



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 310 275**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04252534 .5**

96 Fecha de presentación : **30.04.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1526187**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.04.2005**

54 Título: **Ensayo intraoperativo de ganglios linfáticos.**

30 Prioridad: **01.05.2003 US 427243**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.01.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.01.2009

73 Titular/es: **Veridex L.L.C.**
1001 U.S. Highway 202
Raritan, New Jersey 08669, US

72 Inventor/es: **Atkins, David;**
Backus, John;
Belly, Robert;
Rosen, Steven y
White, Robert

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 310 275 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo intraoperativo de ganglios linfáticos.

5 **Antecedentes**

Esta invención se refiere al campo del diagnóstico molecular.

10 La implicación de ganglios linfáticos es el factor pronóstico más fuerte en muchos tumores sólidos y la detección de micrometástasis de ganglios linfáticos es de gran interés para los patólogos y cirujanos. La evaluación actual de ganglios linfáticos implica el examen microscópico de cortes de tejido teñidos con H&E y tiene tres limitaciones importantes: (a) se pierden fácilmente células individuales de tumores o focos pequeños de células; (b) el resultado no se consigue rápidamente, lo que significa que cualquier resultado positivo en un procedimiento de ganglio linfático sentinal requiere una segunda cirugía para eliminar ganglios linfáticos axilares y (c) sólo se estudian uno o dos cortes de tejido, por lo que la vasta mayoría de cada ganglio no se examina. La realización de cortes en serie ayuda a obviar la cuestión de errores en el muestreo y la inmunohistoquímica (IHC) puede ayudar a identificar células tumorales individuales. La combinación de estos procedimientos, sin embargo, es demasiado costosa y requiere mucho tiempo para análisis de rutina, estando limitada a casos especiales tales como el examen de ganglios linfáticos sentinales.

20 Con frecuencia, las decisiones quirúrgicas están basadas en el análisis intraoperativo de cortes congelados de nódulos linfáticos; sin embargo, la sensibilidad de estos procedimientos es relativamente mala, oscilando de 50-70% relativamente respecto a la patología estándar de H&E, lo que conduce a una cuantía inaceptablemente alta de cirugías secundarias. La supervivencia de cinco años de pacientes de cáncer de mama en las etapas 0 y I de mama que no tienen implicación de ganglios linfáticos es de 92% y 87%, respectivamente. Por otra parte, la supervivencia de cinco años de pacientes de etapas más tardías con cáncer de mama que tienen implicaciones de ganglios linfáticos disminuye significativamente. Por ejemplo, la supervivencia de cáncer de mama de la etapa II es de sólo 75%, de la etapa III de 46% y de la etapa IV de 13%. Aunque los pacientes de cáncer de mama de ganglios histológicamente negativos ha mejorado su supervivencia, 20-30% de los pacientes de ganglios histológicamente negativos adolecen de enfermedad recurrente. Muy probablemente, esto es debido a limitaciones de las técnicas en curso para la detección de micrometástasis, incluidas cuestiones relacionadas con el muestreo de ganglios y la mala sensibilidad para detectar células individuales de tumores o focos pequeños de tumores.

30 Además de la necesidad de una detección más precisa y sensible de metástasis en ganglios de cáncer de mama, hay una necesidad similar de un ensayo rápido y sensible de ganglios de melanoma así como de una detección más precisa de márgenes quirúrgicos en particular en la actuación intraoperativa.

40 La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es una herramienta poderosa en el campo de la biología molecular que podría ser útil en esta actuación. Esta técnica permite la replicación/amplificación de pequeñas cantidades de fragmentos de ácidos nucleicos en cantidades que se pueden analizar de manera significativa. Además, con el desarrollo de la RT-PCR (Q-RT-PCR) cuantitativa en tiempo real, esta tecnología se ha hecho más fiable así como posible de ser automatizada. La Q-RT-PCR está menos sometida a la contaminación y proporciona la cuantificación de la expresión de genes. Tal cuantificación se podría aplicar para la detección de micrometástasis en ensayos intraoperativos de ganglios linfáticos. La PCR en el diagnóstico intramolecular, a pesar de sus ventajas, tiene varias limitaciones que hacen que sea difícil de aplicar en la práctica diagnóstica clínica típica, en particular, en la práctica intraoperativa.

45 Una de tales limitaciones es el tiempo que se tarda en realizar las diagnósticos por PCR. Las típicas de reacciones de PCR duran horas, no minutos. Es necesario disminuir el tiempo que se tarda en realizar una reacción de PCR si la técnica ha de ser útil intraoperativamente. Además, aunque la Q-RT-PCR puede proporcionar resultados cuantitativos, hasta ahora no se han conocido valores de corte para distinguir resultados positivos de los negativos basados en tal tecnología ni se ha aclarado qué fragmentos de ácidos nucleicos se detectan mejor y se correlacionan con la presencia de micrometástasis. Existen también otros procedimientos para la amplificación y detección de fragmentos de ácidos nucleicos y cada uno adolece de problemas similares.

50 La comunidad médica aceptaría un ensayo de ganglios linfáticos molecular intraoperativo que obviara las dificultades existentes.

Sumario de la invención

60 El procedimiento es un ensayo de ganglios linfáticos intraoperativo para micrometástasis. Un cirujano identifica un ganglio linfático sentinal durante la cirugía de acuerdo con procedimientos conocidos. Se eliminan ganglios sentinales y se preparan como se describe más adelante. Luego se extrae rápidamente ácido nucleico (por ejemplo, ARN) de los ganglios sentinales. Se amplifican y detectan luego marcadores indicativos de micrometástasis. El cirujano actúa luego basándose en el resultado de la detección de tales marcadores.

65 El ensayo se basa muy preferiblemente en un procedimiento rápido de PCR y RT-PCR que permita la ejecución de una reacción de PCR completa en minutos, lo que permite el uso de diagnósticos intraoperativos para detectar micrometástasis en ganglios linfáticos sentinales.

ES 2 310 275 T3

En un aspecto del procedimiento diagnóstico molecular intraoperativo, están incluidas las siguientes etapas realizadas en el transcurso de un procedimiento quirúrgico: obtención de una muestra de tejido de un paciente; extracción de ARN de la muestra; análisis de la muestra por amplificación y detección de ácido nucleico; y determinación de si la presencia de uno o más marcadores de expresión de genes excede un valor de corte. El valor de corte puede ser un valor absoluto o un valor relativo respecto a la expresión de un gen de control.

En otro aspecto del procedimiento, los marcadores de expresión de genes son fragmentos de ácido nucleico específicos para un tejido particular, tal como un tejido de mama.

En otro aspecto más del procedimiento, los marcadores de expresión de genes son fragmentos de ácido nucleico indicativos de malignidad. En otro aspecto más del procedimiento, las muestras de ganglios linfáticos se homogeneizan y diluyen para asegurar que se ha extraído suficiente ARN a pesar del procedimiento de extracción acelerado.

En otro aspecto más del procedimiento, los marcadores son los de mamaglobulina (Sec ID n°. 17) y PIP (Sec. N°. 18), B305D (en particular, isoformo C, Sec. ID. n°. 14), B726 (Sec. ID n°.15), GABA (Sec. ID n°. 16) o OBE (Sec. ID. n°.) en el caso de diagnósticos de cáncer de mama y tirosinasa (Sec. ID n°. 22) y MART 1 (Sec ID n°. 21) en el caso de melanoma.

En otro aspecto más del procedimiento, las micrometástasis se detectan intraoperativamente por un procedimiento que incluye las etapas de obtención de ARN de un ganglio linfático sentinal; realización de un procedimiento cuantitativo de RT-PCR específico para uno o más genes de interés y determinación de si la presencia del marcador excede un corte predeterminado. El valor del corte puede ser un valor absoluto o un valor relativo respecto a la expresión de un gen de control.

Descripción detallada

Se presentan procedimientos intraoperativos para diagnósticos de cáncer. Estos procedimientos emplean un procedimiento rápido de extracción de ácidos nucleicos de un ganglio linfático y un procedimiento de amplificación y detección de fragmentos de ácido nucleico indicativos de metástasis (fragmentos que se denominan aquí “marcadores”).

Un aspecto importante de los procedimientos es la rápida amplificación y detección de los marcadores indicativos de la expresión de ciertos genes. Con tal que tales procedimientos se puedan realizar en un período aceptable para un ensayo intraoperativo (esto es, de no más de aproximadamente 35 minutos), se puede usar cualquier procedimiento fiable, sensible y específico. Esto incluye procedimientos de PCR, procedimientos de amplificación circular rodante (RCA), procedimientos de reacción en cadena de ligasa (LCR), procedimientos de desplazamiento de cadena (SDA), procedimientos de amplificación basados en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) y otros. Los diagnósticos moleculares rápidos implicados muy preferiblemente son procedimientos cuantitativos de PCR, incluida la QRT-PCR.

Independientemente del procedimiento de amplificación empleado, es importante tomar adecuadamente la muestra de tejido usada para realizar el ensayo. Esto incluye el corte y el procesamiento del ganglio linfático así como la extracción del ARN de él. Una vez obtenidos, es importante procesar apropiadamente los ganglios de manera que se detecten cualesquiera células cancerosas presentes.

Para extraer ácidos nucleicos de muestras de tejidos hay disponibles una variedad de técnicas. La práctica estándar en cada caso requiere tiempo y puede ser difícil incluso cuando se usa un kit comercialmente disponible diseñado a este fin. Los típicos kits comerciales disponibles para la extracción de ácido nucleico tardan como mínimo 15 minutos para extraer el ácido nucleico. En los procedimientos de la presente invención, el ácido nucleico se extrae en menos de 8 minutos y, preferiblemente, en menos de 6 minutos. Estos procedimientos rápidos de extracción son el objeto de una solicitud de patente europea; presentada el mismo día que esta solicitud reivindicando prioridad de la solicitud de patente U.S. n°. 10/427217, presentada el 1 de mayo de 2003; teniendo la referencia del abogado PO37591EP; teniendo como inventores a R. Belly, J. Toner y J. Backus, y titulada “Extracción Rápida de ARN de Células y Tejidos”.

El aislamiento satisfactorio del ARN intacto generalmente implica cuatro etapas: desmoronamiento eficaz de células o tejidos, desnaturalización de complejos nucleoproteínicos, inactivación de ribonucleasa endógena (ARNasa) y eliminación de ADN y proteína contaminantes. Las propiedades de desmoronamiento y protectoras del tiocianato de guanidinio (GTC) y el B-mercaptoetanol para inactivar las ribonucleasas presentes en los extractos de células hacen que sean los reactivos preferidos para la primera etapa. Cuando se usan junto con un tensioactivo tal como dodecil-sulfato sódico (SDS), el desmoronamiento de los complejos nucleoproteínicos se consigue dejando que se libere en solución el ARN y se aísle exento de proteína. La dilución de extractos de células en presencia de altas concentraciones de GTC causa una precipitación selectiva de proteínas y ADN celular mientras que el ARN permanece en solución. La centrifugación puede aclarar el lisado de proteínas precipitadas y preferiblemente se realiza en una columna. Tales columnas también cizallan el ADN y reducen la viscosidad de la muestra. Preferiblemente, la purificación del ARN se realiza en una columna de giro que contiene sílice u otro material. El desmoronamiento manual de células y tejidos se puede realizar mediante una trituradora de tejidos desechable como se describe en la patente U.S. n°. 4.715.545. El tiempo de homogeneización es de 1 a 2 minutos y más preferiblemente es de 30-45 segundos. La muestra se puede procesar luego con una columna de desmenuzamiento (por ejemplo, QIAshredder, QIAGEN Inc., Valencia, CA, o un sustitutivo adecuado) o con un dispositivo de procesamiento de ARN tal como el kit de homogeneización de tejidos

ES 2 310 275 T3

por PCR adquirible comercialmente de Omni International (Warrenton, VA) para reducir la viscosidad. El ARN se precipita mediante la columna de giro descrita antes y los tiempos de centrifugación no son mayores que 30 segundos. Cuando se usan kits comerciales de extracción de ARN tales como los asequibles de QIAGEN, Inc., se usa la filtración en vez de la centrifugación para todas las etapas excepto para la etapa de secado de la columna. Típicamente, la muestra se diluye con un volumen igual de etanol al 70% antes de aplicarla a la columna. Después de lavados por filtración, la columna se seca por centrifugación y se eluye el ARN en agua exenta de ARNasa. El ARN se separa selectivamente por precipitación de la solución con etanol y se une a un sustrato (preferiblemente una membrana o filtro que contiene sílice). La unión de ARN al sustrato se produce rápidamente debido a la disociación de las moléculas de agua por las sales caotrópicas, favoreciendo así la absorción de los ácidos nucleicos por la sílice. El ARN total unido se purifica más de las sales contaminantes, proteínas e impurezas celulares por simples etapas de lavado. Finalmente se eluye el ARN total de la membrana añadiendo agua exenta de nucleasa. El tiempo total para este protocolo rápido es menor que 8 minutos y, preferiblemente, menor que 6 minutos.

En resumen: el procedimiento de extracción rápida de ARN implica las etapas siguientes:

- (a) obtención de una muestra que contiene células del sistema biológico,
- (b) opcionalmente, eliminación de la muestra de células sin ARN de interés para producir una muestra de trabajo,
- (c) lisado de las células que contienen ARN que es de interés para producir un homogeneizado de ellas,
- (d) opcionalmente, dilución del homogeneizado,
- (e) puesta en contacto de la muestra de trabajo humedecido con un sustrato que contiene o que tiene fijado a él un material al que se une el ARN,
- (f) reposo para que la muestra se una al sustrato,
- (g) eliminación de contaminantes y sustancias que interfieren,
- (h) secado del sustrato y
- (i) elución de ARN del sustrato.

en los casos en que se usa la centrifugación, puede realizarse ésta después de las etapas g, h o i y, preferiblemente, se aplica vacío/filtración en las etapas de extracción.

Los reactivos implicados en este proceso rápido de extracción son:

- tampón de lisis/unión (preferiblemente hidrocloreuro de guanidinio 4,5M, fosfato sódico 100 mM),
- tampón de lavado I (preferiblemente etanol al 37% en HCl-guanidina 5M, Tris-HCl 20 mM),
- tampón de lavado II (preferiblemente etanol al 80% en NaCl 20 mM; Tris-HCl 2 mM),
- tampón de elución y
- agua dos veces destilada estéril, exenta de nucleasa.

Puesto que la distribución de células cancerosas en los ganglios no es uniforme, es preferible tomar muestras de múltiples cortes. Opcionalmente, también se puede examinar un ganglio o varios ganglios basándose en la patología. Un procedimiento para realizar un ensayo de base molecular y un examen de la misma muestra de ganglio por patología es seccionar el ganglio en al menos cuatro secciones, usándose una sección exterior e interior para patología, y una sección exterior e interior para ensayo molecular. Dado que la distribución de metástasis y micrometástasis en tejidos no es uniforme, se debe obtener una muestra de tamaño suficientemente grande de manera que no se pierdan metástasis. Un enfoque para realizar este muestreo en el presente procedimiento es homogeneizar una muestra grande de tejido y posteriormente realizar una dilución de la muestra homogeneizada, bien mezclada, a usar en posterior ensayo molecular.

Una típica reacción PCR incluye múltiples etapas de amplificación, o ciclos que amplifican selectivamente especies de ácidos nucleicos diana. Una típica reacción PCR incluye 3 etapas: una etapa de desnaturalización en la que se desnaturaliza un ácido nucleico diana; una etapa de anillamiento en la que un conjunto de cebadores (cebadores de avance y retroceso) se anilla a cadenas complementarias de ADN; y una etapa de alargamiento en la que una polimerasa de ADN termoestable alarga los cebadores. Repitiendo esta etapa múltiples veces, se amplifica un fragmento de ADN para producir un amplificación que corresponde a la secuencia de ADN diana. Las reacciones típicas PCR incluyen 20 o más ciclos de desnaturalización anillamiento y alargamiento. En muchos casos, las etapas de anillamiento y alargamiento se pueden realizar concurrentemente, en cuyo caso, el ciclo contiene sólo dos etapas.

ES 2 310 275 T3

En el procedimiento reivindicado, empleando RT-PCR, la reacción de amplificación por RT-PCR se realiza en un tiempo adecuado para la diagnosis intraoperatoria, pudiendo ser la duración de cada una de estas etapas del orden de segundos y no de minutos. Específicamente, con ciertos nuevos cicladores se puede generar una velocidad de rampa térmica de como mínimo aproximadamente 5°C por segundo, por lo que se usan amplificaciones por RT-PCR en 30 minutos o menos. Más preferiblemente, las amplificaciones se realizan en menos de 25 minutos. Teniendo esto presente en mente, los siguientes tiempos proporcionados para cada etapa del ciclo de PCR no incluyen tiempos de rampa. La etapa de desnaturalización puede realizarse en tiempos de 10 segundos o menos. De hecho, en algunos cicladores térmicos se puede seleccionar "0 segundos" en el programa, que puede ser la duración óptima de la etapa de desnaturalización. Esto es, es suficiente que el ciclador térmico alcance la temperatura de desnaturalización. Muy preferiblemente, las etapas de anillamiento y alargamiento son de menos de 10 segundos cada una y, cuando se realizan a la misma temperatura, la combinación de la etapa de anillamiento/alargamiento debe ser inferior a 10 segundos. Algunos procedimientos de detección homogénea de sondas, sin embargo, pueden requerir una etapa separada de alargamiento para maximizar un comportamiento de ensayo rápido. Con el fin de minimizar el tiempo total de amplificación y la formación de reacciones secundarias no específicas, típicamente, las temperaturas de anillamiento son superiores a 50°C. Más preferiblemente, las temperatura de anillamiento son superiores a 55°C.

Por varias razones es deseable para RT-PCR una reacción individual combinada, sin intervención del experimentador: (1) riesgo aminorado de error, (2) riesgo aminorado de contaminación de la diana o el producto y (3) velocidad de ensayo más alta. La reacción puede ser de una o dos polimerasas. En el caso de dos polimerasas, una de estas enzimas típicamente es una polimerasa de ADN basada en ARN (transcriptasa inversa) y una es una polimerasa termoestable de ADN basada en ADN. Para maximizar el comportamiento del ensayo, es preferible emplear una forma de tecnología de "arranque caliente" para estas dos funciones enzimáticas. Las patentes U.S. n.º. 5.411.876 y n.º. 5.985.619 proporcionan ejemplos de diferentes enfoques de "arranque caliente". Los procedimientos preferidos incluyen el uso de uno o más procedimientos de termoactivación que secuestran uno o más de los componentes requeridos para una eficiente polimerización de ADN. Las patentes U.S. n.º. 5.550.044 y n.º. 5.413.924 describen procedimientos para preparar reactivos para uso en tales procedimientos. La patente U.S. n.º. 6.403.341 describe un enfoque de secuestro que implica la alteración química de uno de los componentes de reactivos de la PCR. En la realización más preferida, tanto las actividades de la polimerasa dependiente de ADN como de la dependiente de ARN residen en una enzima individual. Entre otros componentes que se requieren para una amplificación eficiente están incluidos trifosfatos de nucleósidos, sales divalentes y componentes tampón. En algunos casos pueden ser beneficiosos estabilizadores no específicos de ácidos nucleicos y enzimas.

La especificidad de cualquier diagnóstico molecular basado en la amplificación descansa mucho, pero no exclusivamente, en la identidad de los conjuntos de cebadores. Los conjuntos de cebadores son pares de cebadores oligonucleotídicos de avance y retroceso que se anillan a una secuencia de ADN diana para permitir la amplificación de la secuencia diana, produciéndose por ello un amplicón específico para la secuencia diana. Los cebadores deben ser capaces de amplificar marcadores del estado de enfermedad de interés. En el caso de la presente invención, estos marcadores están dirigidos al cáncer de mama y melanoma.

En el caso del cáncer de mama, el procedimiento reivindicado implica la amplificación de un marcador de tejido específico para tejido de mama o tejido de cáncer de mama. Se usa una combinación de como mínimo dos marcadores de manera que se detectan de forma clínicamente significativa y fiable células de mama y/o de cáncer en ganglios linfáticos cuando están presentes. Preferiblemente, los marcadores se amplifican y detectan en un único recipiente de reacción al mismo tiempo (esto es, son múltiplejados). Muy preferiblemente, los conjuntos de cebadores son complementarios de los fragmentos de ácido nucleico específicos para esos marcadores. Los marcadores incluyen mamaglobina (Sec ID n.º. 17) y uno o más (preferiblemente uno) de los siguientes: B305D (Sec. ID n.º. 14), PIP (Sec. ID n.º. 18), B726 (Sec ID n.º. 15), CABA (Sec. ID n.º. 16) u OBE (Sec. ID. n.º.). La combinación de un marcador específico para un tejido y un marcador específico para cáncer proporciona una sensibilidad y una especificidad que exceden de 90% y 95%, respectivamente. Existen varios marcadores en forma de isoformas siendo algunos de los isoformas más específicos para un tejido o cáncer que otros. En el caso del B305D, el isomorfo más preferido es el isomorfo C B305D. Es también el isomorfo más preferido en combinación con el marcador de mamaglobina.

En el caso de melanoma, el procedimiento reivindicado implica la amplificación de marcadores específicos para el cáncer melanoma. Así, los conjuntos de cebadores son complementarios de los fragmentos de ácido nucleico específicos para esos marcadores. Los marcadores incluyen uno o más (preferiblemente dos o más) de los siguientes: tirosinasa (Sec ID n.º. 22) y MART I (Sec ID n.º. 21). Estos marcadores proporcionan una sensibilidad y una especificidad que exceden de 90%.

La reacción debe contener también algún medio de detección de una señal específica. Esto se logra preferiblemente mediante el uso de un reactivo que detecta una región de una secuencia de ADN derivada de la polimerización de la secuencia diana de interés. Los reactivos preferidos para la detección dan una diferencia de señal mensurable cuando se unen a una secuencia específica de ácido nucleico de interés. A menudo, estos procedimientos implican sondas de ácido nucleico que dan una fluorescencia incrementada cuando se unen a una secuencia de ácido nucleico específica de interés. El progreso de las reacciones de PCR del procedimiento inventivo típicamente se controla por análisis de las velocidades relativas de la producción de amplicones de cada conjunto de cebadores de PCR. El control de la producción de amplicones puede realizarse por varios reactivos y procedimientos de detección, incluidos, sin limitación, cebadores fluorescentes, sondas fluorógenas y colorantes fluorescentes que se unen a ADN de cadena doble, balizas moleculares, escorpiones y otros. Un procedimiento común para controlar una reacción PCR emplea un

ES 2 310 275 T3

ensayo fluorescente de 5' nucleasa. Este procedimiento explota la actividad de 5' nucleasa de ciertas ADN polimerasas termoestables (tales como Taq o Tfl ADN polimerasas) para escindir una sonda oligómera durante el procedimiento de PCR. El oligómero se selecciona para anillarse a la secuencia diana amplificada en condiciones de alargamiento. La sonda típicamente tiene un informador en su extremo 5' y un extintor fluorescente en el extremo 3'. Mientras que el oligómero está intacto, la señal fluorescente del informador se apaga. Sin embargo, cuando el oligómero se digiere durante el proceso de alargamiento, el informador ya no está en la proximidad del extintor. La acumulación relativa del informador fluorescente libre para un amplicón dado puede compararse con la acumulación de los mismos amplicones para una muestra de control y/o a la de un gen de control, tal como, sin limitaciones, β -actina y PBDG (porfobilinogendesaminasa) para determinar la abundancia relativa de un producto de ADNc dado de un ARN dado en una población de ARN. Los productos y reactivos para un ensayo de 5'-nucleasa son fácilmente adquiribles en el comercio, por ejemplo, de Applied Biosystems.

Los reactivos de detección preferidos se denominan comercialmente "escorpiones" y se describen en las patentes U.S. n.º. 6-326.145 y n.º. 5.525.494. Estos reactivos incluyen una o más moléculas que comprenden un cebador de cola y un sistema de señalización integrado. El cebador tiene una región de unión de molde y una cola que comprende un conector y una región de unión diana. La región diana de unión de la cola se hibridiza con una secuencia complementaria en un producto de extensión del cebador. Este acontecimiento de hibridación específica de una diana está acoplado a un sistema de señalización en el que la hibridación conduce a un cambio detectable. En reacciones de PCR, la región de unión diana y la región de cola ventajosamente están dispuestas de manera que la región de cola permanece de una sola cadena, esto es, no copiada. Así, la región de cola es no amplificable en los productos de amplificación por PCR. El conector comprende un resto de bloqueo que previene la extensión de cadena mediada por polimerasa en el molde de cebador.

El equipo y el software también son fácilmente asequibles para controlar y guiar la acumulación de amplicones en PCR y QRT-PCR incluido el termociclador Smart Cycler, disponible comercialmente en Cepheid de Sunnyvale, California, y el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700, adquirible comercialmente de Applied Biosystems.

En las reacciones de RT-PCR preferidas, las cantidades de cierta transcriptasa inversa y los componentes de la reacción PCR son típicas con el fin de aprovechar los tiempos de rampa más rápidos de algunos cicladores térmicos. Específicamente, las concentraciones de cebador son muy altas.

Las concentraciones típicas de cebador específico al gen para reacciones de transcriptasa inversa son inferiores a aproximadamente 20 nM. Para conseguir una rápida reacción de transcriptasa inversa, del orden de uno o dos minutos, la concentración del cebador de transcriptasa inversa se aumentó a más de 20 nM, preferiblemente a como mínimo 50 nM y, típicamente, a aproximadamente 100 nM. Las concentraciones estándar de cebador de PCR varían de 100 nM a 300 nM. En reacciones estándar de PCR se pueden usar concentraciones más altas para compensar variaciones de Tm. Sin embargo, a los fines que se consideran aquí, las concentraciones de cebador indicadas son para circunstancias en las que no se necesita compensar Tm. Se pueden determinar empíricamente y usar concentraciones de cebadores proporcionalmente más altas si se desea o es necesario compensar Tm. Para conseguir reacciones rápidas de PCR, las concentraciones de cebador de PCR típicamente son mayores que 250 nM, preferiblemente mayores que aproximadamente 300 nM y típicamente de aproximadamente 500 nM.

Los diagnósticos comercialmente usados emplean también preferiblemente uno o más controles internos positivos que confirman la operación de una reacción de amplificación particular para un resultado negativo. Entre las causas potenciales de resultados negativos falsos que se deben controlar en una reacción RT-PCR están incluidos: cantidad inadecuada de ARN, degradación del ARN, inhibición de RT y/o PCR y error del experimentador. En el caso de ensayos de expresión de genes, es preferible utilizar un gen que se expresa continuamente en el tejido de interés. PBGD (Seq. ID n.º. 20) es un gen que se usa comúnmente como control interno debido a varios factores: no contiene pseudogenes conocidos en seres humanos, se expresa constitutivamente en tejidos humanos y se expresa a un nivel relativamente bajo y por tanto es menos probable que cause inhibición de la amplificación de secuencias diana de interés. El uso de PBGD como control minimiza o elimina dar resultados experimentales erróneos que se deben a todas las fuentes potenciales de resultados negativos falsos.

En la comercialización de los procedimientos de QRT-PCR, ciertos kits para la detección de ácidos nucleicos específicos son particularmente útiles. En una realización, el kit incluye reactivos para amplificar y detectar marcadores. Opcionalmente, el kit incluye reactivos de preparación de muestras y/o artículos (por ejemplo tubos) para extraer ácidos nucleicos de tejido de ganglios linfáticos. Los kits pueden incluir también artículos para minimizar el riesgo de contaminación de la muestra (por ejemplo, escalpelo desechable y superficie para la disección y preparación de ganglios linfáticos).

En un kit preferido, están incluidos los reactivos necesarios para el procedimiento de QRT-PCR de un tubo descrito antes, tales como transcriptasa inversa, cebador de transcriptasa inversa, un conjunto de los correspondientes cebadores de PCR (preferiblemente para marcadores y controles), una ADN polimerasa termoestable tal como Taq polimerasa, y un(os) reactivo(s) de detección adecuado(s) tales como, no limitativamente, una sonda escorpión, una sonda para un ensayo fluorescente de 5' nucleasa, una sonda molecular de baliza, un cebador de colorante individual o un colorante fluorescente específico para ADN de doble cadena, tal como bromuro de etidio. Preferiblemente, los cebadores están en cantidades que dan las altas concentraciones descritas antes. Están disponibles común y comercialmente ADN polimerasas termoestables en una variedad de fabricantes. Son otros materiales adicionales del kit: tubos o viales de

ES 2 310 275 T3

reacción adecuados, una composición de barrera, típicamente una perla de cera que opcionalmente incluye magnesio; mezclas de reacción (típicamente 10X) para la transcriptasa inversa y las etapas de PCR, incluidos tampones y reactivos necesarios tales como dNTPs; agua exenta de nucleasa o ARNasa; inhibidor de ARNasa; ácido(s) nucleico(s) de control y/o cualesquier tampones adicionales, compuestos, cofactores, constituyentes iónicos, proteínas y enzimas, polímeros y similares que se pueden usar en transcriptasa inversa y/o etapas de PCR de reacciones de QRT-PCR. Opcionalmente, los kits incluyen reactivos y materiales para extracción de ácidos nucleicos.

Los ejemplos no limitativos siguientes ayudan a describir más la invención.

10 Ejemplos

PCR en tiempo real

Los ejemplos de la presente invención están basados en el uso de PCR en tiempo real. En PCR en tiempo real, los productos de la reacción en cadena de polimerasa se controlan en tiempo real durante la fase exponencial de PCR y no en una medición en el punto final. Por ello, la cuantificación de ADN y ARN es mucho más precisa y reproducible. Los valores de la fluorescencia se registran durante cualquier ciclo y representan la cantidad de producto amplificado en ese punto en la reacción de amplificación. Cuantos más moldes estén presentes al comienzo de la reacción, menor es el número de ciclos necesario para alcanzar un punto en el que se registra primeramente la señal de fluorescencia como estadísticamente significativa por encima del fondo, que es la definición de los valores (Ct). El concepto del ciclo umbral (Ct) permite una cuantificación precisa y reproducible usando RT-PCR basada en fluorescencia. La detección homogénea de productos de PCR se realiza preferiblemente basándose en: (a) colorantes de unión de ADN de doble cadena (por ejemplo, SYBR Green); (b) sondas fluorógenas (por ejemplo, sondas Taq Man, balizas moleculares) y (c) cebadores directos marcados (por ejemplo, cebadores Amplifluor).

25 Ejemplo 1

Una comparación de ARN extraído por el procedimiento rápido y por el procedimiento de la técnica anterior basado en PCR en tiempo real con ensayos con Taqman

30 Se compró de Genomics Collaborative un total de 16 ganglios H&E positivos 15 muestras de ganglios de mama H&E negativos.

35 Se procesó como sigue una pieza de 30 mg de tejido: se añadieron 600 μ l de tampón RLT y la muestra de tejido se homogeneizó manualmente durante 20-40 s mediante una trituradora de tejidos desechable (cat. 15704-126, VWR Scientific, West Chester, PA). El tubo se centrifugó durante 3 min a velocidad máxima en una centrifugadora Eppendorf modelo 5415C. El fluido sobrenadante se pasó a un nuevo tubo y se añadió 1 volumen de etanol al 70%.

40 La muestra (700 μ l) se aplicó a una minicolumna RNeasy puesta en un colector de vacío QIAvac 24 y se aplicó vacío. Se añadió tampón RWI (700 μ l) y se dejó que la mezcla filtrara a través de la columna. Se añadió con pipeta a la columna tampón RPE (500 μ l) y se dejó filtrar a través de la columna. Se añadieron a la columna otros 500 μ l de tampón RPE y se dejó que la mezcla filtrara a través de la columna. La columna RNeasy se puso en un tubo de recogida de 2 ml y se centrifugó en una microcentrifugadora a la velocidad máxima durante 1 min. Se eluyó luego el ARN de la columna, pasando la columna RNeasy a un tubo nuevo de recogida de 1,5 ml, añadiendo 50 μ l de agua exenta de ARNasa y centrifugando durante 1 min a 8000 X g.

Parte II

Extracción rápida

50 La segunda pieza de 30 mg del tejido de ganglio linfático se procesó por un protocolo rápido como sigue: (1) la pieza de tejido se añadió a 600 μ l de tampón RLT y se homogeneizó manualmente durante 20-40 s con una trituradora de tejidos desechable; (2) el homogeneizado se centrifugó a través de una columna QIAshredder durante 30 s a la velocidad máxima; (3) al lisado se añadió 1 volumen de etanol al 70% y se mezcló con pipeta; (4) la muestra se aplicó luego a una minicolumna RNeasy puesta en un colector de vacío QIAvac 24 y se aplicó vacío; (5) se añadieron a la columna 700 μ l de tampón RWI y se dejó que filtrara a través de la columna; (6) se añadieron a la columna 500 μ l de tampón RPE y se dejó que filtrara a través de la columna; (7) se pasó la columna a un tubo de recogida de 2 ml y se centrifugó durante 30 s a 10.000 rpm; (8) se añadieron a la membrana 25 μ l de agua exenta de ARNasa y la columna se centrifugó durante 30 s a 10.000 rpm para eluir el ARN. Todas las etapas de centrifugación en el protocolo rápido se realizaron en una centrifugadora VWR modelo 10MVSS.

Se transcribió inversamente el ARN extraído y se cuantificaron el ARN y el ADN como se ha descrito previamente.

65 Para los ensayos Taqman se compraron de Applied Biosystems, Foster City, CA: kit Taqman Core Reagent, tampón de PCR Gene Amp 10 X, Amp Erase Uracil-N-glicosidasa y ADN polimerasa Ampli Taq Gold. Todos los otros reactivos se obtuvieron de fuentes comerciales descritas en el Ejemplo 1. El glicerol se compró de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) y Tween 20 de Eastman Organic Chemicals (Rochester, NY).

ES 2 310 275 T3

Los cebadores de mammaglobina (SEQ ID n°. 3 y SEQ ID n°. 4) fueron sintetizados por Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA) y la sonda de Taqman de mammaglobina (SEQ ID n°. 7) de Epoch Biosciences (San Diego, CA). Los cebadores de PBGD (SEQ ID n°. 8 y SEQ ID n°. 9) fueron sintetizados por Qiagen Operon (Alameda, CA) y la sonda (SEQ ID n°. 23) por SYNTHEGEN, LLC (Houston, TX), los cebadores de B305D (SEQ ID n°. 11 y SEQ ID n°. 12) fueron sintetizados en Invitrogen Corp., y la sonda (SEQ ID n°. 13) por Applied Biosystems, Inc. Para todas las sondas Taqman se usaron como colorante y par de extinción carboxifluoresceína (FAM) y carboxitrametilrodamina (TAMRA).

SEQ ID NO. 3 CAAACGGATG AACTCTGAG CAATGTTGA
SEQ ID NO. 4 TCTGTGAGCC AAAGG TCTTG CAGA
SEQ ID NO. 7 6-FAM - TGTTTATGCA ATTAATATAT GACAGCAGTC TTTGTG-TAMRA
SEQ ID NO. 8 CTGAGGCACC TGGAAGGAGG
SEQ ID NO. 9 CATCTTCATG CTGGGCAGGG
SEQ ID NO. 23 6- FAM-CCTGAGGCAC CTGGAAGGAG GCTGCAG TGT-TAMRA
SEQ ID NO. 11 TCTGATAAAG GCCGTACAAT G
SEQ ID NO. 12 TCACGACTTG CTGTTTTTGC TC
SEQ ID NO. 13 6-FAM-ATCAAAAAACA AGCATGGCCTA CACC- TAMRA

Para los ensayos de Taqman se preparó una mezcla madre añadiendo 10 μ l de tampón n°. 1 de PCR 10 X, 14 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 8 μ l de dNTP 10 mM, 1 μ l de AmpErase UNG (1 U/ μ l), 16 μ l de glicerol, 1 μ l de Tween 20 al 1% p/v, 0,75 μ l de AmpliTaq Gold (5U/ μ l), 6 μ l de cada cebador de un acopio 5 M, 0,4 μ l de un acopio 10 μ M de sonda y agua a un volumen total de 96 μ l. Se añadieron la mezcla madre (48 μ l) y 2 μ l de cADN de cada muestra de ganglio a cada pocillo de placa de microtitulación de reacción óptica. Después de rematar con remates ópticas, las placas se procesaron con un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Los reactivos comerciales, incluidos el kit de reactivos Taqman PCR Core, los reactivos de molde de ADN Taqman y los reactivos de detección de Taqman B-actin se compraron de Applied Biosystems (Foster City, CA) y el ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Para el análisis con el ensayo de mammaglobina se usó un valor umbral de 0,02, de 0,03 para el ensayo de B305D, de 0,08 para el ensayo de B-actina y de 0,1 para el ensayo de PBGD. En las Tablas 3 y 4 se dan las medias de la determinación por triplicado en los ensayos de Taqman.

En la Tabla 1 se presenta una comparación de la medida en tiempo real de los genes domésticos B-actina y PBGD. en 15 muestras de ganglios H&E negativos así como en 16 ganglios H&E positivos y dos muestras de control de cADN. Los resultados de estos experimentos indican una buena conformidad entre los valores de Ct obtenidos con el método rápido de esta invención y los procedimientos comerciales estándar (QIAGEN), lo que confirma que el ARN extraído por el protocolo de extracción rápida de ARN es capaz de ser inversamente transcrito y amplificado por PCR en cuantía similar al ARN extraído basándose en un protocolo comercial estándar.

La Tabla 2 compara resultados de expresión de genes basados en el valor de Ct para los marcadores de cáncer de mama mammaglobina y B305D con las mismas muestras de ganglios de mama evaluadas en la Tabla 1. Para determinar si se puede hacer una correlación entre muestras de ganglios de mama H&E positivos y H&E negativos basándose en resultados en tiempo real, se identificó el valor más bajo de Ct para cada marcador en las muestras de ganglios de H&E negativos para mammaglobina y B305D. A las muestras H&E positivas se aplicó un corte arbitrario, pero conservador, de 2,5Ct valores menos que este valor más bajo entre las muestras H&E negativas. Las muestras que están sombreadas en la Tabla 2 tienen una expresión más alta para estos dos marcadores de mama en cuanto a que el valor de Ct es como mínimo 2,5Ct valores más bajo que un valor de Ct observado entre las muestras H&E negativas. Había una buena correlación en la expresión de estos marcadores usando el procedimiento rápido de esta invención y el protocolo comercial recomendado por el fabricante (QIAGEN).

Usando mammaglobina como marcador, los valores de Ct en dos muestras entre las 15 muestras de ganglios H&E no se correlacionaban estrictamente entre el procedimiento rápido de esta invención y los protocolos de extracción de ARN QIAGEN. En una de estas muestras, GCLNC-24, la diferencia en el valor de Ct era de 0,4, que está dentro del error experimental. La segunda muestra presentaba diferencias mayores en el valor de Ct tanto con mammaglobina como con B305D debido a dificultades en la cuantificación espectral de ARN en estas muestras así como a posibles problemas de muestreo debidos a la distribución no uniforme, bien establecida, de metástasis en los ganglios. (Csemi 1999, Metastases in axillary sentinel lymph nodes in breast cancer as detected by intensive histopathological work up, J. Clin. Pathol., 52:0922-924).

ES 2 310 275 T3

TABLA 1

Comparación de ARN extraído por el procedimiento rápido y el procedimiento de la técnica anterior medido por ensayos Taqman para genes domésticos B actina y PEDG

Muestra	Molde	Valores de Ct para B-actina		Valores de Ct para PBGD		
		Qiagen	Rápido	Qiagen	Rápido	
H&E negativo	1	GCLNN-10	20.7	21.9	32.6	34.1
	2	GCLNN-11	20.5	21.0	33.7	32.7
	3	GCLNN-12	21.7	22.5	32.8	32.8
	4	GCLNN-14	21.2	19.1	32.1	31.0
	5	GCLNN-15	19.8	21.3	32.5	39.9
	6	GCLNN-19	22.4	23.0	29.9	39.1
	7	GCLNN-20	17.8	18.6	31.7	30.9
	8	GCLNN-23	21.4	19.2	33.1	31.4
	9	GCLNN-24	21.1	26.1	36.9	37.0
	10	GCLNN-25	19.1	21.4	32.7	33.1
	11	GCLNN-26	23.8	26.7	40.0	39.7
	12	CBLNN-274	20.1	19.8	31.5	30.7
	13	CBLNN-257	20.4	22.6	32.8	34.0
	14	CBLNN-258	23.4	27.6	33.1	35.4
	15	CBLNN-262	23.0	23.6	33.0	32.1
H&E positivo	16	GCLNC-1	18.7	18.5	28.8	29.1
	17	GCLNC-5	20.4	21.6	31.3	31.0
	18	GCLNC-6	20.0	19.9	31.4	30.2
	19	GCLNC-7	20.6	28.2	29.3	32.1
	20	GCLNC-11	18.9	19.5	31.2	30.9
	21	GCLNC-12	26.1	23.8	32.6	31.2
	22	GCLNC-13	20.5	18.9	30.8	27.7
	23	GCLNC-16	20.5	22.7	31.1	30.5
	24	GCLNC-17	22.1	19.4	40.0	29.1
	25	GCLNC-20	20.0	19.5	31.9	29.6
	26	GCLNC-21	21.1	21.3	33.5	32.2
	27	GCLNC-22	24.2	22.9	29.3	32.1
	28	GCLNC-23	18.4	20.7	29.6	35.5
	29	GCLNC-24	19.1	19.5	29.4	30.1
	31	ALNC-1	21.1	19.4	30.2	30.8
	32	ALNN-2	18.9	19.5	31.4	30.0
	33	CBLNN-247	18.2	20.7	31.5	31.1
	Valores de corte			33.7	37.5	36.1

ES 2 310 275 T3

En resumen, este experimento indica resultados similares de la amplificación por PCR en tiempo real en cuanto a rendimiento de ARN, calidad y tiempo real con el protocolo que implica una columna QIAshredder en vez de una etapa de centrifugación de 3 min después de homogeneización. Esto reduce en 2,5 min el tiempo requerido para realizar la extracción de ARN, lo que es importante al desarrollar protocolos adecuados para aplicaciones intraoperatorias y otras en las que se requieren resultados rápidos para impactar sobre el cuidado del paciente.

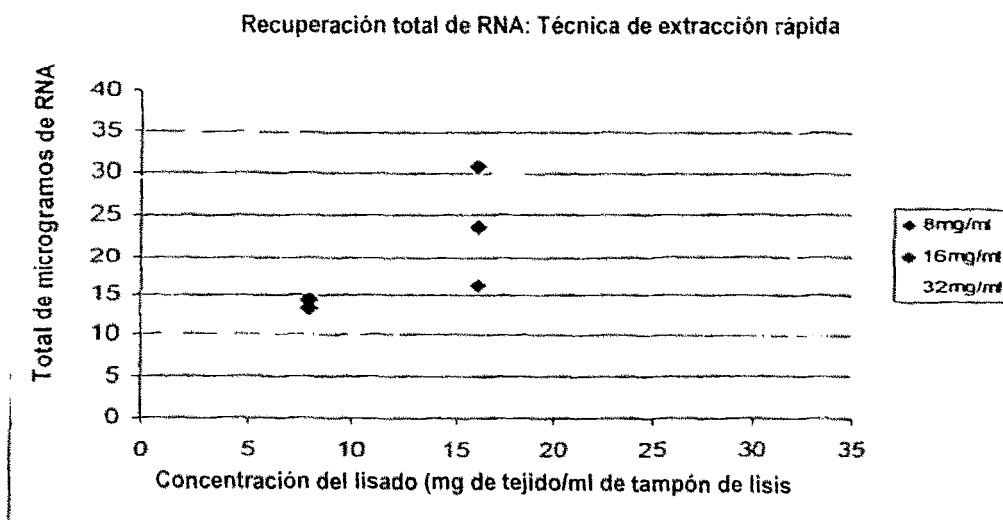
Ejemplo 3

10 Efecto de la dilución del lisado sobre el rendimiento de ARN y la precisión

El ejemplo siguiente ilustra el efecto de la dilución del lisado sobre el rendimiento de ARN y la precisión de la recuperación de ARN. En este ejemplo, se cortaron 20 mg, 10 mg o 5 mg de tejido de ganglio de cerdo congelado. El tejido se trituró usando una trituradora de tejidos desechable de 50 ml durante 30 s y las muestras se centrifugaron por rotación. Para cada peso de ganglio se hicieron tres replicados. 1 ml de cada lisado se pasó a un tubo de centrifugadora de 1,7 ml que se centrifugó luego en una centrifugadora Eppendorf a velocidad máxima (14.000 rpm) durante 30 s. Se centrifugaron 700 microlitros a través de una columna QIAshredder y las muestras se centrifugaron a la velocidad máxima durante 30 s. La columna se lavó luego, se secó y se eluyó el ARN como se ha descrito antes en el Ejemplo 2, parte I, etapas 4-8. Se cuantificó el ARN mediante un Gene Spec II. Los resultados de estos estudios se presentan en las Tablas 3 y 4 e ilustran la excelente precisión en un peso inicial de tejido de ganglio de 2,5 mg homogeneizado en 600 ml de tampón de homogeneización, en comparación con muestras con mayores pesos que incluyen 10 mg y 20 mg de tejido de ganglio. Estos resultados indican que se puede obtener una precisión mejorada de la recuperación de ARN a peso menor del ganglio. También sería de esperar que homogeneizados más diluidos filtraran más rápidamente a través de la columna y que incluso hubiera menos problemas potenciales de atasco del filtro.

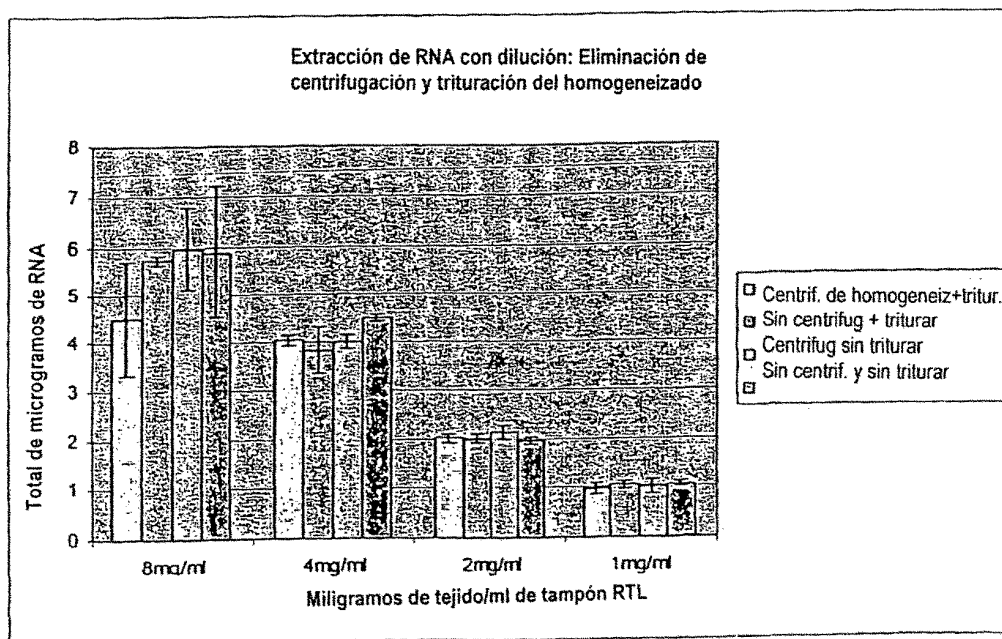
TABLA 3

Efecto de la dilución del lisado sobre la recuperación de ARN



ES 2 310 275 T3

TABLA 4
Efecto de la dilución



Ejemplo 4

Ensayo TaqMan de ARN de muestras de ganglios linfáticos

Transcripción inversa

Se sintetizó ADNc a partir de 20 ug de ARN total a 42°C durante 60 min en una mezcla de reacción de 250 ul que contenía Tris-Cl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM, 2000U de Superscript, 400 U de Rnasina, 2 ug de cebador oligo dT, 0,08 mg/ml de BSA y 0,2 mM de cada uno de dACT, dCTP, dGTP y TTP. El cADN resultante se diluyó 1:8 en agua.

Amplificación por PRC

2 ul de cada cADN diluido se amplificaron en el Applied Biosystems 7900 con un volumen total por pocillo de 50 ml. La amplificación se realizó con el protocolo siguiente: 50°C durante 2 min y 95°C durante 10 min, luego 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos (s), 60°C durante 1 min (58°C para B726) y 68°C durante 1 min. Los componentes de la mezcla de reacción y las concentraciones finales son los siguientes: 1 X tampón A de TaqMan (ABI), MgCl₂ 3,5 mM, 0,2 mM de dGTP, dCTP y cATP, dUTP 0,4 mM (ABI), 0,1 u/ul de Amp/Erase UNG (ABI), 0,0375 U/ul de AmpliTaq Gold (ABI), 8% de glicerol (Sigma), 0,01% de Tween 20 (Kodak), 0,3 uM de cada cebador (Invitrogen), agua exenta de RNasa/DNasa (Sigma) y sonda de nucleótido 5'-FAM, 3'TAMRA 40nM (Synthegen). A cada conjunto de cebador/sonda se asignó un umbral de señal relativa respecto a un colorante de referencia interna (ROX) en el intervalo lineal logarítmico del aumento de la intensidad fluorescente causado por el aumento de producto de PCR. Los valores de Ct resultantes se utilizaron para determinar la expresión relativa de los genes en todas las muestra ensayadas.

Cebadores utilizados

Mamaglobina

Cebador 1 1, SEQ ID NO 3 - CAAACGGATGAAACTCTGAGCAATGTTGA

Cebador 2 2, SEQ ID NO 4 - TCTGTGAGCCAAAGGTCTTGCAGA

Sonda . SEQ ID NO 7 - FAM-TGTTTATGCAATTAATATATGACAGCAGTCTTTGTG-TAMRA

ES 2 310 275 T3

B305D

5 Cebador 1 SEQ ID NO 11 - TCTGATAAAGGCCGTACAATG
 Cebador 2 SEQ ID NO 12 - TCACGACTTGCTGTTTTTGCTC
 Sonda. SEQ ID NO 24 - FAM ATCAAAAAACAAGCATGGCCTCACACC

 PBGD

10 Cebador 1 SEQ ID NO 25 - CTGCTTCGCTGCATCGCTGAAA
 Cebador 2 SEQ ID NO 26 - CAGACTCCTCCAGTCAGGTACA
 Sonda SEQ ID NO 23 - FAM-CCTGAGGCACCTGGAAGGAGGCTGCAGTGT-TAM

 PIP

15 Cebador 1 SEQ ID NO 27 - GCTTGGTGGTTAAAACCTACC
 Cebador 2 SEQ ID NO 28, - TGAACAGTTCTGTTGGTGTA
 Sonda SEQ ID NO 29 - FAM-CTGCCTGCCTATGTGACGACAATCCGG-TAMRA

20 GABA

 Cebador 1 SEQ ID NO 30 - CAATTTTGGTGGAGAACCCG
 Cebador 2 SEQ ID NO 31 - GCTGTCCGAGGTATATGGTG
 Sonda. SEQ ID NO 32 - FAM CATTTCAGAGAGTAACATGGACTACACA TAMRA

25 B726

 Cebador 1 SEQ ID NO 33 - GCAAGTGCCAATGATCAGAGG
 Cebador 2 SEQ ID NO 34- ATATAGACTCAGGTATACACACT
 Sonda. SEQ ID NO 35 - FAM TCCCATCAGAATCCAAACAAGAGGAAG

30

Resultados

35 La tabla anexa contiene los valores de Ct obtenidos para 11 ganglios linfáticos histológicamente negativos y 24
 ganglios linfáticos histológicamente positivos. Para cada marcador se determinó un corte para el carácter positivo
 sustrayendo 2,5 ciclos del Ct más bajo observado con las muestras histológicamente negativas. Las muestras positivas
 están sombreadas. Basándose en estos criterios, se determinaron las velocidades de detección para los marcadores
 individuales. Se ve una complementariedad óptima con mammaglobina combinada con B305D A/C, una combinación
 40 que detecta 23/24 muestras histológicamente positivas. Una combinación de mammaglobina, B305D y GABA detectó
 la totalidad de las 24 muestras. Véase la Tabla 5.

TABLA 5

Muestra	MG	PIP	B305D	GABA	B726	PBGD	Actina
N1	50.0	36.2	35.8	36.5	50.0	30.6	21.6
N2	50.0	38.7	39.0	37.0	50.0	30.4	21.1
N3	50.0	37.8	39.6	39.1	50.0	28.6	23.1
N4	36.3	36.4	39.8	40.0	50.0	32.4	19.8
N5	48.4	40.0	40.0	40.0	50.0	35.8	21.1
N6	46.9	34.8	38.9	36.1	50.0	28.5	20.3
N7	50.0	35.2	40.0	38.4	50.0	27.8	20.3
N8	38.8	38.5	36.9	37.5	50.0	29.4	21.7
N9	50.0	37.0	37.9	36.4	50.0	30.6	20.1
N10	50.0	40.0	38.1	40.0	50.0	31.0	22.3
N11	50.0	39.4	35.8	39.9	50.0	29.4	19.7
C1	25.7	25.1	25.9	36.7	25.8	28.8	21.7
C2	36.0	32.5	35.6	27.2	41.5	29.0	23.2
C3	26.2	30.7	268	37.2	35.2	29.9	241
C4	25.7	22.9	29.7	30.4	37.9	27.3	20.5

ES 2 310 275 T3

TABLA 5 (continuación)

Muestra	MG	PIP	B305D	GABA	B726	PBGD	Acina
C5	25.9	23.3	34.8	38.0	39.1	27.8	21.1
C6	29.7	36.6	28.8	29.9	40.4	26.2	20.4
C7	35.0	33.9	25.4	23.4	42.7	27.1	22.5
C8	22.7	25.3	29.3	38.0	37.8	27.8	18.9
C9	19.2	26.6	27.7	36.3	36.0	26.2	21.1
C10	20.2	30.0	27.4	33.8	39.7	29.4	23.2
C11	30.4	33.2	29.0	26.2	40.7	27.9	21.4
C12	18.6	27.7	24.3	36.0	33.6	28.8	19.4
C13	23.4	17.0	23.1	38.2	24.3	27.4	21.8
C14	35.9	30.7	28.0	39.8	42.3	31.3	21.7
C15	27.0	28.1	25.6	34.6	25.5	29.7	21.1
C16	32.5	34.5	36.9	23.5	46.1	27.7	27.6
C17	38.8	35.7	27.5	26.3	37.4	28.8	29.7
C18	36.9	34.8	29.2	24.7	50.0	26.4	22.0
C19	31.6	22.9	24.5	38.0	39.1	28.9	24.7
C20	22.3	27.6	21.4	32.6	32.9	27.0	21.6
C21	19.3	24.8	25.1	36.2	28.9	28.4	21.3
C22	32.2	28.4	25.8	37.9	37.3	30.6	23.5
C23	20.7	24.2	27.2	37.4	27.4	28.9	22.6
C24	33.0	27.1	32.6	24.3	40.4	26.4	20.0
Corte	33.8	32.3	33.3	33.6	37.5		
Muestras positivas detectadas	19/24	17/24	21/24	10/24	11/24		

Ejemplo 5

Marcadores múltiples

Transcripción Inversa

Se sintetizó ADNc a partir de 20 ug de ARN total a 42°C durante 60 min en 100 ul de reacción utilizando oligo-
 cebadores dT anclados. 20 ng de cada ADNc diluido se amplificaron en el Applied Biosystems 7900 con un volumen
 total por pocillo de 50 ml. La amplificación se realizó con el protocolo siguiente: 94°C durante 2 min, luego 50
 ciclos de: 94°C durante 15 s, 62°C durante 15 s y 72°C durante 45 s. Los componentes de la mezcla de reacción y las
 concentraciones finales son los siguientes: 1 X tampón A de PCR (ABI), MgCl₂ 3,5 mM final, 0,05 mM de dGTP,
 dCTP y cATP y TTP, 0,05 U/ul de Taq polimerasa que contenía un exceso 5-20X de 2 anticuerpos anti-Taq (TP4-9 y
 TP1-12), 0,2 uM de cada cebador (Invitrogen), agua exenta de RNasa/DNasa (Sigma) y una dilución 1:20000 de un
 acopio de SYBR Green (Sigma). Las secuencias de amplificación del cebador fueron idénticas a las empleadas en el
 ensayo TaqMan de ganglios linfáticos. Para determinar los valores de Ct se utilizó un umbral común de 275 unidades
 de fluorescencia. Los valores de Ct se convirtieron luego en expresión cuantitativa de gen y se trazaron en relación
 con un corte que se supuso que se aproximaba al nivel mínimo de la expresión de gen requerida para diferenciar ganglios
 linfáticos de metástasis de la expresión de fondo.

ES 2 310 275 T3

Cebadores utilizados

Mammaglobina

5 Cebador 1, SEC ID NO 3 - CAAACGGATGAAACTCTGAGCAATGTTGA

Cebador 2, SEC ID NO 4 - TCTGTGAGCCAAAGGTCTTGCAGA

10 *B305D*

Cebador 1, SEC ID NO 11 - TCTGATAAAGGCCGTACAATG

Cebador 2, SEC ID NO 12 - TCACGACTTGCTGTTTTTGCTC

15

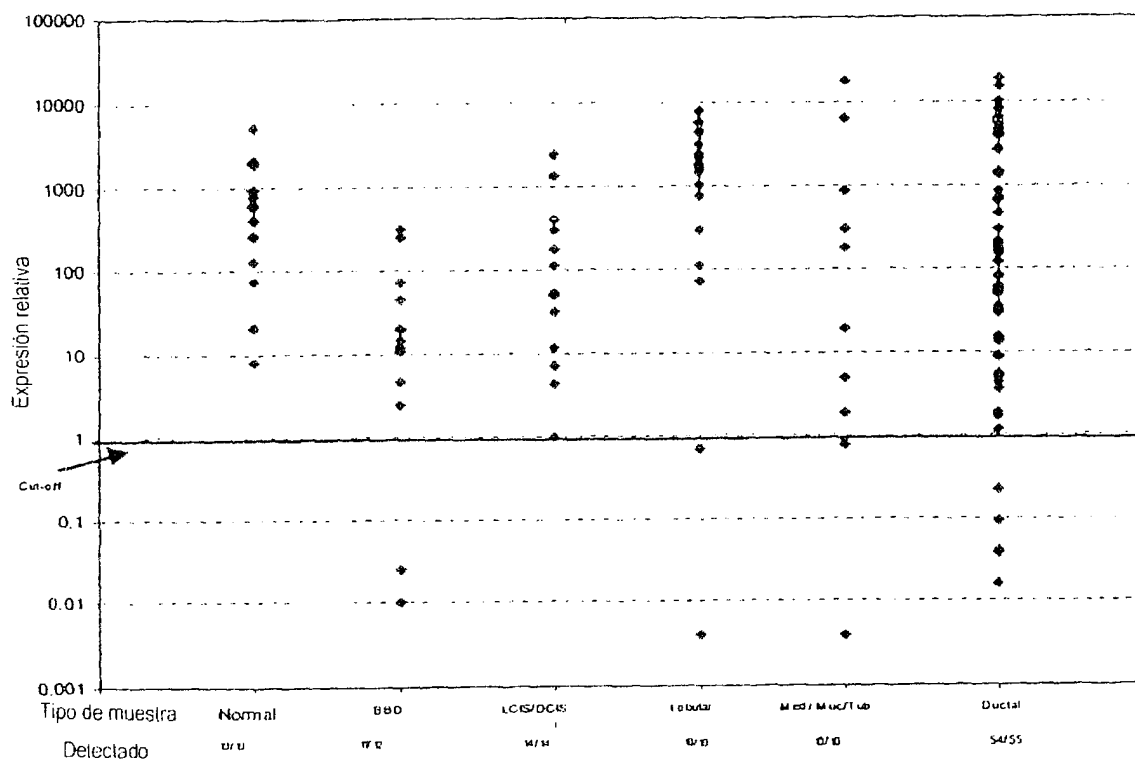
Los datos presentados en las Tablas 6-8 revelan la potencia de combinar genes mammaglobina y firmas de B305D para obtener alcance de la vasta mayoría de muestras de cáncer de mama.

20

TABLA 6

Expresión de mammaglobina en diferentes tipos de células de mama

25



55

60

65

ES 2 310 275 T3

TABLA 7

Expresión de B305D en diferentes tipos de células de mama

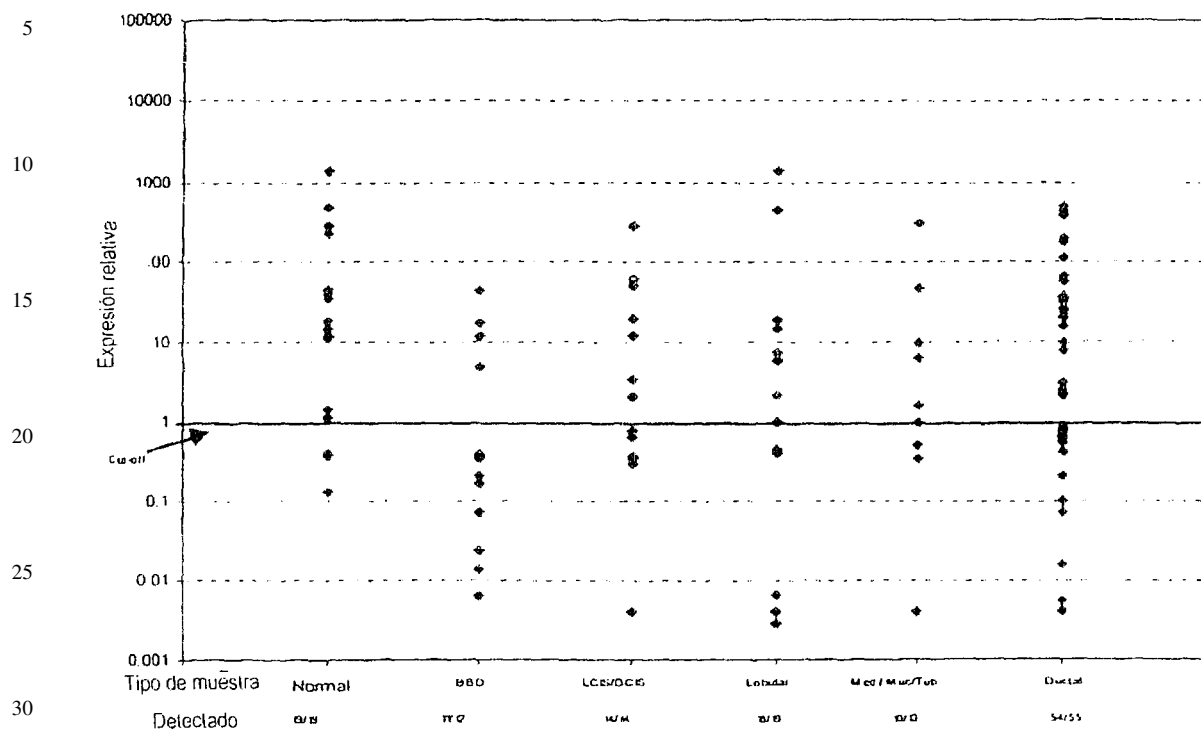
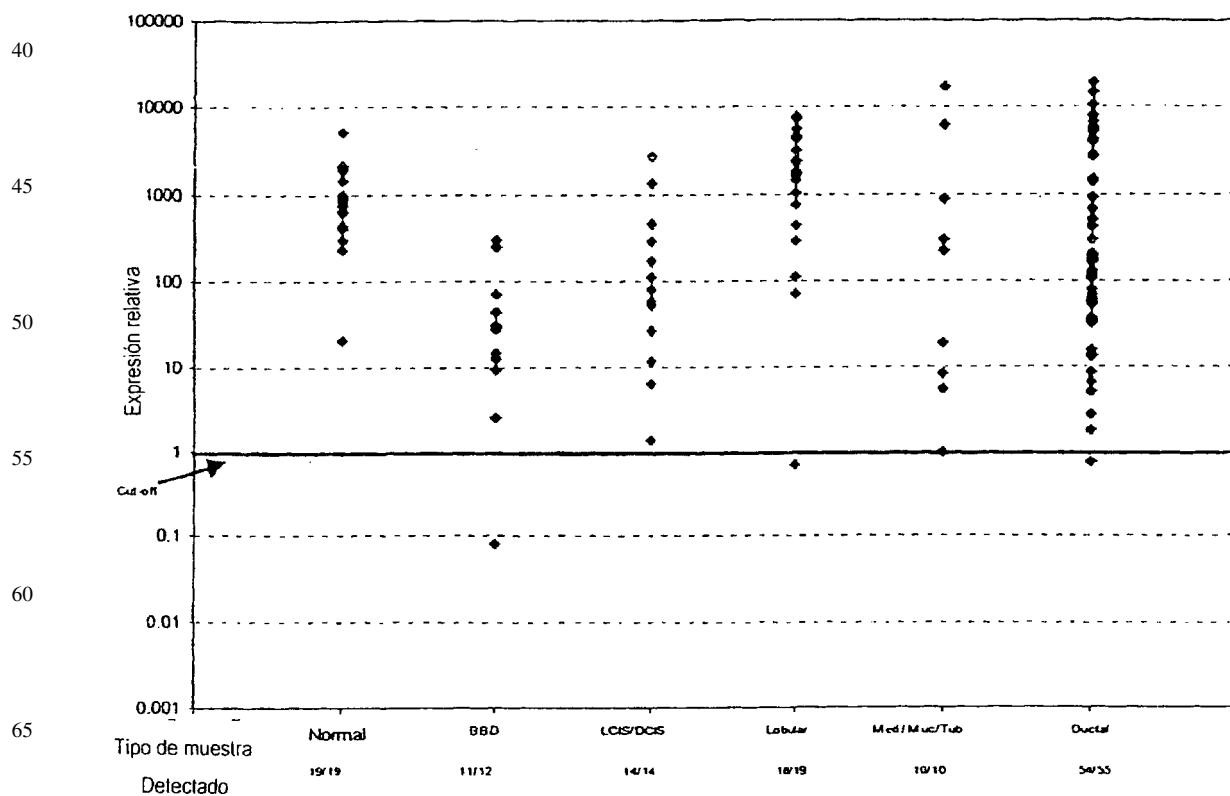


TABLA 8

Expresión de mamaglobina y B305D en diferentes tipos de células de mama



ES 2 310 275 T3

Ejemplo 5

RT-PCR rápida de ARN purificado

5 ARN transcripto *in vitro* con mamaglobina (100.000 copias) se diluyó en 20 ng con ARN de células blancas de sangre y se sometió a amplificación por RT-PCR en una etapa en un ciclador Cepheid Smart II en una mezcla de reacción que contenía lo siguiente: Bicina/KOH 50 mM pH 8,2, acetato potásico 115 mM, 8% v/v de glicerol, 0,2 mg/ml de BSA, trehalosa 150 mM, 0,2% v/v de Tween 20, tris-Cl 0,2 mM pH 8, MnSO₄ 3,5 mM, dATP 0,3 mM, dCTP 0,3 mM, dGTP 0,3 mM, TTP 0,3 mM, 100 U/ml de Tth, 20 ug/ml de anticuerpo TP6-25,3, 0,45 uM de escorpión de mamaglobina y 0,5 uM de cebador de mamaglobina.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes (el asterisco denotaba la porción del ciclo en la que se midió la fluorescencia):

15 Condición A: 95°C durante 3 s, 60°C durante 7 min, 70°C durante 2 min, luego 40 ciclos de: 95°C durante 3 s, 54°C durante 6 s* y 68°C durante 6 s; tiempo total = 34 min.

20 Condición B: 95°C durante 3 s, 60°C durante 3 min, luego 40 ciclos de: 95°C durante 3 s, 54°C durante 6 s* y 68°C durante 6 s; tiempo total = 29 min.

25 Condición C: 95°C durante 3 s, 60°C durante 3 mi, luego 40 ciclos de: 95°C durante 3 s, 58°C durante 6 s* y 68°C durante 6 s; tiempo total = 26 min.

Los resultados de este ensayo se presentan en la tabla siguiente.

Condición	Molde	Ct medio	Tiempo total de ensayo, min
A	IVT-ARN	30,47	34,00
A	NT	50,00	"
B	IVT-ARN	30,26	29,00
B	NT	50,00	"
C	IVT-ARN	31,15	26,00
C	NT	50,00	"

45 Como se puede deducir de estos datos, la reducción de la duración de la etapa de transcripción inversa de 9 a 3 min no tiene un impacto discernible sobre el comportamiento del ensayo. El aumento de la temperatura de anillamiento a 58°C tiene sólo un impacto mínimo de amplificación y reduce el tiempo total de RT-PCR a 26 min. Se pueden realizar más reducciones del tiempo del ciclo por construcción del cebador y la sonda con temperaturas óptimas de ensayo más altas.

Ejemplo 6

Ensayo de RT-PCR multiplex rápido para detección de metástasis de ganglios linfáticos (profético)

55 En este ejemplo se somete a amplificación por RT-PCT en una etapa, en un ciclador II Cepheld Smart II, ARN de ganglio linfático purificado (>100 ng de ARN total por 100 ul de reacción utilizado para reducir el número total de ciclos requerido para generar un resultado positivo). La mezcla de reacción contiene los componentes siguientes: Bicina/KOH 50 mM pH 8,2, acetato potásico 115 mM, 8% v/v de glicerol, 0,2 mg/ml de BSA, trehalosa 150 mM, 0,2% v/v de Tween 20, Tris-Cl 0,2 mM pH 8, MnSO₄ o acetato de Mn 3,5 mM, dATP 0,3 mM, dCTP 0,3 mM, dGTP 0,3 mM, TTP 0,3 mM, 100 U/ml de Tth, 20 ug/ml de anticuerpo TP6-25,3, 0,4-0,8 uM de cada escorpión ny cebador. Las secuencias de escorpión y cebador están diseñadas de manera que se minimizan acontecimientos de imprimación no específicos y de manera que son compatibles con la amplificación/detección múltiple con el siguiente perfil de RT-PCR rápido:

65 95°C durante 3 s, 60°C durante 3 min, luego 32 ciclos de: 95°C durante 1 s, 65°C durante 6 s* y 72°C durante 3 s - tiempo total de amplificación = 16 min.

ES 2 310 275 T3

Se utiliza el procedimiento de preparación rápida de muestras descrito, que tiene una duración < 4 min para completarse.

5 Para la detección de metástasis de cáncer de mama a ganglios linfáticos se amplifican los genes siguientes mam-
maglobina, B305D y PBGD. La señal de mammaglobina y/o B305D es indicativa de metástasis, mientras que PBGD
se utiliza como gen doméstico. En este ejemplo, los valores de Ct para ganglios linfáticos cáncer-positivos varían de
12 a 30 para mammaglobina y de 12 a 28 para B305D; la detección de cualquiera de los genes en este intervalo de Ct
es indicativa de un ganglio linfático cáncer-positivo. En este ejemplo, los valores de Ct para el gen de control PBGD
10 deben estar en el intervalo de 24-23 ciclos para considerar válido un resultado cáncer-negativo.

10 Para la detección de metástasis de cáncer de melanoma a ganglios linfáticos se utilizan las mismas condiciones, con
las excepciones siguientes: (1) se procesan ganglios linfáticos sospechosos de contener melanoma y (2) se amplifican
los genes siguientes: MART1, tirosinasa y PBGD. La señal de PBGD y/o tirosinasa es indicativa de metástasis de
15 melanoma a los ganglios linfáticos, mientras que PBGD se utiliza como gen doméstico. En este ejemplo, los valores
de Ct para ganglios linfáticos cáncer-positivos varían de 18 a 30 para tirosinasa y de 12 a 27 para MART 1; la detección
de cualquiera de los genes en este intervalo es indicativo de un ganglio linfático cáncer-positivo. En este ejemplo, los
valores de Ct del gen de control PBGD deben estar en el intervalo de 24-30 ciclos con el fin de considerar válido un
20 resultado cáncer negativo

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para realizar un ensayo diagnóstico intraoperativo, que comprende las etapas de: analizar una muestra de tejido de ganglio linfático de un paciente por extracción de ARN del ganglio linfático; amplificar y detectar el ácido nucleico; y determinar si la presencia de más de un marcador excede un valor de corte, en el que el mencionado ARN se extrae en menos de 8 minutos y en el que el procedimiento se realiza en un período de no más de 35 minutos.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el mencionado ARN se extrae en menos de 6 minutos.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 para uso en la detección de micrometástasis.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 para uso en la detección de metástasis de cáncer de mama.
- 15 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los marcadores detectan la expresión de un gen que corresponde a la SEC ID n°.17 y uno o más del grupo constituido por las SEC ID n°. 14-16 y la SEC ID n° 18.
- 20 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la amplificación y detección del ácido nucleico se realiza por PCR.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la mencionada PCR es RT-PCR.
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la reacción de transcripción inversa se realiza en menos de 9 minutos.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la reacción de transcripción inversa se realiza en aproximadamente 3 minutos.
- 30 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que a la reacción de transcripción inversa se añaden uno o más reactivos de control interno.
- 35 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el ARN se extrae de la muestra de ganglio linfático:
- (a) lisando las células que contienen el ARN de interés y produciendo un homogeneizado de ellas,
 - (b) opcionalmente, diluyendo el homogeneizado,
 - 40 (c) poniendo en contacto la muestra de trabajo homogeneizada, humedecida, con un sustrato que contiene o al que está fijado un material al que se une el ARN,
 - (d) dejando que la muestra se una al sustrato,
 - 45 (e) eliminando contaminantes y sustancias que interfieren,
 - (f) secando el sustrato y
 - 50 (g) eluyendo el ARN del sustrato, y
- utilizando la filtración en las etapas de extracción.
- 55
- 60
- 65

ES 2 310 275 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Johnson & Johnson
Atkins, David
Backus, John
Belly, Robert
Rosen, Steven
White, Robert
- 10 <120> ENSAYO NO OPERATIVO DE GANGLIO LINFÁTICO
- <130> CDS 5009
- 15 <160> 35
- <170> PatentIn versión 3.1
- 20 <210> 1
<211> 23
<212> ADN
25 <213> Artificial
- <220>
<223> La secuencia artificial es un cebador
- 30 <400> 1
- atgactgcct tgcctcctca gta 23
- 35 <210> 2
<211> 26
<212> ADN
40 <213> Artificial
- <220>
<223> La secuencia artificial es un cebador
- 45 <400> 2
- ggctgttgcct tggacttctc taaaga 26
- 50 <210> 3
<211> 29
<212> ADN
55 <213> Artificial
- <220>
<223> La secuencia artificial es un cebador
- 60 <400> 3
- caaacggatg aaactctgag caatgttga 29
- 65 <210> 4
<211> 24

ES 2 310 275 T3

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> la secuencia artificial es un cebador

<400> 4

10 tctgtgagcc aaaggtcttg caga 24

<210> 5
15 <211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> La secuencia artificial es un cebador

<400> 5

25 ggccaacaaa gctcaggaca aca 23

<210> 6
30 <211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> La secuencia artificial es un cebador

<400> 6

40 gcagtgactt cgtcatttgg acagta 25

<210> 7
45 <211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> La secuencia artificial es un cebador

<400> 7

55 tgttatgca attaatatat gacagcagtc ttgtg 36

<210> 8
60 <211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

65 <220>
<223> La secuencia artificial es un cebador

ES 2 310 275 T3

	<400> 8	
	catcttcatg ctgggcaggg	20
5	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> La secuencia artificial es un cebador	
15	<400> 9	
	catcttcatgctgggcaggg	20
20	<210> 10	
	<211> 29	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> La secuencia artificial es un cebador	
30	<400> 10	
	ctgaggcacc tggaaggagg ctgcagtgt	29
35	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> La secuencia artificial es un cebador	
45	<400> 11	
	tctgataaag gccgtacaatg	21
50	<210> 12	
	<211> 22	
	<212> ADN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> La secuencia artificial es un cebador	
60	<400> 12	
	tcacgacttg ctgttttc tc	22
65	<210> 13	
	<211> 26	

ES 2 310 275 T3

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> La secuencia artificial es un cebador

<400> 13

10

atcaaaaaaac aagcatggcctacacc

26

<210> 14

15 <211> 1155

<212> ADN

<213> Humano

20 <400> 14

25	atgggtggttg aggttgattc catgccggct gcctcttctg tgaagaagcc atttggtctc	60
30	aggagcaaga tgggcaagtg gtgctgccgt tgcttcccct gctgcagggg gagcggcaag	120
35	agcaacgtgg gcacttctgg agaccacgac gactctgcta tgaagacact caggagcaag	180
40	atgggcaagt ggtgccgcca ctgcttcccc tgctgcaggg ggagtggcaa gagcaacgtg	240
45	ggcgcttctg gagaccacga cgactctgct atgaagacac tcaggaacaa gatgggcaag	300
50	tggtgctgcc actgcttccc ctgctgcagg gggagcagca agagcaaggt gggcgcttgg	360
55	ggagactacg atgacagtgc ctatcatggag cccaggtacc acgtccgtgg agaagatctg	420
60	gacaagctcc acagagctgc ctgggtgggt aaagtcccca gaaaggatct catcgtcattg	480
65	ctcagggaca ctgacgtgaa caagcaggac aagcaaaaga ggactgctct acatctggcc	540
70	tctgccaatg ggaattcaga agtagtaaaa ctcttctgctg acagacgatg tcaacttaat	600
75	gtccttgaca acaaaaagag gacagctctg ataaaygccg tacaatgcca ggaagatgaa	660
80	tgtgctgtaa tgttgctgga acatggcact gatccaaata ttccagatga gtatggaaat	720
85	accactctgc actacgctat ctataatgaa gataaattaa tggccaaagc actgctctta	780
90	tatggtgctg atatcgaatc aaaaaacaag catggcctca caccactggt acttgggtgta	840
95	catgagcaaa aacagcaagt cgtgaaattt ttaattaaga aaaaagcgaa tttaaatgca	900
100	ctggatagat atggaaggac tgctctcata ctgctgtat gttgtggatc agcaagtata	960
105	gtcagccttc tacttgagca aaatatgat gtatcttctc aagatctatc tggacagacg	1020
110	gccagagagt atgctgtttc tagtcatcat catgtaattt gccagttact ttctgactac	1080
115	aaagaaaaac agatgctaaa aatctcttct gaaaacagca atccagaaaa tgtctcaaga	1140
120	accagaaata aataa	1155

<210> 15

65 <211> 3865

<212> ADN

<213> Humano

ES 2 310 275 T3

<400> 15

	tccgagctga	ttacagacac	caaggaagat	gctgtaaaga	gtcagcagcc	acagccctgg	60
5	ctagctggcc	ctgtgggcat	ttattaqtaa	agttttaatg	acaaaagctt	tgagtcaaca	120
	cacccgtggg	taattaacct	ggtcaccccc	accctggaga	gccatcctgc	ccatgggtga	180
	tcaaagaagg	aacatctgca	ggaacacctg	atgaggctgc	acccttggcg	gaaagaacac	240
	ctgacacagc	tgaaagcttg	gtggaaaaaa	cacctgatga	ggctgcaccc	ttggtggaaa	300
10	gaacacctga	cacggctgaa	agcttgggtg	aaaaaacacc	tgatgaggct	gcacacctgg	360
	tggagggaac	atctgacaaa	atccaatggt	tggagaaagc	gacatctgga	aagttcgaac	420
	agtcagcaga	agaaacacct	agggaaatta	cgagtccctg	aaaagaaaca	tctgagaaat	480
15	ttacgtggcc	agcaaaagga	agaccctagga	agatcgcctg	ggagaaaaaa	gaagacacac	540
	ctagggaat	tatgagtccc	gcaaaagaaa	catctgagaa	atttacgtgg	gcagcaaaag	600
	gaagacctag	gaagatcgca	tgggagaaaa	aagaaacacc	tgtaaagact	ggatgcgtgg	660
20	caagagtaac	atctaataaa	actaaagttt	tggaaaaagg	aagatctaag	atgattgcat	720
	gtcctacaaa	agaatcatct	acaaaagcaa	gtgccaatga	tcagaggttc	ccatcagaat	780
	ccaaacaaga	ggaagatgaa	gaatattcct	gtgattctcg	gagtcctctt	gagagttctg	840
25	caaagattca	agtgtgtata	cctgagctca	tatatcaaaa	agtaatggag	ataaatagag	900
	aagtagaaga	gcctcctaag	aagccatctg	cctccaagcc	tgccattgaa	atgcaaaact	960
	ctgttccaaa	taaagccttt	gaattgaaqa	atgaacaaac	attgagagca	gatccgatgt	1020
30	tcccaccaga	atccaaaaca	aaggactatg	aagaaaattc	ttgggattct	gagagtctct	1080
	gtgagactgl	ttcacagaag	gatgtgtgtt	taccaaggc	tacacatcaa	aaagaaataq	1140
	ataaaataaa	tggaaaatla	gaagagtctc	ctaataaaga	tggctctctg	aaggctacct	1200
35	gcggaatgaa	agtttctatt	ccaactaaag	ccttagaatt	gaaggacatg	caaaactttca	1260
	aagcaqagcc	tccggggaag	ccatctgcct	tcgagcctgc	cactgaaatg	caaaagtctg	1320
	tcccaataaa	agccttggaa	ttgaaaaalg	aacaaacatt	gagagcagat	gagatactcc	1380
40	catcagaatc	caaacaaaag	gactatgaag	aaagttcttg	ggattctgag	agtcctctgtg	1440
	agactgtttc	acagaaggat	gtgtgtttac	ccaaggcttc	rcatcaaaaa	gaaatagata	1500
	aaataaatgg	aaaattagaa	gggtctcctg	ttaaagatgg	tcttctgaag	gctaactgctg	1560
45	gaatgaaagt	ttctattcca	actaaagcct	tagaattgat	ggacatgcaa	actttcaag	1620
	cagagcctcc	cgagaagcca	tctgccttcg	agcctgccal	tgaaalgcaa	aagtcctgttc	1680
50	caaataaagc	cttgggaattg	aagaatgaac	aaacattgag	agcagatgag	atactcccat	1740
	cagaatccaa	acaaaaggac	tatgaagaaa	gttcttggga	ttctgagagt	ctctgtgaga	1800
	ctgtttcaca	gaaggatgtg	tgtttaccca	aggctrcrca	tcaaaaagaa	atagataaaa	1860
55	taaatygaaa	attagaagag	tctcctgata	atgatggttl	tclgaaggct	ccctgcagaa	1920
	tgaagttttc	tattccaact	aaagcctlag	aattgalgga	calgcaaact	ttcaaaqcag	1980
	agcctcccga	gaagccatct	gccttcgagc	ctgccattga	aatgcaaaag	tctgttccaa	2040
60	ataaagcctt	ggaattgaaq	aatgaacaaa	cattgagagc	agatcagatg	ttcccttcag	2100
	aatcaaaaca	aaagaasgtt	gaagaaaatt	cttgggattc	tgagagtctc	cgtgagactg	2160
	tttcacagaa	ggatgtgtgt	gtacccaagg	ctacacatca	aaaagaaatg	gataaaataa	2220
65	gtggaaaalt	agaagattca	actagcctat	caaaaatctt	ggatacagtt	cattctctgtg	2280
	aaagagcaag	ggaacttcaa	aaagatcact	gtgaacaacg	tacaggaaaa	atggaaacaaa	2340

ES 2 310 275 T3

	tgaaaaagaa gttttgtgta ctgaaaaaga aactgtcaga agcaaaagaa ataaaatcac	2400
	agttagagaa ccaaaaagtt aaatgggaac aagagctctg cagtgtgaga ttgactttaa	2460
5	accaagaaga agagaagaga agaaatgccg atatattaaa tgaaaaaatt agggaagaat	2520
	taggaagaat cgaagagcag cataggaaag agttagaagt gaaacaaca cttgaacagg	2580
10	ctctcagaat acaagatata gaattgaaga gtgtagaaag taatttgaat caggtttctc	2640
	acactcatga aaatgaaaat tatctcttac atgaaaattg catgttgaaa aaggaaattg	2700
	ccatgctaaa actggaaata gccacactga aacaccaata ccaggaaaag gaaaataaat	2760
15	actttgagga cattaagatt ttaaaagaaa agaatgctga acttcagatg accctaaaac	2820
	tgaaagagga atcattaact aaaagggcat ctcaatatag tgggcagctt aaagtctga	2880
20	tagctgagaa cacaatgctc acttctaaat tgaaggaaaa acaagacaaa gaaatactag	2940
	aggcagaaat tgaatcacac catcctagac tggcttctgc tgtacaagac catgatcaaa	3000
	ttgtgacatc aagaaaaagt caagaacctg cttccacat tgcaggagat gcttgtttgc	3060
25	aaagaaaaat gaatgttgat gtgagtagta cgatatataa caatgaggtg ctccatcaac	3120
	cactttctga agctcaaagg aaatccaaaa gcctaaaaat taatctcaat tatgcmggag	3180
30	atgctctaag agaaaataca ttggtttcag aacatgcaca aagagaccaa cgtgaaacac	3240
	agtgtcaaat gaaggaagct gaacacatgt atcaaaacga acaagataat gtgaacaaac	3300
	acactgaaca gcaggagtct ctagatcaga aattatttca actacaaagc aaaaatatgt	3360
35	ggcttcaaca gcaattagtt catgcacata agaaagctga caacaaaagc aagataacaa	3420
	ttgatattca ttttcttgag aggaaaatgc aacatcatct cctaaaagag aaaaatgagg	3480
40	agatatttaa ttacaataac catttaaaaa accgtatata tcaatatgaa aaagagaaag	3540
	cagaaacaga aaactcatga gagacaagca gtaagaaact tcttttgag aaacaacaga	3600
45	ccagatcttt actcacaact catgctagga ggccagtcct agcatcacct tatgttgaaa	3660
	atcttaccaa tagtctgtgt caacagaata cttattttag aagaaaaatt catgatttct	3720
	tcctgaagcc tacagacata aaataacagt gtgaagaatt acttgttcac gaattgcata	3780
50	aagctgcaca ggattcccat ctaccctgat gatgcagcag acatcattca atccaaccag	3840
	aatctcgctc tgtcactcag gctgg	3865
55	<210> 16	
	<211> 3282	
	<212> ADN	
60	<213> Humano	

65

ES 2 310 275 T3

<400> 16

	gggacagggc tgaggatgag gagaaccctg gggacccaga agaccgtgcc ttgcccggaa	60
5	gtcctgcctg taggcctgaa ggacttgccc taacagagcc tcaacaacta cctggtgatt	120
	cctacttcag ccccttgggtg tgagcagctt ctcaacatga actacagcct ccaacttgcc	180
10	ttcgtgtgtc tgagtctctt cactgagagg atgtgcatcc aggggagtca gttcaacgtc	240
	gaggtcggca gaagtgacaa gctttccctg cctggctttg agaaccctcac agcaggatal	300
	aacaaatttc tcaggcccaa ttttggtgga gaaccctgac agatagcgtc gactctggac	360
15	attgcaagta tctctagcat ttcagagagt aacatggact acacagccac catatacctc	420
	cgacagcgtc qgatggacca gcggtgggtg tttgaaggca acaagagctt cactctggat	480
20	gcccgcctcg tggagtctct ctgggtgccca gatacttaca ttgtggagtc caagaagtcc	540
	ttctccatg aagtcactgt gggaaacagg ctcatccgcc tcttctccaa tggcacggtc	600
	ctglatgccr tcagaatcac gacaactgtt gcattgtaaca tggatctgtc taaatcccc	660
25	atggacacac agacatgcaa gttgcagctg gaaagctggg gctatgatgg aatgatgtg	720
	gagttcacct ggctgagagg gaacgactct gtgcgtggac tggaacacct gcggcttgc	780
30	cagtacacca taqagcggta tttcacctta gtcaccagat cgcagcagga gacaggaat	840
	tacactagat tggctcttaca gtttgagctt cggaggaatg tctgtattt cattttggaa	900
	acctacgttc ctccacttt cctggtgggtg ttgtcctggg tttcattttg gatctctctc	960
35	gattcagtc ctcgaagaac ctgcattgga gtgacgaccg tgttatcaat gaccacactg	1020
	atgalcgggt cccgcacttc tcttcccaac accaactgct tcatcaaggc catcgatgtg	1080
40	tacctgggga tctgclttag ctltgtgttl ggggccltgc tagaalatgc agttgctcac	1140
	tacagttcct tacagcagat ggcagccaaa gataggggga caacaaagga agtagaagaa	1200
	gtcagtatta ctaatatcat caacagctcc atctccagct ttaaacygaa gatcagcttt	1260
45	gccagcattg aaatttccag cgacaacggt gactacagtg acttgacaat gaaaaccagc	1320
	gacaagttca agtttqtctt ccgagaaaag atgggcagga ttggtgatta tttcacatll	1380
	caaaacccca gtaatgttga tcactattcc aaactactgt ttcctttgat ttttatgcta	1440
50	gccaatgtat tttactgggc atactacatg tttttttgag tcaatgttaa atttcttgca	1500
	tgccataggt ctccaacagg acaagataat gatgtaaatg gtatttttagg ccaagtgtgc	1560
55	accacatcc aatggtgcta caagtgactg aaataatatt tgagtctttc tgctcaaaga	1620
	atgaagctcc aaccattglt ctaagctgtg tagaagctct agcattatag gatcttgtaa	1680
	tagaaacatc agtccattcc tctttcatct taatcaagga catlcccatg gagcccaaga	1740
60	tlacaaatgt actcagggct gtttatctcg tggctccctg gtttgcattt acctcatata	1800
	aagaatggga aggagaccat tgggtaaccc tcaagtgtca gaagttgtll ctaaaglaac	1860
65	tatacatgtt tttfactaaa tctctgcagt gcttataaaa tacattgttg cctatttagg	1920

ES 2 310 275 T3

gagtaacatt ttctagtttt tgtttctggt taaaatgaaa tatgggctta tgtcaattca 1980
 ttggaagtca atgcactaac tcaataccaa gatgagtttt taaataatga atattattta 2040
 5 ataccacaac agaattatcc ccaatttcca ataagtccta tcattgaaaa ttcaaatata 2100
 agtgaagaaa aaattagtag atcaacaatc taaacaaatc cctcggttct aagatacaat 2160
 10 ggattccccca tactggaagg actctgaggc tttattcccc cactatgcat atcttatcat 2220
 tttattatta tacacacatc catectaaac tataactaaag cccttttccc atgcatggat 2280
 15 ggaaatggaa gatttttttg taacttgttc tagaagtctt aatatgggct gttgccatga 2340
 aggcttgagc aattgagtc attttctagc tgcctttatt cacatagtgga tggggacta 2400
 aaagtactgg gttgactcag agagtcgctg tcattctgtc attgctgcta ctctaact 2460
 20 gagcaacact ctcccagtg cagatccct gtatcatcc aagaggagca ttcatccctt 2520
 tgctctaata atcaggaatg atgcttatta gaaaacaaac tgcttgaccc aggaacaagt 2580
 25 ggcttagctt aagtaaactt ggctttgctc agatccctga tccttccagc tggctctgctc 2640
 tgagtggctt atcccgcag agcaggagcg tgctggcct gagtactgaa ctttctgagt 2700
 aacaatgaga cacgttacag aacctatgtt cagggtgcgg gtgagctgcc ctctccaaat 2760
 30 ccagccagag atgcacattc ctcgccagc ctccagcaac agtaccacaaa gtgatttttg 2820
 agtgtgccag ggtaaaggct tccagttcag cctcagttat tttagacaat ctcgccatct 2880
 35 ttaatttctt agcttctgt tctaataaat gcacggcttt acctttctctg tcagaaataa 2940
 accaaggctc taaaagatga tttcccttct gtaactccct agagccacag gttctcattc 3000
 cttttcccat tatacttctc acaattcagt ttctatgagt ttgatcaact gattttttta 3060
 40 acaaaatatt tctaacggga atgggtggga gtgctggtga aaagagatga aatgtggttg 3120
 tatgagccaa tcatatttgt gattttttta aaaaagttta aaaggaaata tctgttctga 3180
 45 aaccccactt aagcattgtt tttatataaa aacaatgata aagatgtgaa ctgtgaaata 3240
 aatataccat attagctacc caccaaaaaa aaaaaaaaaa aa 3282

50 <210> 17
 <211> 503
 <212> ADN
 55 <213> Humano

60

65

ES 2 310 275 T3

<400> 17

```

5      gacagcggct tccttgatcc ttgccacccg cgactgaaca ccgacagcag cagcctcacc      60
      atgaagttgc tgatggctcc catgctggcg gccctctccc agcactgcta cgcaggctct      120
      ggctgcccct tattggagaa tgtgatttcc aagacaatca atccacaagt gtctaagact      180
10     gaatacaaag aacttcttca agagttcata gacgacaatg ccactacaaa tgccatagat      240

```

```

15     gaattgaagg aatgttttct taaccaaacg gatgaaactc tgagcaatgt tgaggtgttt      300
      atgcaattaa tatatgacag cagtctttgt gatttatttt aactttctgc aagacctttg      360
      gctcacagaa ctgcagggta tggtgagaaa ccaactacgg attgctgcaa accacacctt      420
20     ctctttctta tgtcttttta ctacaaacta caagacaatt gttgaaacct gctatacatg      480
      tttattttta taaattgatg gca                                          503

```

```

25     <210> 18
      <211> 503
      <212> ADN
30     <213> Humano

```

<400> 18

```

35     gacagcggct tccttgatcc ttgccacccg cgactgaaca ccgacagcag cagcctcacc      60
      atgaagttgc tgatggctcc catgctggcg gccctctccc agcactgcta cgcaggctct      120
40     ggctgcccct tattggagaa tgtgatttcc aagacaatca atccacaagt gtctaagact      180
      gaatacaaag aacttcttca agagttcata gacgacaatg ccactacaaa tgccatagat      240
      gaattgaagg aatgttttct taaccaaacg gatgaaactc tgagcaatgt tgaggtgttt      300
45     atgcaattaa tatatgacag cagtctttgt gatttatttt aactttctgc aagacctttg      360
      gctcacagaa ctgcagggta tggtgagaaa ccaactacgg attgctgcaa accacacctt      420
50     ctctttctta tgtcttttta ctacaaacta caagacaatt gttgaaacct gctatacatg      480
      tttattttta taaattgatg gca                                          503

```

```

55     <210> 19
      <211> 1793
      <212> ADN
      <213> Humano
60

```

65

ES 2 310 275 T3

<400> 19

	cgcgctccgcc ccgcgagcac agagcctcgc ctttgccgat ccgcccgcgcg tccacaccccg	60
5	ccgccagctc accatggatg atgatatcgc cgcgctcgtc gtcgacaacg gctccggcat	120
	gtgcaaggcc ggcttcgcgg gcgacgatgc cccccggcc gtcttccctt ccatacgtggg	180
	gcgccccagg caccaggcgg tgatggtggg catgggtcag aaggattcct atgtgggcga	240
10	cgaggcccag agcaagagag gcatcctcac cctgaagtac cccatcgagc acggcatcgt	300
	caccaactgg gacgacatgg agaaaatctg gcaccacacc ttctacaatg agctgcgtgt	360
15	ggctcccag gagcaccctg tgctgtgac cgaggccccc ctgaacccca aggccaaccg	420
	cgagaagatg acccagatca tgtttgagac ctcaacacc ccagccatgt acgttgctat	480
	ccaggctgtg ctatccctgt acgcctctgg ccgtaccact ggcatcgtga tggactccgg	540
20	tgacggggtc acccacactg tgccatcta cgaggggtat gccctcccc atgccatcct	600
	gcgtctggac ctggctggcc gggacctgac tgactacctc atgaagatcc tcaccgagcg	660
25	cggtacagc ttcaccacca cggccgagcg ggaaatcgtg cgtgacatta aggagaagct	720
	gtgtacgtc gccctggact tcgagcaaga gatggccacg gctgcttcca gctcctcctt	780
	ggagaagagc tacgagctgc ctgacggcca ggcatcacc attggcaatg agcggttccg	840
30	ctgccctgag gcactcttcc agccttcctt cctgggcatg gagtctgtg gcatccacga	900
	aactacctt aactccatca tgaagtgtga cgtggacatc cgcaaagacc tgtacgcaa	960
35	cacagtgtc tctggcggca ccaccatgta ccctggcatt gccgacagga tgcagaagga	1020
	gatcactgcc ctggcaccga gcacaatgaa gatcaagatc attgctctc ctgagcgcga	1080
	gtactccgtg tggatcggcg gctccatcct ggcctcgtg tccaccttc agcagatgtg	1140
40	gatcagcaag caggagtatg acgagtccgg cccctccatc gtccaccgca aatgcttcta	1200
	ggcggactat gacttagttg cgttacaccc tttcttgaca aaacctaaact tgcgcagaaa	1260
45	acaagatgag attggcatgg ctttatttgt tttttttgtt ttgttttggg tttttttttt	1320
	tttttgctt gactcaggat ttaaaaactg gaacgggtgaa ggtgacagca gtcggttgga	1380
	gcgagcatcc cccaaagtcc acaatgtggc cgaggacttt gattgcacat tgtttgtttt	1440
50	ttaatagtca ttccaaatat gagatgcatt gttacaggaa gtccttgcc atcctaaaag	1500
	ccacccact tctctctaag gagaatggcc cagtcctctc ccaagtccac acaggggagg	1560
55	tgatagcatt gctttcgtgt aaattatgta atgcaaaatt tttttaatct tcgccttaat	1620
	acttttttat tttgttttat tttgaatgat gagccttcgt gccccctt cccccctttt	1680
	gtcccccaac ttgagatgta tgaaggcttt tggctctcct gggagtgggt ggaggcagcc	1740
60	agggcttacc tgtacactga cttgagacca gttgaataaa agtgcacacc tta	1793

<210> 20

65 <211> 1377

<212> ADN

<213> Humano

ES 2 310 275 T3

<400> 20

5	cacacagcct actttccaag cggagccatg tctggtaacg gcaatgcggc tgcaacggcg	60
	gaagaaaaca gcccaaagat gagagtgatt cgcgtgggta cccgcaagag ccagcttgct	120
	cgcatacaga cggacagtgt ggtggcaaca ttgaaagcct cgtaccctgg cctgcagttt	180
10	gaaatcattg ctatgtccac cacaggggac aagattcttg atactgcact ctctaagatt	240
	ggagagaaaa gcctgtttac caaggagctt gaacatgccc tggagaagaa tgaagtggac	300
15	ctggttgctc actccttgaa ggacctgccc actgtgcttc ctctggctt caccatcggg	360
	gccatctgca agcgggaaaa ccctcatgat gctggtgtct ttcacccaaa atttggtggg	420
20	aagaccctag aaacctgccc agagaagagt gtggtgggaa ccagctccct gcgaagagca	480
	gcccagctgc agagaaagtt cccgcactctg gagttcagga gtattcgggg aaacctcaac	540
25	acccggcttc ggaagctgga cgagcagcag gagttcagtg ccatcatcct agcaacagct	600
	ggcctgcagc gcatgggctg gcacaaccgg gtggggcaga tctgcacccc tgagaaatgc	660
30	atgtatgctg tgggccaggg ggccttgggc gtggaagtgc gagccaagga ccaggacatc	720
	ttggatctgg tgggtgtgct gcacgatccc gagactctgc ttcgctgcat cgctgaaagg	780
35	gccttcctga ggcacctgga aggaggctgc agtgtgccag tagccgtgca tacagctatg	840
	aaggatgggc aactgtacct gactggagga gtctggagtc tagacggctc agatagcata	900
40	caagagacca tgcaggctac catccatgtc cctgcccagc atgaagatgg cctgaggat	960
	gaccacagt tggtaggcat cactgctcgt aacattccac gagggcccca gttggctgcc	1020
45	cagaacttgg gcatcagcct ggccaacttg ttgctgagca aaggagccaa aaacatcctg	1080
	gatgttgcac ggcagcttaa cgatgcccat taactggttt gtggggcaca gatgcctggg	1140
50	ttgctgctgt ccagtgccta catcccgggc ctcaagtccc cattctcact gctatctggg	1200
	gagtgattac cccgggagac tgaactgcag ggttcaagcc ttccagggat ttgcctcacc	1260
55	ttggggcctt gatgactgcc ttgcctcctc agtatgtggg ggcttcatct ctttagagaa	1320
	gtccaagcaa cagcctttga atgtaaccaa tctactaat aaaccagttc tgaaggt	1377

55 <210> 21
 <211> 1524
 <212> ADN
 <213> Humano

60

65

ES 2 310 275 T3

<400> 21

5	agcagacaga ggactctcat taaggaaggt gtcctgtgcc ctgaccctac aagatgccaa	60
	gagaagatgc tcacttcac tcacttcac tatggttacc ccaagaaggg gcacggccac tcttacacca	120
	cggtgaaga ggccgctggg atcggcatcc tgacagtgat cctgggagtc ttactgctca	180
10	tccgctgttg gtattgtaga agacgaaatg gatacagagc cttgatggat aaaagtcttc	240
	atggtggcac tcaatgtgcc ttaacaagaa gatgcccaca agaagggttt gatcatcggg	300
15	acagcaaagt gtctcttcaa gagaaaaact gtgaacctgt ggttccaat gctccacctg	360
	cttatgagaa actctctgca gaacagtcac caccacctta ttcaccttaa gagccagcga	420
	gacacctgag acatgctgaa attatctctc tcacactttt gcttgaattt aatacagaca	480
20	tctaagtctc tcctttggaa tgggtgtagga aaaatgcaag ccatctctaa taataagtca	540
	gtgttaaaat tttagtaggt ccgctagcag tactaatcat gtgaggaaat gatgagaaat	600
25	attaaattgg gaaaactcca tcaataaatg ttgcaatgca tgatactatc tgtgccagag	660
	gtaatgtag taaatccatg gtgttatctt ctgagagaca gaattcaagt gggattctg	720
30	gggccatcca atttctcttt acttgaaatt tggctaataa caaactagtc aggttttcga	780
	accttgaccg acatgaactg tacacagaat tgttccagta ctatggagtg ctccaaaagg	840
	atacttttac aggttaagac aaagggttga ctggcctatt tatctgatca agaacatgtc	900
35	agcaatgtct ctttgtgctc taaaattcta ttatactaca ataatatatt gtaaagatcc	960
	tatagctctt tttttttgag atggagtctt gcttttgttg cccaggctgg agtgcaatgg	1020
40	cgcgatcttg gctcaccata acctccgcct cccaggttca agcaattctc ctgccttagc	1080
	ctcctgagta gctgggatta caggcgtgcg ccactatgcc tgactaattt tgtagtttta	1140
	gtagagacgg ggtttctcca tgttggtcag gctggctca aactcctgac ctccaggtgat	1200
45	ctgcccgcct cagcctccca aagtgctgga attacaggcg tgagccacca cgccctggctg	1260
	gatcctatat cttaggtaag acatataacg cagtctaatt acatttcaact tcaaggctca	1320
50	atgctattct aactaatgac aagtattttc tactaaacca gaaattggta gaaggattta	1380
	aataagtaaa agctactatg tactgcctta gtgctgatgc ctgtgtactg ccttaaatgt	1440
55	acctatggca atttagctct cttgggttcc caaatccctc tcacaagaat gtgcagaaga	1500
	aatcataaag gatcagagat tctg	1524

60

65

ES 2 310 275 T3

<210> 22

<211> 2384

<212> ADN

5 <213> Humano

<400> 22

```

10      tattgagttc ttcaaacatt gtagcctctt tatggctctt gagaaataac taccttaaac      60
        ccataatctt taataacttcc taaactttct taataagaga agctctattc ctgacactac      120
15      ctctcatttg caagggtcaaa tcatcattag ttttgtagtc tattaactgg gtttgcttag      180
        gtcaggcatt attattacta accttattgt taatattcta accataagaa ttaaactatt      240
        aatgggtgaal agagtttttc actttaacat aggcctatcc cactgggtggg atacgagcca      300
20      attcgaaaga aaagtcagtc atgtgctttt cagaggatga aagcltaaga taaagactaa      360
        aagtgttlga tgctggaggt gggagtggta ttatataggt ctgagccaag acatgtgata      420
25      atcactgtag tagtagctgg aaagagaaat ctgtgactcc aattagccag ttctctgcaga      480
        ccttgtgagg actagaggaa gaatgctcct ggctgttttg tactgcctgc tgtggagttt      540
30      ccagacctcc gctggccatt tccctagagc ctgtgtctcc tctaagaacc tgatggagaa      600
        ggaatgctgt ccaccgtgga gcggggacag gagtccctgt ggccagcttt caggcagagg      660
        ttctctgtcag aatatecttc tgtccaatgc accacttggg cctcaatttc ccttcacagg      720
35
40
45
50
55
60
65

```

ES 2 310 275 T3

5 ggtggatgac cgggagtcgt ggccttccgt cttttataat aggacctgcc agtgcctctgg 780
 caacttcatg ggattcaact gtggaaactg caagtttggc ttttggggac caaactgcac 840
 agagagacga ctcttgggtga gaagaaacat ctctcgatttg agtgccccag agaaggacaa 900
 attttttggc tacctcactt tagcaaagca taccatcagc tcagactatg tcatccccat 960
 10 agggacctat ggccaaatga aaaatggatc aacacccatg tttaacgaca tcaatattta 1020
 tgacctcttt gtctggatgc attlattatgt gtcaatggat gcactgcttg ggggatctga 1080
 aatctggaga gacattgatt ttgcccatga agcaccagct tttctgcctt ggcatagact 1140
 15 ctctctgttg cggtgggaac aagaaatcca gaagctgaca ggagatgaaa acttcactat 1200
 tccatattgg gactggcggg atgcagaaaa gtgtgacatt tgcacagatg agtacatggg 1260
 20 aggtcagcac cccacaaatc ctaacttact cagcccagca tcattcttct cctcttggca 1320
 gatrgtctgt agccgatttg aggagtacaa cagccatcag tctttatgca atggaacgcc 1380
 cgagggacct ttacggcgta atcctggaaa ccatgacaaa tccagaacct caaggctccc 1440
 25 ctcttcagct gatgtagaat ttctgcctgag tttgacccaa tatgaatctg gttccatgga 1500
 taaagctgcc aatttcagct tttagaaatac actggaagga tttgctagtc cacttactgg 1560
 30 gatagcggat gcctctcaaa gcagcatgca caatgccttg cacatctata tgaatggaac 1620
 aatgtcccag gtacagggat ctgccaaagca tcctatcttc ctctctcacc atgcatttgt 1680
 35 tgacagtatt tttgagcagt ggcctccgaag gcaccgctct cttcaagaag tttatccaga 1740
 agccaatgca cccattggac alaaccggga atcctacatg gtccctttta taccactgta 1800
 cagaaatggt gatttcttta tttcatccaa agatctgggc tatgactata gctatctaca 1860
 40 agattcagac ccagactctt ttcaagacta cattaaagtcc tatttggaac aagcgagtcg 1920
 gatctggtca tggctccttg gggcggcgat ggtaggggcc gtcctcactg cctgctggc 1980
 45 agggcttgtg agcltgcctg gtcgtcacia gagaaagcag ctccctgaag aaaagcagcc 2040
 actcctcatg gagaaagagg attaccacag cttgtatcag agccatttat aaaaggctta 2100
 50 ggcaalagag tagggccaaa aagcctgacc tcaactctaac tcaaagtaat gtccaggttc 2160
 ccagagaata tctgctggta tttttctgta aagaccattt gcaaaattgt aacctaatc 2220
 aaaqtgtagc ctctctccaa ctccaggtaga acacacctgt ctttgtcttg ctgttttcac 2280
 55 tcagcccttt taacattttc ccctaagccc atatgtctaa ggaaaggatg ctatttggta 2340
 atgaggaact gttatttcta tgtgaattaa agtgccttta tttt 2384

60 <210> 23
 <211> 30
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

ES 2 310 275 T3

	<220>		
	<223> La secuencia artificial es una sonda		
5	<400> 23		
	cctgaggcac ctggaaggag gctgcagtgt		30
10	<210> 24		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> La secuencia artificial es una sonda		
20	<400> 24		
	atcaaaaaaac aagcatggcc tcacacc		27
25	<210> 25		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> La secuencia artificial es un cebador		
35	<400> 25		
	ctgcttcgct gcatcgctga aa		22
40	<210> 26		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> La secuencia artificial es un cebador		
50	<400> 26		
	cagactcctc cagtcaggta ca		22
55	<210> 27		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
60	<220>		
	<223> La secuencia artificial es un cebador		
65	<400> 27		
	gcttggtggt taaaacttac c		21

ES 2 310 275 T3

	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> La secuencia artificial es un cebador	
10	<400> 28	
	tgaacagttc tgttggtgta	20
15	<210> 29	
	<211> 27	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> La secuencia artificial es una sonda	
25	<400> 29	
	ctgcctgcct atgtgacgac aatccgg	27
30	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> La secuencia artificial es un cebador	
40	<400> 30	
	caattttggt ggagaaccgg	20
45	<210> 31	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> La secuencia artificial es un cebador	
55	<400> 31	
	gctgtcggag gtatatggtg	20
60	<210> 32	
	<211> 28	
	<212> ADN	
65	<213> Artificial	

ES 2 310 275 T3

	<220>	
	<223> La secuencia artificial es una sonda	
5	<400> 32	
	catttcagag agtaacatgg actacaca	28
10	<210> 33	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> La secuencia artificial es un cebador	
20	<400> 33	
	gcaagtgccca atgatcagag g	21
25	<210> 34	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> La secuencia artificial es un cebador	
35	<400> 34	
	atatagactc aggtatacac act	23
40	<210> 35	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> La secuencia artificial es una sonda	
50	<400> 35	
	tcccatcaga atccaaacaa gaggaag	27

55

LISTADO DE SECUENCIAS

60	<110> Johnson & Johnson Atkins, David Backus, John Belly, Robert Rosen, Steven White, Robert
65	

ES 2 310 275 T3

<120> ENSAYO NO OPERATIVO DE GANGLIO LINFÁTICO
<130> CDS 5009
<160> 35
5 <170> PatentIn versión 3.1
<210> 1
<211> 23
10 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> La secuencia artificial es un cebador
15 <400> 1

 atgactgcct tgctctctca gta 23
20 <210> 2
<211> 26
<212> ADN
25 <213> Artificial
<220>
<223> La secuencia artificial es un cebador
30 <400> 2

 ggctgttgcct tggactctc taaaga 26
35 <210> 3
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial
40 <220>
<223> La secuencia artificial es un cebador
45 <400> 3

 caaacggatg aaactctgag caatgttga 29
50 <210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial
55 <220>
<223> La secuencia artificial es un cebador
60 <400> 4

 tctgtgagcc aaaggtcttg caga 24
65 <210> 5
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

ES 2 310 275 T3

	<220>	
	<223> La secuencia artificial es un cebador	
5	<400> 5	
	ggccaacaaa gctcaggaca aca	23
10	<210> 6	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> La secuencia artificial es un cebador	
	<400> 6	
20	gcagtgactt cgtcattgg acgta	25
	<210> 7	
25	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> La secuencia artificial es una sonda	
	<400> 7	
35	tgtttatgca attaatatat gacagcagtc tttgtg	36
	<210> 8	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> La secuencia artificial es un cebador	
	<400> 8	
50	ctgaggcacc tggaggagg	20
	<210> 9	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> La secuencia artificial es un cebador	
	<400> 9	
65	catcttcag ctgggcaggg	20
	<210> 10	
	<211> 29	

ES 2 310 275 T3

	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Artificial</code>		
	<code><220></code>		
5	<code><223> La secuencia artificial es un cebador</code>		
	<code><400> 10</code>		
10	<code>ctgaggcacc tggaaggagg ctgcagtgt</code>		29
	<code><210> 11</code>		
	<code><211> 21</code>		
15	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Artificial</code>		
	<code><220></code>		
20	<code><223> La secuencia artificial es un cebador</code>		
	<code><400> 11</code>		
25	<code>tctgataaag gccgtacaag</code>		21
	<code><210> 12</code>		
	<code><211> 22</code>		
30	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Artificial</code>		
	<code><220></code>		
	<code><223> La secuencia artificial es un cebador</code>		
35	<code><400> 12</code>		
40	<code>tcacgacttg ctgttttgc tc</code>		22
	<code><210> 13</code>		
	<code><211> 26</code>		
	<code><212> ADN</code>		
45	<code><213> Artificial</code>		
	<code><220></code>		
	<code><223> La secuencia artificial es una sonda</code>		
50	<code><400> 13</code>		
	<code>atcaaaaaac aagcatggcc tacacc</code>		26
55	<code><210> 14</code>		
	<code><211> 1155</code>		
	<code><212> ADN</code>		
60	<code><213> Humano</code>		
	<code><400> 14</code>		
65	<code>atggtggttg aggttgattc catgccggct gcctcttctg tgaagaagcc atttggtctc</code>		60
	<code>aggagcaaga tgggcaagtg gtgctgccgt tgcttcccct gctgcaggga gagcggcaag</code>		120

ES 2 310 275 T3

	agcaacgtgg gcaCtTtctgg agaccacgac gactctgcta tgaagacact caggagcaag	180
	atgggcaagt ggtgccgcca ctgcttcccc tgctgcaggg ggagtggcaa gagcaacgtg	240
5	ggcgcttctg gagaccacga cgactctgct atgaagacac tcaggaacaa gatgggcaag	300
	tggtgctgcc actgcttccc ctgctgcagg gggagcagca agagcaaggt gggcgcttgg	360
10	ggagactacg atgacagtgc cttcattggag cccaggtacc acgtccgtgg agaagatctg	420
	gacaagctcc acagagctgc ctgggtgggg aaagtcccca gaaaggatct catcgtcatg	480
	ctcagggaca ctgacgtgaa caagcaggac aagcaaaaaga ggactgctct acatctggcc	540
15	tctgccaatg ggaattcaga agtagtaaaa ctctgctgg acagacgatg tcaacttaat	600
	gtccttgaca acaaaaagag gacagctctg ataaaaggccg tacaatgcca ggaagatgaa	660
20	tgtgcgttaa tgttgctgga acatggcact gatccaaata ttccagatga gtatggaaat	720
	accactctgc actacgctat ctataatgaa gataaattaa tggccaaagc actgctctta	780
	tatggtgctg atatcgaatc aaaaaacaag catggcctca caccactggt acttgggtga	840
25	catgagcaaa aacagcaagt cgtgaaattt ttaattaaga aaaaagcgaa ttaaatgca	900
	ctggatagat atggaaggac tgctctcata ctgctgtat gttgtggatc agcaagtata	960
30	gtcagccttc tacttgagca aaatattgat gtatcttctc aagatctatc tggacagacg	1020
	gccagagagt atgctgtttc tagtcatcat catgtaattt gccagttact ttctgactac	1080
	aaagaaaaac agatgctaaa aatctcttct gaaaacagca atccagaaaa tgtctcaaga	1140
35	accagaaata aataa	1155

<210> 15

40 <211> 3865

<212> ADN

<213> Humano

45 <400> 15

	tccgagctga ttacagacac caagggaagat gctglaaaga gtcagcagcc acagccctgg	60
50	ctagctggcc ctgctgggcaL ttattagtaa agttttaatg acaaaagctt tgagtcaaca	120
	caccctgggg taattaacct ggtcatcccc accctggaga gccatcctgc ccatgggtga	180
55	tcaaagaagg aacatctgca ggaacacctg atgaggctgc acccttggcg gaaagaacac	240
	ctgacacagc tgaaagcttg gtggaaaaaa cacctgatga ggctgcaccc ttgggtgaaa	300
	gaacacctga cacggctgaa agcttgggtg aaaaaacacc tgatgaggct gcatccttgg	360
60	tggagggaac atctgacaaa attcaatggt tggagaaagc gacatctgga aagttcgaac	420
	agtcagcaga agaaacacct agggaaatta cgagtcctgc aaaagaaca tctgagaaat	480
65	ttacgtggcc agcaaaaagga agacctagga agatcqcatt ggagaaaaaa gaagacacac	540

ES 2 310 275 T3

	ctagggaaat	tatgagtccc	gcaaaaagaaa	catctgagaa	atttacgtgg	gcagcaaaag	600
	gaagacctag	gaagatcgca	tgggagaaaa	aagaaacacc	tgtaaagact	ggatgcgtgg	660
5	caagagtaac	atctaataaa	actaaagttt	tggaaaaagg	aagatctaag	atgattgcat	720
	gtcctacaaa	agaatcatct	acaaaagcaa	gtgccaatga	tcagaggttc	ccatcagaat	780
10	ccaaacaaga	ggaagatgaa	gaatattctt	gtgattcttcg	gagtctcttt	gagagtcttg	840
	caaagattca	agtgtgtata	cctgagtcta	tatatcaaaa	agtaatggag	ataaatagag	900
	aagtagaaga	gcctcctaag	aagccatctg	ccttcaagcc	tgccattgaa	atgcaaaact	960
15	ctgttccaaa	taaaqccttt	gaattgaa	atgaacaaac	attgagagca	gatccgatgt	1020
	tcccaccaga	atccaaacaa	aaggactatg	aagaaaattc	ttgggattct	gagagtctct	1080
20	gtgagactgt	ttcacagaag	gatgtgtgtt	taccaaggc	tacacatcaa	aaagaaatag	1140
	ataaaataaa	tggaaaalta	gaagagtctc	ctaataaaga	tggtcttctg	aaggctacct	1200
	gcggaatgaa	agtttctatt	ccaactaaag	ccttagaatt	gaaggacatg	caaactttca	1260
25	aagcagagcc	lccggggaag	ccatctgcct	tcgagcctgc	cactgaaatg	caaaagtctg	1320
	tcccaataaa	agccttggaa	ttgaaaaatg	aacaaacatt	gagagcagat	gagatctctc	1380
30	catcagaatc	caaacaaaag	gactatgaag	aaagtctctg	ggattctgag	agtctctgtg	1440
	agactgtttc	acagaaggat	gtgtgtttac	ccaaggctrc	rcatcaaaaa	gaaatagata	1500
35	aaataaatgg	aaaattagaa	gggtctcctg	ttaaagatgg	tcttctgaag	gctaactgcg	1560
	gaatgaaagt	tctattcca	actaaagcct	tagaattgat	ggacatgcaa	actttcaag	1620
	cagagcctcc	cgagaagcca	tctgccttcg	agcctgccal	tgaaatgcaa	aagtctgttc	1680
40	caataaagc	cttggaaatg	aagaatgaac	aaacattgag	agcagatgag	atactcccat	1740
	cagaatcaa	acaaaaggac	tatgaagaaa	gttcttggga	ttctgagagt	ctctgtgaga	1800
45	ctgtttcaca	gaaggatgtg	tgtttaccca	aggctrcrca	tcaaaaagaa	atagataaaa	1860
	taaatygaaa	attagaagag	tctcctgata	atgatggttt	tctgaaggct	ccctgcagaa	1920
	tgaaagtttc	tattccaact	aaagcctlag	aattgatgga	catgcaaact	ttcaaaagcag	1980
50	agcctcccga	gaagccatct	gccttcgagc	ctgccattga	aatgcaaaaag	tctgttccaa	2040
	ataaagcctt	ggaattgaag	aatgaacaaa	cattgagagc	agatcagatg	ttcccttcag	2100
55	aatcaaaaca	aaagaasgtt	gaagaaaatt	cttgggattc	tgagagtctc	cgtgagactg	2160
	tttcacagaa	ggatgtgtgt	gtacccaagg	ctacacatca	aaaagaaatg	gataaaataa	2220
60	gtggaaaatt	agaagattca	actagcctat	caaaaatctt	ggatacagtt	cattcttgtg	2280
	aaagagcaag	ggaacttcaa	aaagatcact	gtgaacaacg	tacaggaaaa	atggaacaaa	2340

65

ES 2 310 275 T3

	tgaaaaagaa	gttttgtgta	ctgaaaaaga	aactgtcaga	agcaaaagaa	ataaaatcac	2400
5	agttagagaa	ccaaaaagtt	aaatgggaac	aagagctctg	cagtgtgaga	ttgactttaa	2460
	accaagaaga	agagaagaga	agaaatgccg	atatattaaa	tgaaaaaatt	agggaagaat	2520
	taggaagaat	cgaagagcag	cataggaaag	agttagaagt	gaaacaacaa	cttgaacagg	2580
10	ctctcagaat	acaagatata	gaattgaaga	gtgtagaaag	taatttgaat	caggtttctc	2640
	acactcatga	aaatgaaaat	tatctcttac	atgaaaattg	catgttgaaa	aaggaaaattg	2700
15	ccatgctaaa	actggaata	gccacactga	aacaccaata	ccaggaaaag	gaaaataaat	2760
	actttgagga	cattaagatt	tlaaaagaaa	agaatgctga	acttcagatg	accctaanaac	2820
	tgaaagagga	atcatttaact	aaaagggcat	ctcaatatag	tgggcagctt	aaagtcttga	2880
20	tagctgagaa	cacaatgctc	acttctaaat	tgaaggaaaa	acaagacaaa	gaaataclag	2940
	aggcagaaat	tgaatcacac	catcctagac	tggcttctgc	tgtacaagac	catgatcaaa	3000
25	ttgtgacatc	aagaaaaagt	caagaacctg	cttccacat	tgcaggagat	gcttgttlgc	3060
	aaagaaaaat	gaatgttgat	gtgagtagta	cgatatataa	caatgaggtg	ctccatcaac	3120
	cacttlctga	agctcaaagg	aaatccaaaa	gcctaaaaat	taatctcaat	tatgcmggag	3180
30	atgctctaag	agaaaataca	ttggtttcag	aacatgcaca	aagagaccaa	cgtqaaacac	3240
	agtgtcaaat	gaaggaaagt	gaacacatgt	atcaaaacga	acaagataat	gtgaacaaac	3300
35	acactgaaca	gcaggagtct	ctagatcaga	aattatttca	actacaaagc	aaaaatattg	3360
	ggcttcaaca	gcaattagtt	catgcacata	agaaagctga	caacaaaagc	aagataacaa	3420
40	ttgatattca	tttlcttqag	aggaaaatgc	aacatcatct	cctaaaagag	aaaaatgagg	3480
	agatalttaa	ttacaalaac	catttataaaa	accgtatata	tcaatatgaa	aaagagaaag	3540
	cagaaacaga	aaactcatga	gagacaagca	gtaagaaact	tcttttggag	aaacaacaga	3600
45	ccagatcttt	actcacaact	catgctagga	ggccagtcct	agcatcacct	tatgttgaaa	3660
	atcttaccaa	tagtctgtgt	caacagaata	cttatttttag	aagaaaaatt	catgatttct	3720
50	tcctgaagcc	tacagacata	aaataacagt	gtgaagaatt	actgtttcac	gaattgcata	3780
	aaagtgcaca	ggattcccat	ctaccctgat	gatgcagcag	acatcattca	atccaaccag	3840
	aatctcgtct	tgtcactcag	gctgg				3865

55

<210> 16

<211> 3282

60 <212> ADN

<213> Humano

65

ES 2 310 275 T3

<400> 16

5	gggacagggc tgaggatgag gagaaccctg gggacccaga agaccgtgcc ttgcccgaa	60
	gtcctgcctg taggcctgaa ggacttgccc taacagagcc tcaacaacta cctggtgatt	120
	cctacttcag ccccttgggtg tgagcagctt ctcaacatga actacagcct ccacttgccc	180
10	ltcgtgtgtc tgagtctctt cactgagagg atgtgcatcc aggggagtca gttcaacgtc	240
	gaggtcggca gaagtgacaa gctttccctg cctggccttg agaacctcac agcaggatat	300
15	aacaaatttc tcaggcccaa ttttgggtgga gaaccctgac agatagcgtc gactctggac	360
	attgcaagta tctctagcat ttcagagagt aacatggact acacagccac catatacctc	420
	cgacagcgtc ggatggacca gcggctgggtg tttgaaggca acaagagctt cactctggat	480
20	gccgcctcgt tggagttcct ctgggtgcca gatacttaca ttgtggagtc caagaagtec	540
	ttcttccatg aagtcactgt gggaaacagg ctcatccgcc tcttctcaa tggcacggtc	600
25	ctglatgccc tcagaatcac gacaactggt gcatgtaaca tggatctgtc taatatcccc	660
	atggacacac agacatgcaa gttgcagctg gaaagctggg gctatgatgg aaatgatgtg	720
	gagttcacct ggctgagagg gaacgactct gtgcgtggac tggaacacct gcggcttgcct	780
30	cagtacacca tagagcggta tttcacctta gtcaccagat cgcagcagga gacaggaaat	840
	tacactagat tggctctaca gtttgagctt cggaggaaatg ltcrgtattt cattttgga	900
	acctacgttc cttccacttt cctgggtgggtg ttgtcctggg tttcattttg gatctctctc	960
35	gattcagtcct ctgcaagaac ctgcattgga gtgacgaccg tgttatcaat gaccacactg	1020
	atgalcgggt cccgcacttc tcttcccaac accaactgct tcatcaaggc catcgatgtg	1080
40	tacctgggga tctgclitag ctltgtgttt ggggccttgc tagaalatgc agttgctcac	1140
	tacagttcct tacagcagat ggcagccaaa gataggggga caacaaagga agtagaagaa	1200
	gtcagtatta ctaatatcat caacagctcc atctccagct ttaaaccgga gatcagcttt	1260
45	gccagcattg aaatttccag cgacaacggt gactacagtg acttgacaat gaaaaccagc	1320
	gacaagttca agtltgtctt ccgagaaaag atgggcagga ttgltgatta tttcacaatl	1380
50	caaaacccca gtaatgttga tcactattcc aaactactgt ttcctttgat ttttatgcta	1440
	gccaatgtat tttactgggc atactacatg ttttttgag tcaatgttaa atttcttgra	1500
	tgccataggt cttcaacagg acaagataat gatgtaaatg gtatttttagg ccaagtgtgc	1560
55	acccacatcc aatgggtgcta caagtgactg aaataatatt tgagtctttc tgctcaaaga	1620
	atgaagctcc aaccttgtt ctaagctgtg tagaagctct agcattatag gatcttghta	1680
60	tagaaacatc agtccattcc tctttcatct taatcaagga cattcccatg gagcccaaga	1740
	ttacaaatgt actcagggct gtttatctcg ttgctccctg gtttgcattt acctcatata	1800
	aagaatggga aggagaccat tgggtaaccc tcaagtgtca gaagttgttt ctaaagtaac	1860
65	tatacatggt ttttactaaa tctctgcagt gcttataaaa tacattgttg cctatttagg	1920

ES 2 310 275 T3

	gagtaacatt ttctagtttt tgtttctggg taaaatgaaa tatgggctta tgtcaattca	1980
	ttggaagtca atgcactaac tcaataccaa gatgagtttt taaataatga atattattta	2040
5	ataccacaac agaattatcc ccaatttcca ataagtccta tcattgaaaa ttcaaatata	2100
	agtgaagaaa aaattagtag atcaacaatc taaacaaatc cctcggttct aagatacaat	2160
10	ggattcccca tactggaagg actctgagggc tttattcccc cactatgcat atcttatcat	2220
	tttattatta tacacacatc catcctaaac tataactaaag cccttttccc atgcatggat	2280
15	ggaaatggaa gatttttttg taacttgttc tagaagtctt aatatgggct gttgccatga	2340
	aggcttgag aattgagtc attttctagc tgcctttatt cacatagtga tggggacta	2400
	aaagtactgg gttgactcag agagtcgctg tcattctgtc attgctgcta ctctaacact	2460
20	gagcaacact ctcccagtgg cagatccctt gtatcattcc aagaggagca ttcattccctt	2520
	tgctctaatag atcaggaatg atgcttatta gaaaacaaac tgcttgacct aggaacaagt	2580
25	ggcttagctt aagtaaactt ggctttgctc agatccctga tccttccagc tggctctgctc	2640
	tgagtggctt atcccgcag agcaggagcg tgctggccct gagtactgaa ctttctgagt	2700
	aacaatgaga cacgttacag aacctatggt cagggtgagg gtgagctgcc ctctccaaat	2760
30	ccagccagag atgcacattc ctcggccagt ctgagccaac agtaccaaaa gtgatttttg	2820
	agtgtgccag ggtaaaggct tccagttcag cctcagttat tttagacaat ctcgccatct	2880
35	ttaatttctt agcttctctg tctaataaat gcaaggcttt acctttctctg tcagaaataa	2940
	accaaggctc taaaagatga tttcccttct gtaactcctt agagccacag gttctcattc	3000
40	cttttcccat tatacttctc acaattcagt ttctatgagt ttgatcacct gattttttta	3060
	acaaaatatt tctaacggga atgggtggga gtgctggtga aaagagatga aatgtggttg	3120
	tatgagccaa tcatatttgt gattttttta aaaaagttta aaaggaaata tctgttctga	3180
45	aacccactt aagcattggt tttatataaa aacaatgata aagatgtgaa ctgtgaaata	3240
	aatataccat attagctacc caccaaaaaa aaaaaaaaaa aa	3282

50 <210> 17
 <211> 503
 <212> ADN
 55 <213> Humano

60

65

ES 2 310 275 T3

<400> 17

```

5      gacagcggct tccttgatcc ttgccacccg cgactgaaca ccgacagcag cagcctcacc      60
      atgaagttgc tgatggctct catgctggcg gccctctccc agcactgcta cgcaggctct      120
      ggctgccctt tattggagaa tgtgatttcc aagacaatca atccacaagt gtctaagact      180
10     gaatacaaag aacttcttca agagttcata gacgacaatg ccactacaaa tgccatagat      240

      gaattgaagg aatgttttct taaccaaacg gatgaaactc tgagcaatgt tgagggtgttt      300
      atgcaattaa tatatgacag cagtctttgt gatttatttt aactttctgc aagacctttg      360
      gctcacagaa ctgcagggta tggtgagaaa ccaactacgg attgctgcaa accacacctt      420
20     ctctttctta tgtcttttta ctacaaacta caagacaatt gttgaaacct gctatacatg      480
      tttattttta taaattgatg gca                                          503

```

25 <210> 18
 <211> 503
 <212> ADN
 30 <213> Humano

<400> 18

```

35     gacagcggct tccttgatcc ttgccacccg cgactgaaca ccgacagcag cagcctcacc      60
      atgaagttgc tgatggctct catgctggcg gccctctccc agcactgcta cgcaggctct      120
      ggctgccctt tattggagaa tgtgatttcc aagacaatca atccacaagt gtctaagact      180
40     gaatacaaag aacttcttca agagttcata gacgacaatg ccactacaaa tgccatagat      240
      gaattgaagg aatgttttct taaccaaacg gatgaaactc tgagcaatgt tgagggtgttt      300
45     atgcaattaa tatatgacag cagtctttgt gatttatttt aactttctgc aagacctttg      360
      gctcacagaa ctgcagggta tggtgagaaa ccaactacgg attgctgcaa accacacctt      420
      ctctttctta tgtcttttta ctacaaacta caagacaatt gttgaaacct gctatacatg      480
50     tttattttta taaattgatg gca                                          503

```

55 <210> 19
 <211> 1793
 <212> ADN
 <213> Humano

60

65

ES 2 310 275 T3

<400> 19

5	cgcgtccgcc ccgcgagcac agagcctcgc ctttgccgat ccgccgcccg tccacaccocg	60
	ccgccagctc accatggatg atgatatcgc cgcgctcgtc gtcgacaacg gctccggcat	120
	gtgcaaggcc ggcttcgcgg gcgacgatgc cccccgggcc gtcttcccct ccatcgtggg	180
10	gcgccccagg caccagggcg tgatggtggg catgggtcag aaggattcct atgtgggcga	240
	cgaggcccag agcaagagag gcatcctcac cctgaagtac cccatcgagc acggcatcgt	300
	caccaactgg gacgacatgg agaaaatctg gcaccacacc ttctacaatg agctgcgtgt	360
15	ggctcccag gagcaccocg tgctgctgac cgaggceccc ctgaacccca aggccaaccg	420
	cgagaagatg acccagatca tgtttgagac ctcaacacc ccagccatgt acgttgctat	480
20	ccaggctgtg ctatccctgt acgcctctgg ccgtaccact ggcatcgtga tggactccgg	540
	tgacggggtc acccacactg tgcccatcta cgaggggtat gccctcccc atgccatcct	600
	gcgtctggac ctggctggcc gggacctgac tgactacctc atgaagatcc tcaccgagcg	660
25	cggctacagc ttcaccacca cggccgagcg ggaaatcgtg cgtgacatta aggagaagct	720
	gtgctacgtc gccctggact tcgagcaaga gatggccacg gctgcttcca gctcctccct	780
30	ggagaagagc tacgagctgc ctgacggcca ggtcatcacc attggcaatg agcggttccg	840
	ctgccctgag gcactcttcc agccttccct cctgggcatt gagtctctgt gcatccacga	900
	aactaccttc aactccatca tgaagtgtga cgtggacatc cgcaaagacc tgtacgcaa	960
35	cacagtgtg tctggcggca ccaccatgta ccctggcatt gccgacagga tgcagaagga	1020
	gatcactgcc ctggcaccca gcacaatgaa gatcaagatc attgctcctc ctgagcgcaa	1080
40	gtactccgtg tggatcggcg gctccatcct ggccctcgtg tccaccttc agcagatgtg	1140
	gatcagcaag caggagtatg acgagtccgg cccctccatc gtccaccgca aatgcttcta	1200
	ggcggactat gacttagttg cgttacaccc tttcttgaca aaacctaact tgcgcagaaa	1260
45	acaagatgag attggcatgg ctttatttgt tttttttgtt ttgttttgg ttttttttt	1320
	tttttggctt gactcaggat ttaaaaactg gaacgggtgaa ggtgacagca gtcggttgg	1380
50	gcgagcatcc cccaaagttc acaatgtggc cgaggacttt gattgcacat tgttgttttt	1440
	ttaatagtca ttccaaatat gagatgcatt gttacaggaa gtccttgcc atcctaaaag	1500
55	ccaccccact tctctctaag gagaatggcc cagtcctctc ccaagtccac acaggggagg	1560
	tgatagcatt gctttcgtgt aaattatgta atgcaaaatt tttttaatct tcgccttaat	1620
	acttttttat tttgttttat tttgaatgat gagccttcgt gccccctt cccccttttt	1680
60	gtcccccaac ttgagatgta tgaaggcttt tggctcctcc gggagtgggt ggaggcagcc	1740
	agggcttacc tgtacactga cttgagacca gttgaataaa agtgcacacc tta	1793

65

ES 2 310 275 T3

<210> 20

<211> 1377

<212> ADN

5 <213> Humano

<400> 20

```

10      cacacagcct actttccaag cggagccatg tctggtaacg gcaatgcggc tgcaacggcg      60
      gaagaaaaca gcccaaagat gagagtgatt cgcgtgggta cccgcaagag ccagcttgct      120
15      cgcatacaga cggacagtgt ggtggcaaca ttgaaagcct cgtaccctgg cctgcagttt      180
      gaaatcattg ctatgtccac cacaggggac aagattcttg atactgcact ctctaagatt      240
      ggagagaaaa gcctgtttac caaggagctt gaacatgccc tggagaagaa tgaagtggac      300
20      ctggttgctc actccttgaa ggacctgccc actgtgcttc ctctggctt caccatcgga      360
      gccatctgca agcgggaaaa cctcatgat gctgttgtct ttcacccaaa atttgttggg      420
25
      aagaccctag aaaccctgcc agagaagagt gtggtgggaa ccagctccct gcgaagagca      480
30      gccacagctc agagaaagtt cccgcactctg gagttcagga gtattcgggg aaacctcaac      540
      acccggcttc ggaagctgga cgagcagcag gagttcagtg ccatcatcct agcaacagct      600
      ggctgcagc gcatgggctg gcacaaccgg gtggggcaga tcctgcaccc tgagaaatgc      660
35      atgtatgctg tgggccaggg ggccttgggc gtggaagtgc gagccaagga ccaggacatc      720
      ttgatctgg tgggtgtgct gcacgatccc gagactctgc ttcgctgcat cgctgaaagg      780
40      gccttcctga ggcacctgga aggaggctgc agtgtgccag tagccgtgca tacagctatg      840
      aaggatgggc aactgtacct gactggagga gtctggagtc tagacggctc agatagcata      900
45      caagagacca tgcaggctac catccatgtc cctgccacgc atgaagatgg ccctgaggat      960
      gaccacagt tggtaggcat cactgctcgt aacattccac gagggcccca gttggctgcc      1020
      cagaacttgg gcatcagcct ggccaacttg ttgctgagca aaggagccaa aaacatcctg      1080
50      gatgttgcac ggcagcttaa cgatgcccat taactggttt gtggggcaca gatgcctggg      1140
      ttgctgctgt ccagtgccca catcccgggc ctcagtgcc cattctcact gctatctggg      1200
55      gagtgattac cccgggagac tgaactgcag ggttcaagcc ttccagggat ttgcctcacc      1260
      ttggggcctt gatgactgcc ttgcctcctc agtatgtggg ggcttcatct ctttagagaa      1320
      gtccaagcaa cagcctttga atgtaaccaa tcctactaat aaaccagttc tgaaggt      1377

```

60

<210> 21

<211> 1524

65 <212> ADN

<213> Humano

ES 2 310 275 T3

<400> 21

5	agcagacaga ggactctcat taaggaaggt gtcctgtgcc ctgaccctac aagatgccaa	60
	gagaagatgc tcacttcac t atggttacc ccaagaagg gacaggccac tcttacacca	120
	cggctgaaga ggccgctggg atcggcatcc tgacagtgat cctgggagtc ttactgtca	180
10	tchgctgttg gtattgtaga agacgaaatg gatacagagc cttgatggat aaaagtcttc	240
	atggtggcac tcaatgtgcc ttaacaagaa gatgccaca agaagggttt gatcatcggg	300
	acagcaaagt gtctcttcaa gagaaaaact gtgaacctgt ggttcccaat gctccacctg	360
15	cttatgagaa actctctgca gaacagtcac caccacctta ttcaccttaa gagccagcga	420
	gacacctgag acatgctgaa attatttctc tcacactttt gcttgaattt aatacagaca	480
20	tctaattgtc tcctttggaa tgggtgtagga aaaatgcaag ccatctctaa taataagtca	540
	gtgttaaaat ttagtaggt ccgctagcag tactaatcat gtgaggaaat gatgagaaat	600
	attaaattgg gaaaactcca tcaataaatg ttgcaatgca tgatactatc tgtgccagag	660
25		
	gtaatgttag taaatccatg gtgttatttt ctgagagaca gaattcaagt gggatttctg	720
	gggccatcca atttctcttt acttgaaatt tggctaataa caaactagtc aggttttcga	780
30	accttgaccg acatgaactg tacacagaat tgttccagta ctatggagtg ctcaaaaagg	840
	atacttttac aggttaagac aaagggttga ctggcctatt tatctgatca agaacatgctc	900
35	agcaatgtct ctttgtgctc taaaattcta ttatactaca ataatatatt gtaaagatcc	960
	tatagctctt tttttttgag atggagtttc gcttttgttg cccaggctgg agtgcaatgg	1020
40	cgcgatcttg gctcaccata acctccgcct cccaggttca agcaattctc ctgccttagc	1080
	ctcctgagta gctgggatta caggcgtgcg ccactatgcc tgactaattt tgtagtttta	1140
	gtagagacgg ggtttctcca tgttggtcag gctggctca aactcctgac ctcagggtgat	1200
45	ctgcccgcct cagcctccca aagtgctgga attacaggcg tgagccacca cgctggctg	1260
	gatcctatat cttaggtaag acatataacg cagtctaatt acatttcaact tcaaggctca	1320
50	atgctattct aactaatgac aagtattttc tactaaacca gaaattggta gaaggattta	1380
	aataagtaaa agctactatg tactgcctta gtgctgatgc ctgtgtactg ccttaaatgt	1440
	acctatggca atttagctct cttgggttcc caaatccctc tcacaagaat gtgcagaaga	1500
55	aatcataaag gatcagagat tctg	1524

60

65

ES 2 310 275 T3

<210> 22

<211> 2384

<212> ADN

5 <213> Humano

<400> 22

10 tattgagttc ttcaaacatt gtagcctctt tatggtctct gagaataac taccttaaac 60
 ccataatctt taataacttc taaactttct taataagaga agctctatc ctgacactac 120
15 ctctcatttg caaggtcaaa tcatcattag ttttgtagtc tattaactgg gtttgcttag 180
 gtcaggcatt attattacta accttattgt taatattcta accataagaa ttaaactatt 240
 aatggtgaat agagtttttc actttaacat aggcctatcc cactggtggg atacgagcca 300
20 attcgaaaga aaagtcagtc atgtgctttt cagaggatga aagcttaaga taaagactaa 360
 aagtgtttga tgctggaggt gggagtggta ttatataggt ctgagccaag acatgtgata 420
25 atcactgtag tagtagctgg aaagagaaat ctgtgactcc aattagccag ttccctgcaga 480
 ccttgtaggg actagaggaa gaatgctcct ggctgttttg tactgcctgc tgtggagttt 540
 ccagaccctc gctggccatt tccttagagc ctgtgtctcc tctaagaacc tgatggagaa 600
30 ggaatgctgt ccaccgtgga gcggggacag gagtcctgt gccagcttt caggcagagg 660
 ttccctgtcag aatatecttc tgtccaatgc accacttggg cctcaatttc ccttcacagg 720

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 310 275 T3

	ggtagatgac cgggagtcgt ggccttccgt cttttataat aggacctgcc agtgctctgg	780
	caacttcatg ggattcaact gtggaaactg caagtttggc ttttggggac caaactgcac	840
5	agagagacga ctcttgggtga gaagaaacat ctctgatttg agtgccccag agaaggacaa	900
	atTTTTTgCC tacctcactt tagcaaagca taccatcagc tcagactatg tcacccccat	960
10	agggacctat ggccaaatga aaaatggatc aacacccatg tttaacgaca tcaatattta	1020
	tgacctcttt gtctggatgc attattatgt gtcaatggat gcactgcttg ggggatctga	1080
15	aatctggaga gacattgatt ttgcccatga agcaccagct tttctgcctt ggcatagact	1140
	cttcttggtg cggtaggaac aagaaatcca gaagctgaca ggagatgaaa acttcactat	1200
	tccatattgg gactggcggg atgcagaaaa gtgtgacatt tgcacagatg agtacatggg	1260
20	aggtcagcac cccacaaatc ctaacttact cagcccagca tcattcttct cctcttggca	1320
	gattgtctgt agccgatttg aggagtacaa cagccatcag tctttatgca atggaacgcc	1380
25	cgagggacct ttaCggcgta atcctggaaa ccatgacaaa tccagaacct caaggctccc	1440
	ctctcagct gatgtagaat tttgcctgag tttgacccaa tatgaatctg gttccatgga	1500
	taaagctgcc aatttcagct ttagaaatac actggaagga tttgctagtc cacttactgg	1560
30	gatagcggat gcctctcaaa gcagcatgca caatgccttg cacatctata tgaatggaac	1620
	aatgtcccag gtacagggat ctgccaacga tcttatcttc cttcttcacc atgcatttgt	1680
35	tgacagtatt tttgagcagt ggctccgaag gcaccgtcct ctccaagaag tttatccaga	1740
	agccaatgca cccattggac alaaccggga atcctacatg gttcctttta taccactgta	1800
40	cagaaatggt gatttcttta tttcatcaa agatctgggc tatgactata gctatctaca	1860
	agattcagac ccagactctt ttcaagacta cattaagtcc tatttggaac aagcgagtcg	1920
	gatctggtca tggctccttg gggcggcgal ggtagggggc gtcctcactg ccctgctggc	1980
45	agggtctgtg agcttgctgt gtcgtcacia gagaaagcag ctctctgaag aaaagcagcc	2040
	actcctcatg gagaaagagg attaccacag ctigtatcag agccatttat aaaaggctta	2100
50	ggcaalagag tagggccaaa aagcctgacc tcaactctaac tcaaagtaat gtccaggttc	2160
	ccagagaata tctgctggta tttttctgta aagaccattt gcaaaattgt aacctaatc	2220
	aaagtgtagc cttcttccaa ctcaggtaga acacacctgt ctttgtcttg ctgttttcac	2280
55	tcagcccttt taacattttc ccctaagccc atatgtctaa ggaaaggatg ctatttggta	2340
	atgaggaact gttatttcta tgtgaattaa agtgctctta tttt	2384
60	<210> 23	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	
	<223> La secuencia artificial es una sonda	

ES 2 310 275 T3

	<400> 23	
	cctgaggcac ctggaaggag gctgcagtgt	30
5	<210> 24	
	<211> 27	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> La secuencia artificial es una sonda	
15	<400> 24	
	atcaaaaaac aagcatggcc tcacacc	27
20	<210> 25	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> La secuencia artificial es un cebador	
30	<400> 25	
	ctgcttcgct gcatcgctga aa	22
35	<210> 26	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> La secuencia artificial es un cebador	
45	<400> 26	
	cagactcctc cagtcagga ca	22
50	<210> 27	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> La secuencia artificial es un cebador	
60	<400> 27	
	gcttggtggt taaaacttac c	21
65	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 310 275 T3

	<220>	
	<223> La secuencia artificial es un cebador	
5	<400> 28	
	tgaacagttc tgttggtgta	20
10	<210> 29	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> La secuencia artificial es una sonda	
	<400> 29	
20	ctgcctgcct atgtgacgac aatccgg	27
	<210> 30	
25	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> La secuencia artificial es un cebador	
	<400> 30	
35	caattttggt ggagaacccg	20
	<210> 31	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> La secuencia artificial es un cebador	
	<400> 31	
50	gctgtcggag gtatatggtg	20
	<210> 32	
	<211> 28	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> La secuencia artificial es una sonda	
	<400> 32	
65	cattcagag agtaacatgg actacaca	28
	<210> 33	
	<211> 21	

ES 2 310 275 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> La secuencia artificial es un cebador	
	<400> 33	
10	gcaagtgccca atgatcagag g	21
	<210> 34	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> La secuencia artificial es un cebador	
	<400> 34	
25	atatagactc aggtatacac act	23
	<210> 35	
	<211> 27	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> La secuencia artificial es una sonda	
35	<400> 35	
40	tcccatcaga atccaacaa gaggaag	27
45		
50		
55		
60		
65		