
IL6	NM_000600	S4800/IL6.p3	CCAGATTGGAAGCATCCATCTTTTTCA	27
IRS1	NM_005544	S1943/IRS1.f3	CCACAGCTCACCTTCTGTCA	20
IRS1	NM_005544	S1944/IRS1.r3	CCTCAGTGCCAGTCTCTTCC	20
IRS1	NM_005544	S5050/IRS1.p3	TCCATCCCAGCTCCAGCCAG	20
Ki-67	NM_002417	S0436/Ki-67.f2	CGGACTTTGGGTGCGACTT	19
Ki-67	NM_002417	S0437/Ki-67.r2	TTACAACTCTTCCACTGGGACGAT	24
Ki-67	NM_002417	S4741/Ki-67.p2	CCACTTGTCGAACCACCGCTCGT	23
KLK10	NM_002776	S2624/KLK10.f3	GCCCAGAGGCTCCATCGT	18

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

PI3KC2A	NM_002645	S2020/PI3KC2.r1	CACACTAGCATTTTCTCCGCATA	23
PI3KC2A	NM_002645	S2021/PI3KC2.f1	ATACCAATCACCGCACAAACC	21
PI3KC2A	NM_002645	S5062/PI3KC2.p1	TGCGCTGTGACTGGACTTAACAAATAGCCT	30
PPM1D	NM_003620	S3159/PPM1D.f1	GCCATCCGCAAAGGCTTT	18
PPM1D	NM_003620	S3160/PPM1D.r1	GGCCATTCCGCCAGTTTC	18
PPM1D	NM_003620	S4856/PPM1D.p1	TCGCTTGTCACCTTGCCATGTGG	23
PR	NM_000926	S1336/PR.f6	GCATCAGGCTGTCATTATGG	20
PR	NM_000926	S1337/PR.r6	AGTAGTTGTGCTGCCCTTCC	20
PR	NM_000926	S4743/PR.p6	TGTCCTTACCTGTGGGAGCTGTAAGGTC	28
PRAME	NM_006115	S1985/PRAME.f3	TCTCCATATCTGCCTTGCAGAGT	23
PRAME	NM_006115	S1986/PRAME.r3	GCACGTGGGTCAGATTGCT	19
PRAME	NM_006115	S4756/PRAME.p3	TCCTGCAGCACCTCATCGGGCT	22
pS2	NM_003225	S0241/pS2.f2	GCCCTCCCAGTGTGCAAAT	19
pS2	NM_003225	S0243/pS2.r2	CGTCGATGGTATTAGGATAGAAGCA	25
pS2	NM_003225	S5026/pS2.p2	TGCTGTTTCGACGACACCGTTCG	23
RAD51C	NM_058216	S2606/RAD51C.f3	GAACTTCTTGAGCAGGAGCATACC	24
RAD51C	NM_058216	S2607/RAD51C.r3	TCCACCCCCAAGAATATCATCTAGT	25
RAD51C	NM_058216	S4764/RAD51C.p3	AGGGCTTCATAATCACCTTCTGTTC	25
RB1	NM_000321	S2700/RB1.f1	CGAAGCCCTTACAAGTTTCC	20
RB1	NM_000321	S2701/RB1.r1	GGACTCTTCAGGGGTGAAAT	20
RB1	NM_000321	S4765/RB1.p1	CCCTTACGGATTCCTGGAGGGAAC	24
RIZ1	NM_012231	S1320/RIZ1.f2	CCAGACGAGCGATTAGAAGC	20
RIZ1	NM_012231	S1321/RIZ1.r2	TCCTCCTCTTCCTCCTCCTC	20
RIZ1	NM_012231	S4761/RIZ1.p2	TGTGAGGTGAATGATTTGGGGGA	23
STK15	NM_003600	S0794/STK15.f2	CATCTTCCAGGAGGACCACT	20
STK15	NM_003600	S0795/STK15.r2	TCCGACCTTCAATCATTTCA	20
STK15	NM_003600	S4745/STK15.p2	CTCTGTGGCACCCTGGACTACCTG	24
STMY3	NM_005940	S2067/STMY3.f3	CCTGGAGGCTGCAACATACC	20
STMY3	NM_005940	S2068/STMY3.r3	TACAATGGCTTTGGAGGATAGCA	23
STMY3	NM_005940	S4746/STMY3.p3	ATCCTCCTGAAGCCCTTTTCGCAGC	25
SURV	NM_001168	S0259/SURV.f2	TGTTTTGATTCCCGGGCTTA	20
SURV	NM_001168	S0261/SURV.r2	CAAAGCTGTCAGCTCTAGCAAAAG	24
SURV	NM_001168	S4747/SURV.p2	TGCCTTCTTCCTCCCTCACTTCTCACCT	28
TBP	NM_003194	S0262/TBP.f1	GCCCGAAACGCCGAATATA	19
TBP	NM_003194	S0264/TBP.r1	CGTGGCTCTCTTATCCTCATGAT	23
TBP	NM_003194	S4751/TBP.p1	TACCGCAGCAAACCGCTTGGG	21
TGFA	NM_003236	S0489/TGFA.f2	GGTGTGCCACAGACCTTCCT	20
TGFA	NM_003236	S0490/TGFA.r2	ACGGAGTTCTTGACAGAGTTTTGA	24
TGFA	NM_003236	S4768/TGFA.p2	TTGGCCTGTAATCACCTGTGCAGCCTT	27
TIMP1	NM_003254	S1695/TIMP1.f3	TCCCTGCGGTCCCAGATAG	19
TIMP1	NM_003254	S1696/TIMP1.r3	GTGGCAACAGGGTGGACACT	20
TIMP1	NM_003254	S4918/TIMP1.p3	ATCCTGCCCGGAGTGGAACTGAAGC	25
TOP2A	NM_001067	S0271/TOP2A.f4	AATCCAAGGGGGAGAGTGAT	20
TOP2A	NM_001067	S0273/TOP2A.r4	GTACAGATTTTGCCCGAGGA	20
TOP2A	NM_001067	S4777/TOP2A.p4	CATATGGACTTTGACTCAGCTGTGGC	26
TOP2B	NM_001068	S0274/TOP2B.f2	TGTGGACATCTTCCCCTCAGA	21
TOP2B	NM_001068	S0276/TOP2B.r2	CTAGCCCGACCGGTTCGT	18
TOP2B	NM_001068	S4778/TOP2B.p2	TTCCCTACTGAGCCACCTTCTCTG	24
TP	NM_001953	S0277/TP.f3	CTATATGCAGCCAGAGATGTGACA	24
TP	NM_001953	S0279/TP.r3	CCACGAGTTTCTTACTGAGAATGG	24
TP	NM_001953	S4779/TP.p3	ACAGCCTGCCACTCATCACAGCC	23
TP53BP2	NM_005426	S1931/TP53BP.f2	GGGCCAAATATTCAGAAGC	19
TP53BP2	NM_005426	S1932/TP53BP.r2	GGATGGGTATGATGGGACAG	20
TP53BP2	NM_005426	S5049/TP53BP.p2	CCACCATAGCGGCCATGGAG	20
TRAIL	NM_003810	S2539/TRAIL.f1	CTTCACAGTGCTCCTGCAGTCT	22
TRAIL	NM_003810	S2540/TRAIL.r1	CATCTGCTTCAGCTCGTTGGT	21
TRAIL	NM_003810	S4980/TRAIL.p1	AAGTACACGTAAGTTACAGCCACACA	26
TS	NM_001071	S0280/TS.f1	GCCTCGGTGTGCCTTTCA	18
TS	NM_001071	S0282/TS.r1	CGTGATGTGCGCAATCATG	19
TS	NM_001071	S4780/TS.p1	CATCGCCAGCTACGCCCTGCTC	22
upa	NM_002658	S0283/upa.f3	GTGCATGTGCCCTGAAGGA	19
upa	NM_002658	S0285/upa.r3	CTGCGGATCCAGGGTAAGAA	20

TABLA 6F

upa	NM_002658	S4769/upa p3	AAGCCAGGCGTCTACACGAGAGTCTCAC	28
VDR	NM_000376	S2745/VDR f2	GCCCTGGATTTCAGAAAGAG	20
VDR	NM_000376	S2746/VDR r2	AGTTACAAGCCAGGGAAGGA	20
VDR	NM_000376	S4962/VDR p2	CAAGTCTGGATCTGGGACCCTTTCC	25
VEGF	NM_003376	S0286/VEGF f1	CTGCTGTCTTGGGTGCATTG	20
VEGF	NM_003376	S0288/VEGF r1	GCAGCCTGGGACCACTTG	18
VEGF	NM_003376	S4782/VEGF p1	TTGCCTTGCTGCTCTACCTCCACCA	25
VEGFB	NM_003377	S2724/VEGFB f1	TGACGATGGCCTGGAGTGT	19
VEGFB	NM_003377	S2725/VEGFB r1	GCTACCGGATCATGAGGATCTG	22
VEGFB	NM_003377	S4960/VEGFB p1	CTGGGCAGCACCAAGTCCGGA	21
WISP1	NM_003882	S1671/WISP1 f1	AGAGGCATCCATGAACTTCACA	22
WISP1	NM_003882	S1672/WISP1 r1	CAAACTCCACAGTACTTGGGTTGA	24
WISP1	NM_003882	S4915/WISP1 p1	CGGGCTGCATCAGCACACGC	20
XIAP	NM_001167	S0289/XIAP f1	GCAGTTGGAAGACACAGGAAAGT	23
XIAP	NM_001167	S0291/XIAP r1	TGCGTGGCACTATTTTCAAGA	21
XIAP	NM_001167	S4752/XIAP p1	TCCCCAAATTGCAGATTTATCAACGGC	27
YB-1	NM_004559	S1194/YB-1 f2	AGACTGTGGAGTTTGATGTTGTTGA	25
YB-1	NM_004559	S1195/YB 1 r2	GGAACACCACCAGGACCTGTAA	22
YB 1	NM_004559	S4843/YB 1 p2	TTGCTGCCTCCGCACCCTTTTCT	23
ZNF217	NM_006526	S2739/ZNF217 f3	ACCCAGTAGCAAGGAGAAGC	20
ZNF217	NM_006526	S2740/ZNF217 r3	CAGCTGGTGGTAGGTTCTGA	20
ZNF217	NM_006526	S4961/ZNF217 p3	CACTCACTGCTCCGAGTGCGG	21

REIVINDICACIONES

1. Un método de predicción de la probabilidad de supervivencia a largo plazo de un paciente de cáncer de mama sin recurrencia del cáncer de mama, que comprende determinar el nivel de expresión del transcrito de RNA de CD68 en una muestra de tejido de cáncer de mama obtenida de dicho paciente, normalizado contra el nivel de expresión de todos los transcritos de RNA o sus productos en dicha muestra, o de una serie de referencia de transcritos de RNA o sus productos de expresión, en donde la expresión de CD68 indica una probabilidad reducida de supervivencia a largo plazo sin recurrencia de cáncer de mama.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el cáncer de mama es carcinoma ductal de mama invasivo.

3. El método de la reivindicación 2, que comprende adicionalmente determinar los niveles de expresión de los transcritos de RNA de cualquiera de los genes siguientes: GRB7, CTSL, Chk1, Her2, STK15, AIB1, SURV, EGFR, MYBL2, HIF1α, o sus productos de expresión, en donde la expresión de dichos genes o sus productos de expresión por encima de un umbral de expresión definido indica una probabilidad reducida de supervivencia a largo plazo sin recurrencia del cáncer de mama.

4. El método de la reivindicación 1, en el cual el cáncer de mama es cáncer de mama ER-positivo.

5. El método de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente determinar los niveles de expresión de los transcritos de RNA de los genes siguientes: CTSL, FBX05, SURV, CCNB1, MCM2, Chk1, MYBL2, HIF1A, cMET, EGFR, TS, and STK15, o sus productos de expresión, en donde la expresión de dichos genes o sus productos de expresión por encima de un umbral de expresión definido indica una probabilidad reducida de supervivencia a largo plazo sin recurrencia del cáncer de mama.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual dicho RNA se aísla de un espécimen de tejido de cáncer de mama fijado e incrustado en cera de dicho paciente.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual dicho RNA se aísla de tejido de biopsia de núcleo de células de aspirado con aguja fina.

8. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente el paso de crear un informe que resume los datos obtenidos por dicho método.

9. Uso de una red que comprende polinucleótidos que se hibridan a los genes siguientes:

(a) CD68, GRB7, CTSL, Chk1, Her2, STK15, AIB1, SURV, EGFR, MYBL2, y HIF1α; o

(b) CD68, GRB7, TOP2A, Bcl2, DIABLO, CD3, ID1, PPM1D, MCM6, y WISP1; o

(c) CD68, BBC3, GRB7, PRAME, TOP2A, CCNB1, EPHX1, CTSL, GSTM1, y APC; o

(d) CD68, CD9, GRB7, TOP2A, Bcl2, CCNB1, CD3, DIABLO, ID1, y PPM1D; o

(e) CD68, CTSL, FBX05, SURV, CCNB1, MCM2, Chk1, MYBL2, HIF1A, cMET, EGFR, TS, y STK15

para predecir la probabilidad de supervivencia a largo plazo de un paciente de cáncer de mama sin recurrencia del cáncer de mama.

10. El uso de la reivindicación 9, en el cual dichos polinucleótidos son cDNAs.

11. El uso de la reivindicación 10 en donde dichos cDNAs tienen una longitud de aproximadamente 500 a 5000 bases.

12. El uso de la reivindicación 11, en el cual dichos polinucleótidos son oligonucleótidos.

13. El uso de la reivindicación 12, en el cual dichos oligonucleótidos tienen una longitud de aproximadamente 20 a 80 bases.

14. El uso de la reivindicación 13, que comprende aproximadamente 330.000 oligonucleótidos.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GENOMIC HEALTH, INC.
RUSH UNIVERSITY MEDICAL CENTER
COBLEIGH, Melody
SHAK, Steven
BAKER, Joffre
CRONIN, Maureen

<120> MARCADORES DE EXPRESIÓN GÉNICA PARA PROGNOSIS DEL CÁNCER DE MAMA

<130> 39740-0008 PCT

<140> No asignado
<141> 2004-01-14

<150> US 60/440,861
<151> 2003-01-15

<160> 440

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 81
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 1
gcggcgagtt tccgatttaa agctgagctg cgaggaaaat ggcggcggga ggatcaaaat 60
acttgctgga tggtggactc a 81

<210> 2
<211> 71
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 2
cgcttctatg gcgctgagat tgtgtcagcc ctggactacc tgcactcgga gaagaacgtg 60
gtgtaccggg a 71

<210> 3
<211> 71
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 3

tcctgccacc cttcaaacct caggtcacgt ccgaggtcga cacaaggtac ttcgatgatg 60
aatttaccgc c 71

<210> 4
<211> 69
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 4

ggacagcagg aatgtgtttc tccatacagg tcacggggag ccaatggttc agaaacaaat 60
cgagtgggt 69

<210> 5
<211> 82
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 5

tgtgagtgaa atgccttcta gtagtgaacc gtcctcggga gccgactatg actactcaga 60
agagtatgat aacgaaccac aa 82

<210> 6
<211> 66
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 6

cagcagatgt ggatcagcaa gcaggagtat gacgagtccg gcccctccat cgtccaccgc 60
aaatgc 66

<210> 7
<211> 80
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 7

ggctcttgtg cgtactgtcc ttcgggctgg tgacagggaa gacatcactg agcctgccat 60
ctgtgctctt cgtcatctga 80

<210> 8
<211> 73
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 8

gggtcaggtg cctcgagatc gggcttgggc ccagagcatg ttccagatcc cagagtttga 60
gccgagtgag cag 73

<210> 9
<211> 81
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 9

cgttgtcagc acttggaata caagatggtt gccgggtcat gttaattggg aaaaagaaca 60
gtccacagga agaggttgaa c 81

<210> 10
<211> 83
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 10

cctggagggt cctgtacaat ctcatcatgg gactcctgcc cttacccagg ggccacagag 60
cccccgagat ggagcccaat tag 83

<210> 11
<211> 73
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 11

cagatggacc tagtacccac tgagatttcc acgccgaagg acagcgatgg gaaaaatgcc 60
cttaaatcat agg 73

<210> 12
<211> 72
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 12

atcctagccc tggtttttgg cctccttttt gctgtcacca gcgtcgcgtt ccttgtgcag 60
atgagaaggc ag 72

<210> 13
<211> 84
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 13
ttcaggttgt tgcaggagac catgtacatg actgtctcca ttattgatcg gttcatgcag 60
aataattgtg tgcccaagaa gatg 84

<210> 14
<211> 69
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 14
gcatgttcgt ggcctctaag atgaaggaga ccatcccccct gacggccgag aagctgtgca 60
tctacaccg 69

<210> 15
<211> 71
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 15
aaagaagatg atgaccgggt ttacccaaac tcaacgtgca agcctcggat tattgcacca 60
tccagaggct c 71

<210> 16
<211> 82
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 16
atgctgtggc tccttcctaa ctggggcttt cttgacatgt aggttgcttg gtaataacct 60
ttttgtatat cacaatttgg gt 82

<210> 17
<211> 65
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 17

agatgaagtg gaaggcgctt ttcaccgcgg ccatcctgca ggcacagttg ccgattacag 60
aggca 65

<210> 18

<211> 74

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 18

tggttcccag ccctgtgtcc acctccaagc ccagattcag attcgagtca tgtacacaac 60
ccagggtgga ggag 74

<210> 19

<211> 64

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 19

gggcgtggaa cagtttatct cagacatctg ccccaagaag gacgtactcg aaaccttcac 60
cgtg 64

<210> 20

<211> 81

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 20

tgagtgtccc ccggtatctt ccccgccctg ccaatcccga tgaaattgga aattttattg 60
atgaaaatct gaaagcggct g 81

<210> 21

<211> 77

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 21

tgacaatcag cacacctgca ttcaccgctc ggaagagggc ctgagctgca tgaataagga 60
tcacggctgt agtcaca 77

<210> 22

<211> 82

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 22
gataaattgg tacaagggat cagcttttcc cagcccacat gtcctgatca tatgcttttg 60
aatagtcagt tacttggcac cc 82

<210> 23
<211> 72
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 23
tgcctgtggt gggaagctca gtaactggga accaaaggat gatgctatgt cagaacaccg 60
gaggcatttt cc 72

<210> 24
<211> 86
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 24
ggatatttcc gtggctctta ttcaaactct ccatcaaatc ctgtaaactc cagagcaaat 60
caagattttt ctgccttgat gagaag 86

<210> 25
<211> 86
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 25
gacatttcca gtcctgcagt caatgcctct ctgccccacc ctttgttcag tgtggctggt 60
gccacgacaa atgtgtgcga tcggag 86

<210> 26
<211> 75
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 26
ggcatcctgg cccaaagttt cccaaatcca ggcggctaga ggcccactgc ttcccaacta 60
ccagctgagg gggtc 75

<210> 27
<211> 79
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 27
tctgcagagt tggaagcact ctatggtgac atcgatgctg tggagctgta tcctgccctt 60
ctggtagaaa agcctcggc 79

<210> 28
<211> 74
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 28
gggaggctta tctcactgag tgagcagaat ctggtagact gctctgggcc tcaaggcaat 60
gaaggctgca atgg 74

<210> 29
<211> 67
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 29
tgtctcactg agcgagcaga atctggtgga ctgttcgcgt cctcaaggca atcagggctg 60
caatggt 67

<210> 30
<211> 77
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 30
cgctgacatc atgaatgttc ctcgaccggc tggaggcgag tttggatatg acaaagacac 60
atcgttgctg aaagaga 77

<210> 31
<211> 73
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 31

cacaatggcg gctctgaaga gttggctgtc gcgcagcgta acttcattct tcaggtacag 60
acagtgtttg tgt 73

<210> 32
<211> 84
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 32

ctctgagaca gtgcttcgat gactttgcag acttggtgcc ctttgactcc tgggagccgc 60
tcatgaggaa gttgggcctc atgg 84

<210> 33
<211> 62
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 33

tgtcgatgga cttccagaac cacctgggca gctgccaaaa gtgtgatcca agctgtccca 60
at 62

<210> 34
<211> 82
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 34

gatctaagat ggcgactgtc gaaccggaaa ccacccctac tcctaatccc ccgactacag 60
aagaggagaa aacggaatct aa 82

<210> 35
<211> 68
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 35

ggcagtgtca ctgagtcctt gaaatcctcc cctgccccgc gggtctctgg attgggacgc 60
acagtgca 68

<210> 36
<211> 75
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 36
gggccctcca gaacaatgat gggctttatg atcctgactg cgatgagagc gggctcttta 60
aggccaagca gtgca 75

<210> 37
<211> 76
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 37
accgtaggct ctgctctgaa tgactctcct gtgggtctgg ctgcctatat tctagagaag 60
ttttccacct ggacca 76

<210> 38
<211> 81
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 38
cggttatgtc atgccagata cacacctcaa aggtactccc tcctcccggg aaggcaccct 60
ttcttcagtg ggtctcagtt c 81

<210> 39
<211> 68
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 39
cgtggtgccc ctctatgacc tgctgctgga gatgctggac gcccaccgcc tacatgcgcc 60
cactagcc 68

<210> 40
<211> 90
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 40
ggctattcct cattttctct acaaagtggc ctcagtgaac atgaagaagg tagcctcctg 60
gaggagaatt tcggtgacag tctacaatcc 90

<210> 41
<211> 68
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 41

cggtagtcaa gtccggatca agggcaagga gacggaattc tacctgtgca tgaaccgcaa 60
aggcaagc 68

<210> 42
<211> 74
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 42

cacgggacat tcaccacatc gactactata aaaagacaac caacggccga ctgcctgtga 60
agtggatggc accc 74

<210> 43
<211> 67
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 43

ccagtggagc gcttccatga cctgcgtcct gatgaagtgg ccgatttgtt tcagacgacc 60
cagagag 67

<210> 44
<211> 75
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 44

ttggtacctg tgggttagca tcaagttctc ccagggtag aattcaatca gagctccagt 60
ttgcatttgg atgtg 75

<210> 45
<211> 68
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 45

tcagcagcaa gggcatcatg gaggaggatg aggcctgcgg gcgccagtac acgctcaaga 60
aaaccacc 68

<210> 46
<211> 74
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 46

attccaccca tggcaaattc catggcaccg tcaaggctga gaacgggaag cttgtcatca 60
atggaaatcc catc 74

<210> 47
<211> 75
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 47

caaaggagct cactgtggtg tctgtgttcc aaccactgaa tctggacccc atctgtgaat 60
aagccattct gactc 75

<210> 48
<211> 67
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 48

ccatctgcat ccatcttgtt tgggctcccc acccttgaga agtgcctcag ataataccct 60
ggtggcc 67

<210> 49
<211> 73
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 49

cgaaaagatg ctgaacagtg acaaatccaa ctgaccagaa gggaggagga agctcactgg 60
tggctgttcc tga 73

<210> 50
<211> 86
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 50
aagctatgag gaaaagaagt acacgatggg ggacgctcct gattatgaca gaagccagtg 60
gctgaatgaa aaattcaagc tgggcc 86

<210> 51
<211> 73
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 51
cccactcagt agccaagtca caatgtttgg aaaacagccc gtttacttga gcaagactga 60
taccacctgc gtg 73

<210> 52
<211> 70
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 52
cggtgtgaga agtgcagcaa gccctgtgcc cgagtgtgct atggtctggg catggagcac 60
ttgcgagagg 70

<210> 53
<211> 82
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 53
tgaacataaa gtctgcaaca tggaaggtat tgcactgcac aggccacatt cacgtatatg 60
ataccaacag taaccaacct ca 82

<210> 54
<211> 73
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 54
tccaggatgt taggaactgt gaagatggaa gggcatgaaa ccagcgactg gaacagctac 60
tacgcagaca cgc 73

<210> 55
<211> 70
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 55

agaaccgcaa ggtgagcaag gtggagattc tccagcacgt catcgactac atcagggacc 60
ttcagttgga 70

<210> 56
<211> 76
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 56

tccggagctg tgatctaagg aggctggaga tgtattgcgc acccctcaag cctgccaagt 60
cagctcgctc tgtccg 76

<210> 57
<211> 83
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 57

gcatggtagc cgaagatttc acagtcaaaa tcggagattt tggtatgacg cgagatatct 60
atgagacaga ctattaccgg aaa 83

<210> 58
<211> 73
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 58

gtggacagca ccatgaacat gttgggcggg ggaggcagtg ctggccggaa gcccctcaag 60
tcgggtatga agg 73

<210> 59
<211> 72
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 59

cctgaacctt ccaaagatgg ctgaaaaaga tggatgcttc caatctggat tcaatgagga 60
gacttgcctg gt 72

<210> 60

<211> 74

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 60

ccacagctca ccttctgtca ggtgtccatc ccagctccag ccagctccca gagaggaaga 60
gactggcact gagg 74

<210> 61

<211> 80

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 61

cggactttgg gtgcgacttg acgagcggtg gttcgacaag tggccttgcg ggccggatcg 60
tcccagtgga agagttgtaa 80

<210> 62

<211> 78

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 62

gcccagaggc tccatcgtcc atcctcttcc tccccagtcg gctgaactct ccccttgtct 60
gcactgttca aacctctg 78

<210> 63

<211> 83

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón

<400> 63

ggcctgctga gatcaaagac tacagtccct acttcaagac cattgaggac ctgaggaaca 60
agattctcac agccacagtg gac 83

<210> 64

<211> 73

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 64
cgaggattgg ttcttcagca agacagagga actgaaccgc gaggtggcca ccaacagtga 60
gctggtgcag agt 73

<210> 65
<211> 68
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 65
agagatcgag gctctcaagg aggagctgct cttcatgaag aagaaccacg aagaggaagt 60
aaaaggcc 68

<210> 66
<211> 77
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 66
tgagcggcag aatcaggagt accagcggct catggacatc aagtcgcggc tggagcagga 60
gattgccacc taccgca 77

<210> 67
<211> 69
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 67
tcagtggaga aggagttgga ccagtcaaca tctctgttgt cacaagcagt gtttcctctg 60
gatatggca 69

<210> 68
<211> 86
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 68
ggatgaagct tacatgaaca aggtagagct ggagtctcgc ctggaagggc tgaccgacga 60
gatcaacttc ctcaggcagc tatatg 86

<210> 69
<211> 83
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 69
ggaaagacca cctgaaaaac cacctccaga cccacgaccc caacaaaatg gcctttgggt 60
gtgaggagtg tgggaagaag tac 83

<210> 70
<211> 77
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 70
cagatggcca ctttgagaac attttagctg acaacagtgt gaacgaccag accaaaatcc 60
ttgtggttaa tgctgcc 77

<210> 71
<211> 75
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 71
gacttttgcc cgctaccttt cattccggcg tgacaacaat gagctgttgc tcttcatact 60
gaagcagtta gtggc 75

<210> 72
<211> 75
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 72
ggagaacaat ccccttgaga cagaatatgg cctttctgtc tacaaggatc accagaccat 60
caccatccag gagat 75

<210> 73
<211> 82
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 73

tgatggtcct atgtgtcaca ttcatcacag gtttcatacc aacacaggct tcagcacttc 60
ctttggtgtg tttcctgtcc ca 82

<210> 74
<211> 68
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 74

ctacagggac gccatcgaat ccggatcttg atgctggtgt aagtgaacat tcaggtgatt 60
ggttggat 68

<210> 75
<211> 67
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 75

gagaaccaat ctcaccgaca ggcagctggc agaggaatac ctgtaccgct atggttacac 60
tcgggtg 67

<210> 76
<211> 77
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 76

ccgccctcac ctgaagagaa acgcgctcct tggcggacac tgggggagga gaggaagaag 60
cgcggctaac ttattcc 77

<210> 77
<211> 74
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 77

gccgagatcg ccaagatgtt gccagggagg acagacaatg ctgtgaagaa tcactggaac 60
tctaccatca aaag 74

<210> 78
<211> 72
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 78
ccctcgtgct gatgctactg aggagccagc gtctagggca gcagccgctt cctagaagac 60
caggtcatga tg 72

<210> 79
<211> 66
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 79
cggtggacca cgaagagtta acccgggact tggagaagca ctgcagagac atggaagagg 60
cgagcc 66

<210> 80
<211> 68
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 80
ctttgaaccc ttgcttgcaa taggtgtgcg tcagaagcac ccaggacttc catttgcttt 60
gtcccggg 68

<210> 81
<211> 81
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 81
ccgcaacgtg gttttctcac cctatggggt ggcctcggtg ttggccatgc tccagctgac 60
aacaggagga gaaacccagc a 81

<210> 82
<211> 66
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 82
ccagctctcc ttccagctac agatcaatgt ccctgtccga gtgctggagc taagtgagag 60
ccaccc 66

<210> 83
<211> 83
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 83

ataccaatca ccgcacaaac ccaggctatt tgttaagtcc agtcacagcg caaagaaaca 60
tatgcggaga aaatgctagt gtg 83

<210> 84
<211> 62
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 84

gccatccgca aaggctttct cgcttgtcac cttgccatgt ggaagaaact ggcggaatgg 60
cc 62

<210> 85
<211> 85
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 85

gcatcaggct gtcattatgg tgtccttacc tgtgggagct gtaaggtctt ctttaagagg 60
gcaatggaag ggcagcacaa ctact 85

<210> 86
<211> 66
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 86

tctccatatc tgccttgcag agtctcctgc agcacctcat cgggctgagc aatctgaccc 60
acgtgc 66

<210> 87
<211> 86
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 87

gccctcccag tgtgcaaata agggctgctg tttcgacgac accgttcgtg gggtcccctg 60
gtgcttctat cctaatacca tcgacg 86

<210> 88
<211> 78
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 88

gaacttcttg agcaggagca tacccagggc ttcataatca ccttctgttc agcactagat 60
gatattcttg ggggtgga 78

<210> 89
<211> 77
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 89

cgaagccctt acaagtttcc tagttcaccc ttacggattc ctggagggaa catctatatt 60
tcacccctga agagtcc 77

<210> 90
<211> 74
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 90

ccagacgagc gattagaagc ggcagcttgt gaggtgaatg atttggggga agaggaggag 60
gaggaagagg agga 74

<210> 91
<211> 69
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 91

catcttccag gaggaccact ctctgtggca ccctggacta cctgcccccc gaaatgattg 60
aaggtcgga 69

<210> 92
<211> 90
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 92

cctggaggct gcaacatacc tcaatcctgt cccaggccgg atcctcctga agccctttc 60
gcagcactgc tatcctccaa agccattgta 90

<210> 93
<211> 80
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 93

tgttttgatt cccgggctta ccaggtgaga agtgagggag gaagaaggca gtgtcccttt 60
tgctagagct gacagctttg 80

<210> 94
<211> 65
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 94

gcccgaaacg ccgaatataa tcccaagcgg tttgctgcgg taatcatgag gataagagag 60
ccacg 65

<210> 95
<211> 83
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 95

ggtgtgccac agaccttcct acttggcctg taatcacctg tgcagccttt tgtgggcctt 60
caaaactctg tcaagaactc cgt 83

<210> 96
<211> 75
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 96

tccctgcggt cccagatagc ctgaatcctg cccggagtgg aactgaagcc tgcacagtgt 60
ccaccctgtt cccac 75

<210> 97
<211> 72
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 97

aatccaaggg ggagagtgat gacttccata tggactttga ctcagctgtg gctcctcggg 60
caaaatctgt ac 72

<210> 98
<211> 66
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 98

tgtggacatc ttcccctcag acttccctac tgagccacct tctctgccac gaaccggtcg 60
ggctag 66

<210> 99
<211> 82
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 99

ctatatgcag ccagagatgt gacagccacc gtggacagcc tgccactcat cacagcctcc 60
attctcagta agaaactcgt gg 82

<210> 100
<211> 81
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 100

gggccaaata ttcagaagct tttatatcag aggaccacca tagcggccat ggagaccatc 60
tctgtcccat catacccatc c 81

<210> 101
<211> 73
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 101

cttcacagtg ctcctgcagt ctctctgtgt ggctgtaact tacgtgtact ttaccaacga 60
gctgaagcag atg 73

<210> 102
<211> 65
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 102

gcctcggtgt gcctttcaac atcgccagct acgccctgct cacgtacatg attgcgcaca 60
tcacg 65

<210> 103
<211> 70
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 103

gtggatgtgc cctgaaggac aagccaggcg tctacacgag agtctcacac ttcttaccct 60
ggatccgcag 70

<210> 104
<211> 67
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 104

gccctggatt tcagaaagag ccaagtctgg atctgggacc ctttccttcc ttccctggct 60
tgtaact 67

<210> 105
<211> 71
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 105

ctgctgtctt gggtgcattg gagccttgcc ttgctgctct acctccacca tgccaagtgg 60
tcccaggctg c 71

<210> 106
<211> 71
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 106
tgacgatggc ctggagtgtg tgcccactgg gcagcaccaa gtccggatgc agatcctcat 60
gatccggtac c 71

<210> 107
<211> 75
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 107
agaggcatcc atgaacttca cacttgcggg ctgcatcagc acacgctcct atcaacccaa 60
gtactgtgga gtttg 75

<210> 108
<211> 77
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 108
gcagttggaa gacacaggaa agtatcccca aattgcagat ttatcaacgg cttttatctt 60
gaaaatagtg ccacgca 77

<210> 109
<211> 76
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 109
agactgtgga gtttgatgtt gttgaaggag aaaagggtgc ggaggcagca aatgttacag 60
gtcctggtgg tgttcc 76

<210> 110
<211> 70
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Amplicón

<400> 110
acccagtagc aaggagaagc ccactcactg ctccgagtgc ggcaaagctt tcagaaccta 60
ccaccagctg 70

<210> 111
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 111
gcggcgagtt tccgattta 19

<210> 112
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 112
tgagtccacc atccagcaag t 21

<210> 113
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 113
atggcggcgg gaggatcaaa a 21

<210> 114
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 114
cgcttctatg gcgctgagat 20

<210> 115
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 115
tcccggtaca ccacgttctt 20

<210> 116
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sonda

<400> 116
cagccctgga ctacctgcac tcgg 24

<210> 117
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 117
tcctgccacc cttcaaacc 19

<210> 118
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 118
ggcggtaaat tcatcatcga a 21

<210> 119
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 119
caggtcacgt ccgaggtcga caca 24

<210> 120
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 120
ggacagcagg aatgtgtttc 20

<210> 121
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 121
acccactcga tttgtttctg 20

<210> 122
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 122
cattggctcc ccgtgacctg ta 22

<210> 123
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 123
tgtgagtgaa atgccttcta gtagtga 27

<210> 124
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 124
ccgtcctcgg gagccgacta tga 23

<210> 125
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 125
ttgtggttcg ttatcatact cttctga 27

<210> 126
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 126
cagcagatgt ggatcagcaa g 21

<210> 127
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 127
gcatttgcgg tggacgat 18

<210> 128
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 128
aggagtatga cgagtccggc ccc 23

<210> 129
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 129
ggctcttgtg cgtactgtcc tt 22

<210> 130
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 130
tcagatgacg aagagcacag atg 23

<210> 131
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 131
aggctcagtg atgtcttccc tgtcaccag 29

<210> 132
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 132
gggtcaggtg cctcgagat 19

<210> 133
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 133
ctgctcactc ggctcaaact c 21

<210> 134
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 134
tgggcccaga gcatgttcca gatc 24

<210> 135
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 135
cgttgtcagc acttggaata caa 23

<210> 136
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 136
gttcaacctc ttcctgtgga ctgt 24

<210> 137
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 137
cccaattaac atgacccggc aaccat 26

<210> 138
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 138
cctggagggt cctgtacaat 20

<210> 139
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 139
ctaattgggc tccatctcg 19

<210> 140
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 140
catcatggga ctcctgccct tacc 24

<210> 141
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 141
cagatggacc tagtacccac tgaga 25

<210> 142
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 142
ttccacgccg aaggacagcg at 22

<210> 143
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 143
cctatgattt aagggcattt ttcc 24

<210> 144
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 144
atcctagccc tggtttttgg 20

<210> 145
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 145
ctgccttctc atctgcacaa 20

<210> 146
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 146
tttgctgtca ccagcgtcgc 20

<210> 147
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 147
ttcaggttgt tgcaggagac 20

<210> 148
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 148
catcttcttg ggcacacaat 20

<210> 149
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 149
tgtctccatt attgatcggt tcatgca 27

<210> 150
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 150
gcatgttcgt ggcctctaag a 21

<210> 151
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 151
cggtgtagat gcacagcttc tc 22

<210> 152
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 152
aaggagacca tccccctgac ggc 23

<210> 153
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 153
aaagaagatg atgaccgggt ttac 24

<210> 154
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 154
gagcctctgg atggtgcaat 20

<210> 155
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 155
caaactcaac gtgcaagcct cgga 24

<210> 156
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 156
atgctgtggc tccttcctaa ct 22

<210> 157
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 157
acccaaattg tgatatacaa aaaggtt 27

<210> 158
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 158
taccaagcaa cctacatgtc aagaaagccc 30

<210> 159
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 159
agatgaagtg gaaggcgctt 20

<210> 160
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 160
caccgcggcc atcctgca 18

<210> 161
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 161
tgcctctgta atcggcaact g 21

<210> 162
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 162
tggttcccag ccctgtgt 18

<210> 163
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 163
ctccaagccc agattcagat tcgagtca 28

<210> 164
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 164
ctcctccacc ctgggttgt 19

<210> 165
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 165
gggcgtggaa cagtttatct 20

<210> 166
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 166
cacggtgaag gtttcgagt 19

<210> 167
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 167
agacatctgc cccaagaagg acgt 24

<210> 168
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 168
tgagtgtccc ccggtatctt c 21

<210> 169
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 169
cagccgcttt cagattttca t 21

<210> 170
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 170
tgccaatccc gatgaaattg gaaattt 27

<210> 171
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 171
tgacaatcag cacacctgca t 21

<210> 172
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 172
tgtgactaca gccgtgatcc tta 23

<210> 173
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 173
caggccctct tccgagcggt 20

<210> 174
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 174
gataaattgg tacaagggat cagctt 26

<210> 175
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 175
gggtgccaag taactgacta ttca 24

<210> 176
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 176
ccagcccaca tgtcctgatc atatgc 26

<210> 177
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 177
tgcctgtggt gggaagct 18

<210> 178
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 178
ggaaaatgcc tccggtgtt 19

<210> 179
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sonda

<400> 179
tgacatagca tcatcctttg gttcccagtt 30

<210> 180
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 180
ggatatttcc gtggctctta ttca 24

<210> 181
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 181
tctccatcaa atcctgtaaa ctccagagca 30

<210> 182
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 182
cttctcatca aggcagaaaa atctt 25

<210> 183
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 183
gacatttcca gtcctgcagt ca 22

<210> 184
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 184
tgcctctctg ccccaccctt tgt 23

<210> 185
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 185
ctccgatcgc acacatttgt 20

<210> 186
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 186
ggcatcctgg cccaaagt 18

<210> 187
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 187
gacccctca gctggtagtt g 21

<210> 188
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 188
cccaaatcca ggcggctaga ggc 23

<210> 189
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 189
tctgcagagt tggaagcact cta 23

<210> 190
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 190
caggatacag ctccacagca tcgatgtc 28

<210> 191
<211> 21
<212> DMA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 191
gccgaggctt ttctaccaga a 21

<210> 192
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 192
gggaggctta tctcactgag tga 23

<210> 193
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 193
ccattgcagc cttcattgc 19

<210> 194
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 194
ttgaggccca gagcagtcta ccagattct 29

<210> 195
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 195
tgtctcactg agcgagcaga a 21

<210> 196
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 196
accattgcag ccctgattg 19

<210> 197
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 197
cttgaggacg cgaacagtcc acca 24

<210> 198
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 198
cgctgacatc atgaatgttc ct 22

<210> 199
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 199
tctctttcag caacgatgtg tctt 24

<210> 200
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 200
tcatatccaa actcgcctcc agccg 25

<210> 201
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 201
cacaatggcg gctctgaag 19

<210> 202
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 202
acacaaacac tgtctgtacc tgaaga 26

<210> 203
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 203
aagttacgct gcgcgacagc caa 23

<210> 204
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 204
ctctgagaca gtgcttcgat gact 24

<210> 205
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 205
ccatgaggcc caacttcct 19

<210> 206
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 206
cagacttggt gccctttgac tcc 23

<210> 207
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 207
tgtcgatgga cttccagaac 20

<210> 208
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 208
cacctgggca gctgccaa 18

<210> 209
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 209
attgggacag cttggatca 19

<210> 210
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 210
gatctaagat ggcgactgtc gaa 23

<210> 211
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 211
ttagattccg ttttctcctc ttctg 25

<210> 212
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 212
accaccccta ctcctaatcc cccgact 27

<210> 213
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 213
ggcagtgtca ctgagtcctt ga 22

<210> 214
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 214
tgcactgtgc gtcccaat 18

<210> 215
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 215
atcctcccct gccccgcg 18

<210> 216
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 216
gggccctcca gaacaatgat 20

<210> 217
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 217
tgcactgctt ggccttaaag a 21

<210> 218
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 218
ccgctctcat cgcagtcagg atcat 25

<210> 219
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 219
accgtaggct ctgctctgaa 20

<210> 220
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 220
tggtccaggt ggaaaacttc 20

<210> 221
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 221
aggcagccag acccacagga 20

<210> 222
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 222
cggttatgtc atgccagata cac 23

<210> 223
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sonda

<400> 223
cctcaaaggt actccctcct cccgg 25

<210> 224
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 224
gaactgagac ccactgaaga aagg 24

<210> 225
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 225
cgtggtgccc ctctatgac 19

<210> 226
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 226
ctggagatgc tggacgccc 19

<210> 227
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 227
ggctagtggg cgcatgtag 19

<210> 228
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 228
ggattgtaga ctgtcaccga aattc 25

<210> 229
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 229
ggctattcct cattttctct acaaagtg 28

<210> 230
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 230
cctccaggag gctaccttct tcatgttcac 30

<210> 231
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 231
cggtagtcaa gtccggatca a 21

<210> 232
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 232
gcttgccttt gcggttca 18

<210> 233
<211> 2S
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 233
caaggagacg gaattctacc tgtgc 25

<210> 234
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 234
cacgggacat tcaccacatc 20

<210> 235
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 235
gggtgccatc cacttcaca 19

<210> 236
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 236
ataaaaagac aaccaacggc cgactgc 27

<210> 237
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 237
ccagtggagc gcttccat 18

<210> 238
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 238
ctctctgggt cgtctgaaac aa 22

<210> 239
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 239
tcggccactt catcaggacg cag 23

<210> 240
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 240
ttggtacctg tgggttagca 20

<210> 241
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 241
cacatccaaa tgcaaactgg 20

<210> 242
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 242
tccccagggt agaattcaat cagagc 26

<210> 243
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 243
tcagcagcaa gggcatcat 19

<210> 244
<211> 23
<212> DMA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 244
ggtggttttc ttgagcgtgt act 23

<210> 245
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sonda

<400> 245
cgcccgcagg cctcatcct 19

<210> 246
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 246
attccaccca tggcaaattc 20

<210> 247
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 247
gatgggattt ccattgatga ca 22

<210> 248
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sonda

<400> 248
ccgttctcag ccttgacggt gc 22

<210> 249
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 249
caaaggagct cactgtggtg tct 23

<210> 250
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sonda

<400> 250
tgttccaacc actgaatctg gacc 24

<210> 251
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 251
gagtcagaat ggcttattca cagatg 26

<210> 252
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 252
ccatctgcat ccatcttgtt 20

<210> 253
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sonda

<400> 253
ctccccaccc ttgagaagtg cct 23

<210> 254
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 254
ggccaccagg gtattatctg 20

<210> 255
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 255
cgaaaagatg ctgaacagtg aca 23

<210> 256
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 256
tcaggaacag ccaccagtga 20

<210> 257
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<200>
<223> sonda

<400> 257
cttcctcctc ccttctggtc agttggat 28

<210> 258
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 258
ggcccagctt gaatttttca 20

<210> 259
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 259
aagctatgag gaaaagaagt acacgat 27

<210> 260
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sonda

<400> 260
tcagccactg gcttctgtca taatcaggag 30

<210> 261
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 261
cccactcagt agccaagtca 20

<210> 262
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sonda

<400> 262
tcaagtaaac gggctgtttt ccaaaca 27

<210> 263
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 263
cacgcaggtg gtatcagtct 20

<210> 264
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 264
cggtgtgaga agtgcagcaa 20

<210> 265
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sonda

<400> 265
ccagaccata gcacactcgg gcac 24

<210> 266
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 266
cctctcgcaa gtgctccat 19

<210> 267
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 267
tgaacataaa gtctgcaaca tgga 24

<210> 268
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 268
tgaggttggt tactgttggt atcatata 28

<210> 269
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 269
ttgcactgca caggccacat tcac 24

<210> 270
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 270
tccaggatgt taggaactgt gaag 24

<210> 271
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 271
gcgtgtctgc gtagtagctg tt 22

<210> 272
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 272
agtcgctggt ttcatgccct tcca 24

<210> 273
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 273
agaaccgcaa ggtgagcaa 19

<210> 274
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 274
tccaactgaa ggtccctgat g 21

<210> 275
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 275
tggagattct ccagcacgtc atcgac 26

<210> 276
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 276
tccggagctg tgatctaagg a 21

<210> 277
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sonda

<400> 277
tgtattgcgc acccctcaag cctg 24

<210> 278
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 278
cggacagagc gagctgactt 20

<210> 279
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 279
gcatggtagc cgaagatttc a 21

<210> 280
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 280
tttccggtaa tagtctgtct catagatatc 30

<210> 281
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 281
cgcgtcatac caaaatctcc gattttga 28

<210> 282
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 282
gtggacagca ccatgaaca 19

<210> 283
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 283
ccttcatacc cgacttgagg 20

<210> 284
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 284
cttccggcca gcactgcctc 20

<210> 285
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 285
cctgaacctt ccaaagatgg 20

<210> 286
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 286
accaggcaag tctcctcatt 20

<210> 287
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 287
ccagattgga agcatccatc tttttca 27

<210> 288
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 288
ccacagctca ccttctgtca 20

<210> 289
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 289
cctcagtgcc agtctcttcc 20

<210> 290
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 290
tccatcccag ctccagccag 20

<210> 291
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sonda

<400> 291
ccacttgtcg aaccaccgct cgt 23

<210> 292
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 292
cggactttgg gtgcgactt 19

<210> 293
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 293
ttacaactct tccactggga cgat 24

<210> 294
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 294
gcccagaggc tccatcgt 18

<210> 295
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 295
cagaggtttg aacagtgcag aca 23

<210> 296
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 296
cctcttcctc cccagtcggc tga 23

<210> 297
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 297
ggcctgctga gatcaaagac 20

<210> 298
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 298
gtccactgtg gctgtgagaa 20

<210> 299
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 299
tgttcctcag gtcctcaatg gtcttg 26

<210> 300
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 300
cgaggattgg ttcttcagca a 21

<210> 301
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 301
actctgcacc agctcactgt tg 22

<210> 302
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 302
cacctcgcgg ttcagttcct ctgt 24

<210> 303
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 303
agagatcgag gctctcaagg 20

<210> 304
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 304
ggcctttttac ttcctcttcg 20

<210> 305
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 305
tggttcttct tcatgaagag cagctcc 27

<210> 306
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 306
tgagcggcag aatcaggagt a 21

<210> 307
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 307
tgcggtaggt ggcaatctc 19

<210> 308
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 308
ctcatggaca tcaagtcgcg gctg 24

<210> 309
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 309
tcagtggaga aggagttgga 20

<210> 310
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 310
ccagtcaaca tctctgttgt cacaagca 28

<210> 311
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 311
tgccatatcc agaggaaaca 20

<210> 312
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 312
ggatgaagct tacatgaaca aggtaga 27

<210> 313
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 313
catatagctg cctgaggaag ttgat 25

<210> 314
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 314
cgtcggtcag cccttccagg c 21

<210> 315
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 315
ggaaagacca cctgaaaaac ca 22

<210> 316
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 316
gtacttcttc ccacactcct caca 24

<210> 317
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 317
acccacgacc ccaacaaaat ggc 23

<210> 318
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 318
cagatggcca ctttgagaac att 23

<210> 319
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 319
ggcagcatta accacaagga tt 22

<210> 320
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 320
agctgacaac agtgtgaacg accagacc 28

<210> 321
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 321
gacttttgcc cgctaccttt c 21

<210> 322
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 322
gccactaact gcttcagtat gaagag 26

<210> 323
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 323
acagctcatt gttgtcacgc cgga 24

<210> 324
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 324
ggagaacaat ccccttgaga 20

<210> 325
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 325
atctcctgga tggtgatggt 20

<210> 326
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 326
tggcctttct gtctacaagg atcacca 27

<210> 327
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 327
tgatggtcct atgtgtcaca ttca 24

<210> 328
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 328
tgggacagga aacacaccaa 20

<210> 329
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 329
caggtttcat accaacacag gcttcag 30

<210> 330
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 330
ctacagggac gccatcgaa 19

<210> 331
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 331
atccaaccaa tcacctgaat gtt 23

<210> 332
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 332
cttacaccag catcaagatc cgg 23

<210> 333
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 333
gagaaccaat ctcaccgaca 20

<210> 334
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 334
cacccgagtg taaccatagc 20

<210> 335
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 335
acaggtattc ctctgccagc tgcc 24

<210> 336
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 336
ccgccctcac ctgaagaga 19

<210> 337
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 337
ggaataagtt agccgcgctt ct 22

<210> 338
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 338
cccagtgtcc gccaaggagc g 21

<210> 339
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 339
gccgagatcg ccaagatg 18

<210> 340
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 340
cttttgatgg tagagttcca gtgattc 27

<210> 341
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 341
cagcattgtc tgtcctccct ggca 24

<210> 342
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 342
ccctcgtgct gatgctact 19

<210> 343
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 343
catcatgacc tggtcttcta gg 22

<210> 344
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 344
ctgccctaga cgctggctcc tc 22

<210> 345
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 345
cggtggacca cgaagagtta a 21

<210> 346
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 346
ccgggacttg gagaagcact gca 23

<210> 347
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 347
ggctcgcctc ttccatgtc 19

<210> 348
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 348
ctttgaaccc ttgcttgcaa 20

<210> 349
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 349
aagtcctggg tgcttctgac gcaca 25

<210> 350
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 350
cccgggacaa agcaaatg 18

<210> 351
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 351
ccgcaacgtg gttttctca 19

<210> 352
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 352
ctcggtgttg gccatgctcc ag 22

<210> 353
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 353
tgctgggttt ctcctcctgt t 21

<210> 354
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 354
ccagctctcc ttccagctac 20

<210> 355
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 355
gggtggctct cacttagctc 20

<210> 356
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 356
atcaatgtcc ctgtccgagt gctg 24

<210> 357
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 357
cacactagca ttttctccgc ata 23

<210> 358
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 358
ataccaatca ccgcacaaac c 21

<210> 359
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 359
tgcgctgtga ctggacttaa caaatagcct 30

<210> 360
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 360
gccatccgca aaggcttt 18

<210> 361
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 361
ggccattccg ccagtttc 18

<210> 362
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 362
tcgcttgtca ccttgccatg tgg 23

<210> 363
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 363
gcatcaggct gtcattatgg 20

<210> 364
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 364
agtagttgtg ctgcccttcc 20

<210> 365
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 365
tgtccttacc tgtgggagct gtaaggtc 28

<210> 366
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 366
tctccatatc tgccttgcag agt 23

<210> 367
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 367
gcacgtgggt cagattgct 19

<210> 368
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 368
tcctgcagca cctcatcggg ct 22

<210> 369
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 369
gccctcccag tgtgcaaat 19

<210> 370
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 370
tgctgtttcg acgacaccgt tcg 23

<210> 371
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 371
cgtcgatggt attaggatag aagca 25

<210> 372
<211> 24
<212> DNA
<213> Iniciador directo

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 372
gaacttcttg agcaggagca tacc 24

<210> 373
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 373
tccacccca agaatatcat ctagt 25

<210> 374
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 374
agggcttcat aatcaccttc tgttc 25

<210> 375
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 375
cgaagccctt acaagtttcc 20

<210> 376
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 376
ggactcttca ggggtgaaat 20

<210> 377
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 377
cccttacgga ttcctggagg gaac 24

<210> 378
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 378
ccagacgagc gattagaagc 20

<210> 379
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 379
tcctcctctt cctcctcctc 20

<210> 380
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 380
tgtgaggtga atgatttggg gga 23

<210> 381
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 381
catcttccag gaggaccact 20

<210> 382
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 382
tccgaccttc aatcatttca 20

<210> 383
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 383
ctctgtggca ccctggacta cctg 24

<210> 384
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 384
cctggaggct gcaacatacc 20

<210> 385
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 385
tacaatggct ttggaggata gca 23

<210> 386
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 386
atcctcctga agccctttc gcagc 25

<210> 387
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 387
tgttttgatt cccgggctta 20

<210> 388
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 388
tgccttcttc ctccctcact tctcacct 28

<210> 389
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 389
caaagctgtc agctctagca aaag 24

<210> 390
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 390
gcccgaaacg ccgaatata 19

<210> 391
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 391
taccgcagca aaccgcttgg g 21

<210> 392
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 392
cgtggctctc ttatcctcat gat 23

<210> 393
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 393
ggtgtgccac agaccttcct 20

<210> 394
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 394
acggagttct tgacagagtt ttga 24

<210> 395
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 395
ttggcctgta atcacctgtg cagcctt 27

<210> 396
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 396
tccctgcggt cccagatag 19

<210> 397
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 397
gtgggaacag ggtggacact 20

<210> 398
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 398
atcctgcccg gagtggaact gaagc 25

<210> 399
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 399
aatccaaggg ggagagtgat 20

<210> 400
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 400
catatggact ttgactcagc tgtggc 26

<210> 401
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 401
gtacagattt tgcccgagga 20

<210> 402
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 402
tgtggacatc ttcccctcag a 21

<210> 403
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 403
ttccctactg agccaccttc tctg 24

<210> 404
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 404
ctagcccgac cggttcgt 18

<210> 405
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 405
ctatatgcag ccagagatgt gaca 24

<210> 406
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 406
acagcctgcc actcatcaca gcc 23

<210> 407
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 407
ccacgagttt cttactgaga atgg 24

<210> 408
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 408
gggccaaata ttcagaagc 19

<210> 409
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 409
ggatgggtat gatgggacag 20

<210> 410
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 410
ccaccatagc ggccatggag 20

<210> 411
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 411
cttcacagtg ctcctgcagt ct 22

<210> 412
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 412
catctgcttc agctcgttgg t 21

<210> 413
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 413
aagtacacgt aagttacagc cacaca 26

<210> 414
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 414
gcctcggtgt gcctttca 18

<210> 415
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 415
catcgccagc tacgccctgc tc 22

<210> 416
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 416
cgtgatgtgc gcaatcatg 19

<210> 417
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 417
gtggatgtgc cctgaagga 19

<210> 418
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 418
ctgcggatcc agggtaagaa 20

<210> 419
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 419
aagccaggcg tctacacgag agtctcac 28

<210> 420
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 420
gccctggatt tcagaaagag 20

<210> 421
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 421
agttacaagc cagggaagga 20

<210> 422
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 422
caagtctgga tctgggaccc tttcc 25

<210> 423
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 423
ctgctgtctt gggtgcattg 20

<210> 424
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 424
gcagcctggg accacttg 18

<210> 425
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 425
ttgccttgct gctctacctc cacca 25

<210> 426
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 426
tgacgatggc ctggagtgt 19

<210> 427
<211> 22
<212> DNA
<213> Iniciador inverso

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 427
ggtaccggat catgaggatc tg 22

<210> 428
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 428
ctgggcagca ccaagtccgg a 21

<210> 429
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 429
agaggcatcc atgaacttca ca 22

<210> 430
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 430
caaactccac agtacttggg ttga 24

<210> 431
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 431
cgggctgcat cagcacacgc 20

<210> 432
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 432
gcagttggaa gacacaggaa agt 23

<210> 433
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 433
tccccaaatt gcagatttat caacggc 27

<210> 434
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 434
tgcgtggcac tattttcaag a 21

<210> 435
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 435
agactgtgga gtttgatgtt gttga 25

<210> 436
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 436
ggaacaccac caggacctgt aa 22

<210> 437
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 437
ttgctgcctc cgcacccttt tct 23

<210> 438
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador directo

<400> 438
acccagtagc aaggagaagc 20

<210> 439
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso

<400> 439
cagctggtgg taggttctga 20

<210> 440
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 440

cactcactgc tccgagtgcg g 21