



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 317 713**

⑫ Número de solicitud: 200401428

⑬ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **07.06.2004**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2009**

Fecha de la concesión: **18.11.2009**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.12.2009**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.12.2009

⑲ Titular/es: **Universidade da Coruña
O.T.R.I.-Servicios Centrales de Investigación
Campus de Elviña, s/n
15071 A Coruña, ES**

⑳ Inventor/es: **Castro Beiras, Alfonso;
Hermida Prieto, Manuel;
Muñiz García, Javier y
Montserrat Iglesias, Lorenzo**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Método para diagnosticar o determinar la predisposición genética a desarrollar miocardiopatía hipertrófica.**

㉓ Resumen:

Método para diagnosticar o determinar la predisposición genética a desarrollar miocardiopatía hipertrófica.

El método para diagnosticar o determinar la predisposición genética de un sujeto a desarrollar miocardiopatía hipertrófica (MCH), tanto familiar como esporádica, se basa en la identificación de mutaciones puntuales en el gen MYH7, que codifica la cadena pesada de la beta miosina cardíaca humana, asociadas con el desarrollo de MCH. Dicho método constituye una herramienta de diagnóstico útil que es particularmente importante cuando se estudian sujetos asintomáticos con sospecha de tener la enfermedad. Los sujetos sintomáticos pueden ser diagnosticados por un médico. Los sujetos asintomáticos procedentes de familias con una historia de MCH pueden ser estudiados selectivamente usando este método lo que permite disponer de un diagnóstico antes de la aparición de la enfermedad. A los individuos que posean la mutación asociada con la enfermedad se les pueden aconsejar pautas de comportamiento apropiadas.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método para diagnosticar o determinar la predisposición genética a desarrollar miocardiopatía hipertrófica.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con un método para determinar *in vitro* la predisposición genética de un sujeto a desarrollar miocardiopatía hipertrófica o para diagnosticar un sujeto de dicha enfermedad, basado en un ensayo genético, extracorpóreo, de una muestra biológica procedente de dicho sujeto, que comprende detectar la presencia o ausencia
10 de una mutación puntual de un nucleótido, asociada con dicha enfermedad, en el gen MYH7 que codifica la cadena pesada de la beta miosina cardíaca humana.

Antecedentes de la invención

La miocardiopatía hipertrófica (MCH) es una enfermedad autosómica dominante que representa un grupo hetero-
15 géneo de enfermedades del músculo cardíaco cuyos síntomas y manifestaciones clínicas incluyen grados variables de hipertrofia y alteración de la función sistólica y diastólica. La MCH puede ser familiar (MCHF) o esporádica (MCHE). Los individuos afectados por dicha enfermedad pueden ser sintomáticos o asintomáticos. La prevalencia es de aproximadamente 1/500 en la población general y la consecuencia más seria es la muerte súbita de los individuos portadores y aparentemente sanos.
20

La MCHF es una enfermedad hereditaria del músculo cardíaco que se caracteriza por un incremento en la masa ventricular y una alteración de la función sistólica y diastólica. La patología de la MCHF es el resultado de las consecuencias fisiológicas de la alteración de la función sistólica y diastólica, y sus características patológicas están bien establecidas (Maron BJ & Epstein SE. 1980. *Amer. J. Cardiol.* 45:141-154; Braunwald E. 1997. *Heart Disease: a textbook of cardiovascular medicine*. WB Saunders; Philadelphia. p 1404). Además del hallazgo clásico del engrosamiento asimétrico del septo interventricular también puede observarse la hipertrofia de la pared anterior del ventrículo izquierdo y del apex cardíaco. La distribución anatómica y la severidad de la hipertrofia pueden ser muy variables. Con frecuencia se observa fibrosis en el ventrículo hipertrofiado y en la región del septo.
30

La mayoría de las anomalías histológicas características de la MCHF tienen que ver con la desorganización de las miofibrillas en los miocitos. Los miocitos pueden hipertrofiarse hasta diez o veinte veces el diámetro normal de una célula cardíaca (Becker AE. 1989. *Pathology of Cardiomyopathies*, en *Cardiomyopathies: Clinical Presentation, Differential Diagnosis, and Management*, Shaver JA ed., F. A. Davis Co., New York, pp. 9-31; Braunwald E. 1997. *Heart Disease: a textbook of cardiovascular medicine*. WB Saunders; Philadelphia. p 1404).
35

Actualmente se admite que la MCH es el resultado de mutaciones en genes que codifican las proteínas del aparato contráctil. De hecho, entre las posibles causas de dicha enfermedad, se reconoce la existencia de mutaciones en los siguientes genes: cadena pesada de la beta miosina cardíaca humana (MYH7); Proteína de unión a la miosina (MYBPC3); Troponina T (TNNT2); Troponina I (TNNI3); Troponina C (TNNC 1); Alfa tropomiosina (TPM1), Cadena reguladora ligera de la miosina (MYL2); Cadena ligera esencial de la miosina (MYL3), Actina cardíaca alfa (ACTC) (Richard P *et al.*; 2003 *Circulation*. 107(17):2227-32); Titina (TTN) (Satoh *et al.* 1999. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 411); Cadena pesada de la alfa miosina (MYH6) (Tanigawa *et al.* 1990.) *Cell* 62, 991); Sub-unidad no catalítica gamma 2, activada por AMP, de la proteína kinasa (PRKAG2) (Gollob *et al.* (2001) *N Engl J Med* 344, 1823; Blair *et al.* 2001 *Hum Mol Genet* 10, 1215); Quinasa 2 de la cadena ligera de la miosina (MYLK2) (Davis *et al.* 2001 *Cell* 107, 631); Genoma mitocondrial (Arbustini *et al.* *Heart* 1998; 80:548-58).
40
45

Diversos análisis genéticos han permitido identificar mutaciones en el gen MYH7, que codifica la cadena pesada de la beta miosina cardíaca humana, asociadas a la aparición de MCHF (Seidman CE & Seidman JG. 1991. *Mol. Biol. Med.* 8:159-166; Tanigawa *et al.* 1990. *Cell* 62:991-998; Geisterfer-Lowrance *et al.* 1990. *Cell* 61:999-1006), habiéndose identificado más de 100 mutaciones causantes de MCHF (<http://www.cardiogenomics.org>).
50

Actualmente el diagnóstico de la MCHF se basa en los datos clínicos, fundamentalmente el ecocardiograma. Sin embargo, este sistema no permite detectar los casos de muerte súbita que, en general, están provocados por la presencia de una mutación en alguno de los genes implicados. Como es conocido, la MCHF es la primera causa de muerte súbita en personas jóvenes y, dada su prevalencia (1/500), puede estimarse que el número de portadores de alguna de las mutaciones responsables de dicha enfermedad en nuestro país se acerca a las 75.000 personas.
55

El gran tamaño de los genes relacionados hasta la fecha con la aparición de MCH, por ejemplo, el gen MYH7 (28.425 pares de bases) dificulta en gran medida la identificación de mutaciones asociadas con MCH. Esta invención proporciona un método sencillo y rápido para la identificación de algunas mutaciones en el gen MYH7 que pueden ser causa de MCH.
60

65 **Compendio de la invención**

La presente invención se basa en el descubrimiento de una nueva mutación puntual en el gen MYH7 asociada con una mayor predisposición de que el sujeto que la porta desarrolle MCH. La nueva mutación puntual en el gen

MYH7 asociada con el desarrollo o la predisposición a desarrollar MCH identificada en esta invención es la mutación Met388Thr, la cual se definirá detalladamente más adelante.

La identificación de la presencia de dicha mutación en el gen MYH7 en un sujeto con MCH permite tomar medidas preventivas en el caso de los portadores, tales como ejercicio, medicación, consejo genético, etc. En los casos en los que se identifiquen mutaciones consideradas de alto riesgo podrán tomarse medidas adicionales tales como la implantación de un desfibrilador con el fin de evitar la muerte súbita del sujeto portador de tales mutaciones.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un método para determinar *in vitro* la predisposición genética de un sujeto a desarrollar MCH que comprende analizar el ácido nucleico contenido en una muestra biológica procedente de dicho sujeto para detectar la presencia o ausencia de una mutación puntual en el gen MYH7 asociada con la MCH, en el que dicha mutación es Met388Thr.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de diagnóstico *in vitro* de MCH que comprende obtener una muestra biológica procedente de un sujeto en donde dicha muestra biológica contiene ácido nucleico y diagnosticar el sujeto de MCH mediante la detección de la presencia de una mutación puntual en el gen MYH7, en el que dicha mutación es Met388Thr, como indicador de la enfermedad.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método no invasivo para diagnosticar MCH en un sujeto que comprende aislar, a partir de una muestra de sangre procedente de dicho sujeto, un fragmento del ácido nucleico presente en dicha muestra de sangre que comprende, al menos, una de las regiones del gen MYH7 en donde se encuentra la mutación puntual responsable de dicha mutación Met388Thr, y diagnosticar el sujeto de MCH mediante la detección de la presencia o ausencia de, al menos, dicha mutación, como indicador de la enfermedad.

La invención proporciona, por tanto, un método para determinar *in vitro* la predisposición genética de un sujeto a desarrollar MCH, o para diagnosticar un sujeto de MCH, bien sea familiar (MCHF) o esporádica (MCHE), basado en la detección de una nueva mutación puntual en el gen MYH7 relacionada con la aparición de dicha enfermedad. La detección de la mutación en una persona con riesgo o predisposición genética de desarrollar MCH puede realizarse de forma relativamente sencilla y rápida usando el método proporcionado por esta invención.

El método proporcionado por esta invención constituye una herramienta útil de diagnóstico y/o pronóstico que resulta particularmente importante cuando se aplica sobre sujetos asintomáticos de los cuales se sospecha que pueden tener la enfermedad. Los sujetos sintomáticos tienen muchas más probabilidades de ser diagnosticados adecuadamente por un médico. Los sujetos asintomáticos de familias que tengan una historia de MCHF podrían ser diagnosticados usando el método de esta invención lo que permitiría su diagnóstico antes de la aparición de los síntomas. A los sujetos en los que se detecte una mutación responsable de MCHF se les puede aconsejar unas pautas de comportamiento que probablemente prolonguen su vida; por ejemplo, evitar el ejercicio intenso, medicación, etc., y, en su caso, implantarles un desfibrilador.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención objeto de esta solicitud de patente, se expone, a continuación, el significado de algunos términos y expresiones tal como se utilizan en el contexto de la presente invención.

El término “MCH” se refiere a la miocardiopatía hipertrófica e incluye la miocardiopatía hipertrófica familiar (MCHF) y la miocardiopatía hipertrófica esporádica (MCHE).

El término “predisposición genética” se refiere a la probabilidad de que un sujeto desarrolle una patología determinada (en este caso, MCH); a modo ilustrativo, un sujeto con una predisposición genética elevada tendrá más probabilidades que la media para desarrollar dicha patología, mientras que un sujeto con una predisposición genética reducida tendrá menos probabilidades que la media para desarrollar dicha patología.

El término “sujeto” se refiere a un ser humano, de sexo masculino o femenino, de cualquier raza o edad.

El término “proteína” se refiere a una cadena molecular de aminoácidos, unidos por enlaces covalentes o no covalentes. El término incluye todas las formas de modificaciones post-traduccionales, por ejemplo glicosilación, fosforilación o acetilación. Los términos “péptido” y “polipéptido” se refieren a cadenas moleculares de aminoácidos que representan un fragmento proteico. Los términos “proteína”, “péptido” y “polipéptido”, se usan indistintamente.

El término “MYH7” se refiere al gen que codifica la proteína denominada “cadena pesada de la beta miosina cardíaca humana”. La secuencia de nucleótidos del gen MYH7 es conocida [Jaenicke T *et al.* 1990. Genomics 8:194-206; NCBI, número de acceso M57965, versión M57965.2 (GI: 24429600)].

El término “gen” se refiere a una cadena molecular de desoxirribonucleótidos, que codifica una proteína.

El término “DNA” se refiere al ácido desoxirribonucleico. Una secuencia de DNA es una secuencia de desoxirribonucleótidos.

El término “cDNA” se refiere a una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de mRNA.

El término “RNA” se refiere al ácido ribonucleico. Una secuencia de RNA es una secuencia de ribonucleótidos.

El término “mRNA” se refiere al ácido ribonucleico mensajero, que es la fracción del RNA total que se traduce a proteínas.

El término “secuencia de nucleótidos” o “secuencia nucleotídica” se refiere indistintamente a una secuencia de ribonucleótidos (RNA) o de desoxirribonucleótidos (DNA).

El término “mutación puntual” se refiere a un SNP (single nucleotide polymorphism), es decir, una variante en una única base de una secuencia de nucleótidos determinada.

Para la nomenclatura de las mutaciones puntuales se han seguido las recomendaciones contenidas en las siguientes referencias: (i) den Dunnen JT, Antonarakis SE. 2000. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. Hum Mutat. 15(1):7-12; y (ii) Antonarakis SE. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. Hum Mutat. 11(1):1-3.

Invención

La invención proporciona, en general, un método para evaluar *in vitro* la predisposición genética de un sujeto a desarrollar MCH. Dicho método permite identificar aquellos sujetos que, dentro de un grupo o población de sujetos, presentan una mayor predisposición genética de desarrollar MCH. Dicho método puede utilizarse tanto con fines de diagnóstico (método de diagnóstico) como con fines de pronóstico (método de pronóstico). Un método de diagnóstico se refiere a un ensayo realizado sobre un sujeto al que previamente se le ha determinado su pertenencia a un grupo de riesgo de padecer MCH debido a que presente síntomas o a los resultados de otro análisis diferente. Un método de pronóstico se refiere a un método que ayuda a predecir, al menos en parte, el posible desarrollo de la MCH en un sujeto. A modo ilustrativo, se puede analizar un sujeto al que previamente no se le ha diagnosticado MCH, o que carece de síntomas, con el fin de obtener información sobre la probabilidad de que dicho individuo desarrolle MCH.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un *método para determinar in vitro la predisposición genética de un sujeto a desarrollar MCH* que comprende analizar el ácido nucleico contenido en una muestra biológica procedente de dicho sujeto para detectar la presencia o ausencia de una mutación puntual en el gen MYH7 asociada con la MCH, en el que dicha mutación puntual asociada con la MCH, en adelante mutación puntual de la invención, es la mutación Met388Thr.

En una realización particular, la secuencia de nucleótidos del gen MYH7 comprende la SEQ. ID. NO: 1. En este caso, el cambio de nucleótidos relacionado con la mutación puntual de la invención es el siguiente:

<u>Mutación</u>	<u>Cambio del nucleótido</u>
Met388Thr	10127T>C

La presencia de dicha mutación puntual de la invención en el ácido nucleico presente en la muestra biológica procedente del sujeto ensayado es indicativa de la existencia de una mayor predisposición genética de dicho sujeto a desarrollar MCH que la media, o de que dicho sujeto puede ser diagnosticado de MCH o de que dicho sujeto ha desarrollado MCH.

La puesta en práctica de dicho método comprende la obtención previa de una muestra biológica del sujeto a ensayar y analizar el ácido nucleico contenido en dicha muestra biológica para detectar la presencia o ausencia de la mutación puntual de la invención mediante cualquier método apropiado para detectar tales mutaciones.

La muestra biológica procedente del sujeto a ensayar puede ser cualquier muestra biológica de dicho sujeto que contenga ácido nucleico. El ácido nucleico presente en dicha muestra biológica puede ser DNA, por ejemplo, DNA genómico (gDNA) o cDNA, o RNA, por ejemplo, mRNA. Para analizar gDNA se puede utilizar prácticamente cualquier muestra biológica que contenga gDNA, por lo que muestras puras de eritrocitos de mamíferos no pueden ser utilizadas. Asimismo, para analizar cDNA o mRNA la muestra biológica debe ser obtenida de células o tejidos que expresen MYH7. A modo ilustrativo, la muestra biológica que contiene ácido nucleico procedente del sujeto a ensayar puede ser una muestra de tejido o de sangre de dicho sujeto. En una realización particular, dicha muestra biológica se obtiene a partir de células nucleadas de sangre periférica del sujeto a ensayar.

El ácido nucleico contenido en la muestra biológica procedente del sujeto a ensayar puede ser aislado por métodos convencionales mediante el empleo de kits comerciales que permiten el aislamiento de ácidos nucleicos. Algunos de los sistemas comerciales para la extracción de ácidos nucleicos están comercializados por diversas compañías, tales

como Qiagen y Amersham Biosciences, por citar dos ejemplos. Los protocolos de extracción están bien establecidos en los manuales de instrucciones que se ofrecen junto con los kits de extracción de ácidos nucleicos suministrados por las empresas mencionadas.

- 5 Muchos de los métodos aquí descritos para detectar la presencia o ausencia de una mutación puntual de la invención requieren la amplificación de la secuencia diana del ácido nucleico presente en la muestra biológica procedente del sujeto a ensayar, por ejemplo, la amplificación previa de un fragmento del gen MYH7 que comprende la región en donde se desea estudiar la presencia o ausencia de la mutación puntual de la invención.
- 10 Dicha amplificación puede realizarse por cualquier técnica conocida, preferentemente, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o cualquiera de sus variantes, por ejemplo, PCR anidada o nested-PCR. Información sobre la realización de PCR y sus variantes puede encontrarse en las patentes norteamericanas US 4.965.188, US 4.800.159, US 4.683.202 y US 4.683.195, así como en las publicaciones de Ausubel *et al.* eds. *Shorts Protocols in Molecular Biology*, 3rd edition, Wiley, 1995; e Innis *et al.*, eds., *PCR Protocols*, Academic Press, 1990.
- 15 Otros métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Wu & Wallace. 1989. *Genomics* 4:560-569; Landegren *et al.* 1988. *Science* 241:1077-1080), la amplificación por desplazamiento de banda (G. Walker *et al.* 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:392-396; G. Walker *et al.* 1992. *Nucleic Acid Res.* 20:1691-1696), la amplificación basada en la transcripción (D. Kwoh *et al.* 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), la replicación de secuencia auto-sostenida (3SR) (J. Guatelli *et al.* 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), el sistema de la replicasa Q β (P. Lizardi *et al.* 1988. *BioTechnology* 6:1197-1202), la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) (R. Lewis. 1992. *Genetic Engineering News* 12(9):1) y la amplificación por la polimerasa del fago phi29 (L. Blanco *et al.* 1989. *J Biol Chem.* 264:8935-8940).
- 20 La presencia o ausencia de la mutación puntual de la invención en el ácido nucleico presente en la muestra biológica procedente del sujeto a ensayar se puede detectar por métodos convencionales, por ejemplo, mediante el empleo de sondas de oligonucleótidos marcadas con un grupo marcador detectable o mediante reacciones enzimáticas específicas.
- 25 En una realización particular, la determinación de la presencia o ausencia de la mutación puntual de la invención en el ácido nucleico presente en la muestra biológica procedente del sujeto a ensayar se realiza mediante el empleo de una sonda de oligonucleótidos específica marcada con un grupo marcador detectable. Se han descrito numerosos ensayos que utilizan sondas marcadas, los cuales pueden ser utilizados en la puesta en práctica de la presente invención (véanse, por ejemplo, las patentes norteamericanas US 4.302.204, US 4.358.535, US 4.563.419 o US 4.994.373). A modo ilustrativo, en una realización concreta, dicha mutación puntual de la invención se detecta mediante el empleo de una sonda de nucleótidos fijada sobre un soporte sólido, en donde dicha sonda de nucleótidos se selecciona entre una sonda de nucleótidos que es completamente complementaria a la secuencia normal de nucleótidos que codifica la cadena pesada de la beta miosina cardíaca humana o a un fragmento de la misma que contiene la región donde se desea estudiar la presencia o ausencia de mutación puntual, y una sonda de nucleótidos que es completamente complementaria a la secuencia de nucleótidos que codifica para una cadena pesada de la beta miosina cardíaca humana mutada (portadora de la mutación a detectar) o a un fragmento de la misma que contiene la región donde se desea estudiar la presencia o ausencia de mutación puntual, y detectar la presencia o ausencia de hibridación.
- 30 En otra realización particular, la determinación de la presencia o ausencia de la mutación puntual de la invención en el ácido nucleico presente en la muestra biológica procedente del sujeto a ensayar se realiza mediante una reacción enzimática específica para detectar polimorfismos, por ejemplo, mediante digestión con enzimas de restricción y análisis de los fragmentos de restricción (RFLP) (véanse, por ejemplo, las patentes norteamericanas US 5.324.631 y US 5.645.995). A modo ilustrativo, la mutación puntual de la invención puede ser detectada mediante el uso de una enzima de restricción que reconoce específicamente el nucleótido donde reside la mutación puntual asociada a la MCH, verificándose posteriormente la presencia o ausencia de corte de dicha enzima de restricción mediante la separación de los fragmentos de restricción por electroforesis en un gel de agarosa o poliacrilamida (véanse los Ejemplos que acompañan a esta descripción).
- 35 En otra realización particular, la determinación de la presencia o ausencia de la mutación puntual de la invención en el ácido nucleico presente en la muestra biológica procedente del sujeto a ensayar se realiza mediante una reacción enzimática específica para detectar polimorfismos, por ejemplo, mediante digestión con enzimas de restricción y análisis de los fragmentos de restricción (RFLP) (véanse, por ejemplo, las patentes norteamericanas US 5.324.631 y US 5.645.995). A modo ilustrativo, la mutación puntual de la invención puede ser detectada mediante el uso de una enzima de restricción que reconoce específicamente el nucleótido donde reside la mutación puntual asociada a la MCH, verificándose posteriormente la presencia o ausencia de corte de dicha enzima de restricción mediante la separación de los fragmentos de restricción por electroforesis en un gel de agarosa o poliacrilamida (véanse los Ejemplos que acompañan a esta descripción).
- 40 En otra realización particular, la determinación de la presencia o ausencia de la mutación puntual de la invención en el ácido nucleico presente en la muestra biológica procedente del sujeto a ensayar se realiza mediante una reacción enzimática específica para detectar polimorfismos, por ejemplo, mediante digestión con enzimas de restricción y análisis de los fragmentos de restricción (RFLP) (véanse, por ejemplo, las patentes norteamericanas US 5.324.631 y US 5.645.995). A modo ilustrativo, la mutación puntual de la invención puede ser detectada mediante el uso de una enzima de restricción que reconoce específicamente el nucleótido donde reside la mutación puntual asociada a la MCH, verificándose posteriormente la presencia o ausencia de corte de dicha enzima de restricción mediante la separación de los fragmentos de restricción por electroforesis en un gel de agarosa o poliacrilamida (véanse los Ejemplos que acompañan a esta descripción).
- 45 Otras técnicas apropiadas para detectar la mutación puntual de la invención incluyen la secuenciación directa de nucleótidos (Ausubel *et al.* eds. *Shorts Protocols in Molecular Biology*, 3rd edition, Wiley, 1995; Sambrook *et al.* 1989. *Molecular Cloning* 2nd ed. Chap. 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press), que puede realizarse por cualquier método apropiado, por ejemplo, mediante el método de secuenciación de didesoxinucleótidos (Sanger), secuenciación química (Maxam & Gilbert) o variantes de los mismos; minisequenciación directa (US 5.846.710, US 5.888.819, Syvanen *et al.* 1993, *Am. J. Hum. Genet.* 52:46-59, Shumaker *et al.* 1996. *Human Mut.* 7:346-354, Pastinen *et al.* 1997. *Genome Res.* 7:606-614); ensayos de hibridación en array, por ejemplo, el ensayo múltiple de diagnóstico específico de alelo (MASDA) (US 5.834.181; Shuber *et al.* 1997. *Hum. Molec. Genet.* 6:337-347); ensayos dependientes de discriminación de alelos basada en hibridación utilizando, por ejemplo, sondas TaqMan (US 5.962.233; Livak *et al.* 1995. *Nature Genet.* 9:341-342) o Molecular Beacons (US 5.925.517, Tyagi *et al.*, *Nature Biotech.* 16:49-53); electroforesis en gel diagonal de fragmentos de restricción dispuestos en placas de microtitulación (MADGE) (Day & Humpohries. 1994. *Anal. Biochem.* 222:389-395), transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET) (US 5.945.283, Chen *et al.* 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10756-10761).
- 50
- 55
- 60
- 65

La relación de métodos para detectar mutaciones puntuales previamente mencionada es únicamente ilustrativa y no pretende ser exhaustiva. Los expertos en la materia entenderán que cualquier otro método que permita detectar una mutación puntual o un SNP puede ser utilizado para la puesta en práctica de la presente invención y cae dentro del espíritu de la misma.

Adicionalmente, si se desea, se puede detectar si el sujeto es heterocigótico u homocigótico para una mutación puntual determinada, es decir, detectar la presencia o ausencia de dichas mutaciones puntuales en ambos cromosomas del sujeto. En general, la presencia de 2 copias de la misma mutación puntual asociada a MCH (es decir, individuos homocigóticos para dicha mutación puntual) puede indicar un mayor riesgo de desarrollar MCH que en un individuo heterocigótico para dicha mutación puntual.

La mutación puntual de la invención se ha identificado mediante un ensayo (Ejemplo 1) consistente en la amplificación previa, mediante PCR, de una secuencia diana del gen MYH7 contenido en una muestra de ácido nucleico presente en una muestra de sangre periférica de un sujeto diagnosticado de MCH, seguido de un análisis de polimorfismo conformacional de una hebra (SSCP) y secuenciación directa de los productos de amplificación que mostraron un patrón de movilidad anormal en el gel de SSCP bajo cualquiera de las condiciones ensayadas. La confirmación de la mutación puntual se realizó mediante un análisis RFLP o mediante el diseño de iniciadores degenerados específicos para la mutación puntual en cuestión.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un *método de diagnóstico in vitro de MCH* que comprende obtener una muestra biológica procedente de un sujeto en donde dicha muestra biológica contiene ácido nucleico y diagnosticar el sujeto de MCH mediante la detección de la presencia de la mutación puntual de la invención en dicho ácido nucleico, es decir, de la mutación Met388Thr.

Este método comprende, por tanto, la obtención de una muestra biológica que contiene ácido nucleico del sujeto a ensayar y analizar el ácido nucleico presente en dicha muestra biológica para detectar la presencia o ausencia de la mutación puntual de la invención mediante cualquier método apropiado para detectar tal mutación. La muestra biológica procedente del sujeto debe presentar las mismas características que las mencionadas previamente en relación con el método *in vitro* para determinar la predisposición genética de un sujeto a desarrollar MCH previamente descrito. Generalmente, antes de proceder a detectar la presencia o ausencia de la mutación puntual de la invención se procede a amplificar la secuencia diana del ácido nucleico presente en la muestra biológica procedente del sujeto a ensayar, es decir, a amplificar un fragmento del gen MYH7 que comprende la región en donde se desea estudiar la presencia o ausencia de la mutación puntual de la invención. Dicha amplificación puede realizarse por cualquiera de las técnicas conocidas mencionadas previamente, por ejemplo, mediante PCR o cualquiera de sus variantes. El análisis del ácido nucleico para detectar la presencia o ausencia de la mutación puntual de la invención asociada con la MCH se puede realizar por cualquiera de las técnicas previamente mencionadas. La existencia de la mutación puntual de la invención en el ácido nucleico presente en la muestra biológica procedente del sujeto ensayado permite diagnosticar al sujeto de MCH.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un *método no invasivo para diagnosticar MCH* en un sujeto que comprende aislar, a partir de una muestra de sangre procedente de dicho sujeto, un fragmento del ácido nucleico presente en dicha muestra de sangre que comprende, al menos, la región del gen MYH7 en donde se encuentra la mutación puntual de la invención asociada a MCH, es decir, la mutación Met388Thr, y diagnosticar el sujeto de MCH mediante la detección de la presencia o ausencia de dicha mutación puntual de la invención en dicho fragmento de ácido nucleico.

En una realización particular, dicho método comprende la obtención de una muestra de sangre, por ejemplo, de sangre periférica, del sujeto a ensayar, la amplificación de un fragmento del ácido nucleico presente en dicha muestra de sangre que comprende, al menos, la región del gen MYH7 en donde puede encontrarse la mutación puntual de la invención, analizar la presencia o ausencia de dicha mutación puntual de la invención, y, en su caso, diagnosticar al sujeto de MCH. Tanto la amplificación del ácido nucleico como su análisis para detectar la presencia o ausencia de la mutación puntual de la invención se pueden realizar mediante cualquiera de los métodos previamente descritos. Adicionalmente, si se desea, dicho método comprende la evaluación de los síntomas clínicos de la MCH en el sujeto que está siendo estudiado.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un *kit*, en particular, un kit útil para determinar la predisposición de un sujeto a desarrollar MCH o para diagnosticar un sujeto de MCH, que comprende, al menos, un reactivo específico para detectar la presencia o ausencia de, al menos, la mutación puntual de la invención, es decir, la mutación Met388Thr.

En una realización particular, dicho reactivo específico para detectar la presencia o ausencia de la mutación puntual de la invención en el gen MYH7 que codifica para la proteína cadena pesada de la beta miosina cardiaca humana, es una sonda de nucleótidos que permite distinguir el alelo que contiene una T en la posición 10127 de la SEQ. ID. NO: 1 del alelo que contiene una C en dicha posición. En otra realización particular, dicho kit comprende, al menos, una enzima de restricción que permite distinguir el alelo que contiene una T en la posición 10127 de la SEQ. ID. NO: 1 del alelo que contiene una C en dicha posición, tal como, por ejemplo, la enzima de restricción NlaIII.

En otra realización particular, el kit proporcionado por esta invención comprende, al menos, un oligonucleótido iniciador útil para la amplificación de un fragmento de ácido nucleico, tal como un fragmento del gen MYH7 que comprende la región en donde se desea estudiar la presencia o ausencia de la mutación puntual de la invención. En una realización particular, dicho oligonucleótido iniciador se selecciona del grupo formado por los oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ. ID. NO: 20, SEQ. ID. NO: 21, y sus mezclas. Dichos oligonucleótidos iniciadores constituyen un aspecto adicional de la presente invención.

Los oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ. ID. NO: 20 (directo) y SEQ. ID. NO: 21 (inverso) permiten amplificar un fragmento correspondiente al exón 13 del gen MYH7 útil para identificar la mutación Met388Thr (10127T>C).

En otro aspecto, la invención se relaciona con un *biochip*, en particular, un biochip útil para determinar la predisposición de un sujeto a desarrollar MCH o para diagnosticar un sujeto de MCH, que comprende, al menos, un reactivo específico para detectar la presencia o ausencia de, al menos, la mutación puntual de la invención, es decir, la mutación Met388Thr en el gen MYH7, soportado sobre un soporte sólido.

En una realización particular, el reactivo específico para detectar la presencia o ausencia de la mutación puntual de la invención, en particular, en la secuencia de nucleótidos del gen MYH7 que codifica la cadena pesada de la beta miosina cardíaca humana, es dicha sonda previamente mencionada en relación con el kit.

En otra realización particular, dicho biochip comprende, al menos, un oligonucleótido iniciador útil para la amplificación de un fragmento de ácido nucleico, tal como un fragmento del gen MYH7 que comprende la región en donde se desea estudiar la presencia o ausencia de la mutación puntual de la invención. En una realización particular, dicho oligonucleótido iniciador se selecciona del grupo formado por los oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ. ID. NO: 20, SEQ. ID. NO: 21, y sus mezclas.

Dicho biochip puede contener, además de, al menos uno de dichos oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ. ID. NO: 20, SEQ. ID. NO: 21, uno o más oligonucleótidos iniciadores seleccionados entre los identificados como SEQ. ID. NO: 1-SEQ. ID. NO: 19, SEQ. ID. NO: 22-SEQ. ID. NO: 35, SEQ. ID. NO: 36, SEQ. ID. NO: 37, SEQ. ID. NO: 38-SEQ. ID. NO: 63, SEQ. ID. NO: 64, SEQ. ID. NO: 65 y SEQ. ID. NO: 66-SEQ. ID. NO: 85. Estos oligonucleótidos iniciadores amplifican fragmentos incluidos en distintos exones del gen MYH7 (Tabla 1).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 317 713 B1

TABLA 1

Oligonucleótidos iniciadores para la amplificación de fragmentos del gen MYH7

Exón	SEQ. ID. NO:	Sentido
Ex 3	SEQ. ID. NO: 2	Directo
	SEQ. ID. NO: 3	Inverso
Ex 4	SEQ. ID. NO: 4	Directo
	SEQ. ID. NO: 5	Inverso
Ex 5	SEQ. ID. NO: 6	Directo
	SEQ. ID. NO: 7	Inverso
Ex 6	SEQ. ID. NO: 8	Directo
	SEQ. ID. NO: 9	Inverso
Ex 7	SEQ. ID. NO: 10	Directo
	SEQ. ID. NO: 11	Inverso
Ex 8+9	SEQ. ID. NO: 12	Directo
	SEQ. ID. NO: 13	Inverso
Ex 10	SEQ. ID. NO: 14	Directo
	SEQ. ID. NO: 15	Inverso
Ex 11	SEQ. ID. NO: 16	Directo
	SEQ. ID. NO: 17	Inverso
Ex 12	SEQ. ID. NO: 18	Directo
	SEQ. ID. NO: 19	Inverso
Ex 13	SEQ. ID. NO: 20	Directo
	SEQ. ID. NO: 21	Inverso
Ex 14	SEQ. ID. NO: 22	Directo
	SEQ. ID. NO: 23	Inverso
Ex 15	SEQ. ID. NO: 24	Directo
	SEQ. ID. NO: 25	Inverso
Ex 16	SEQ. ID. NO: 26	Directo
	SEQ. ID. NO: 27	Inverso
Ex 17	SEQ. ID. NO: 28	Directo
	SEQ. ID. NO: 29	Inverso
Ex 18	SEQ. ID. NO: 30	Directo
	SEQ. ID. NO: 31	Inverso
Ex 19	SEQ. ID. NO: 32	Directo
	SEQ. ID. NO: 33	Inverso
Ex 20	SEQ. ID. NO: 34	Directo
	SEQ. ID. NO: 35	Inverso
Ex 21	SEQ. ID. NO: 36	Directo
	SEQ. ID. NO: 37	Inverso
Ex 22 A	SEQ. ID. NO: 38	Directo
	SEQ. ID. NO: 39	Inverso
Ex 22 B	SEQ. ID. NO: 40	Directo
	SEQ. ID. NO: 41	Inverso
Ex 23 A	SEQ. ID. NO: 42	Directo

ES 2 317 713 B1

	SEQ. ID. NO: 43	Inverso
Ex 23 B	SEQ. ID. NO: 44	Directo
	SEQ. ID. NO: 45	Inverso
Ex 24	SEQ. ID. NO: 46	Directo
	SEQ. ID. NO: 47	Inverso
Ex 25	SEQ. ID. NO: 48	Directo
	SEQ. ID. NO: 49	Inverso
Ex 26	SEQ. ID. NO: 50	Directo
	SEQ. ID. NO: 51	Inverso
Ex 27 A	SEQ. ID. NO: 52	Directo
	SEQ. ID. NO: 53	Inverso
Ex 27 B	SEQ. ID. NO: 54	Directo
	SEQ. ID. NO: 55	Inverso
Ex 28	SEQ. ID. NO: 56	Directo
	SEQ. ID. NO: 57	Inverso
Ex 29	SEQ. ID. NO: 58	Directo
	SEQ. ID. NO: 59	Inverso
Ex 30	SEQ. ID. NO: 60	Directo
	SEQ. ID. NO: 61	Inverso
Ex 31	SEQ. ID. NO: 62	Directo
	SEQ. ID. NO: 63	Inverso
Ex 32	SEQ. ID. NO: 64	Directo
	SEQ. ID. NO: 65	Inverso
Ex 33	SEQ. ID. NO: 66	Directo
	SEQ. ID. NO: 67	Inverso
Ex 34 A	SEQ. ID. NO: 68	Directo
	SEQ. ID. NO: 69	Inverso
Ex 34 B	SEQ. ID. NO: 70	Directo
	SEQ. ID. NO: 71	Inverso
Ex 35	SEQ. ID. NO: 72	Directo
	SEQ. ID. NO: 73	Inverso
Ex 36	SEQ. ID. NO: 74	Directo
	SEQ. ID. NO: 75	Inverso
Ex 37 A	SEQ. ID. NO: 76	Directo
	SEQ. ID. NO: 77	Inverso
Ex 37 B	SEQ. ID. NO: 78	Directo
	SEQ. ID. NO: 79	Inverso
Ex 38	SEQ. ID. NO: 80	Directo
	SEQ. ID. NO: 81	Inverso
Ex 39	SEQ. ID. NO: 82	Directo
	SEQ. ID. NO: 83	Inverso
Ex 40	SEQ. ID. NO: 84	Directo
	SEQ. ID. NO: 85	Inverso

ES 2 317 713 B1

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

5 *Estrategia para la detección de mutaciones puntuales en el gen MYH7*

1.1 *Estudio de familias*

10 Los miembros de las familias fueron evaluados mediante exploración física, electrocardiograma de 12 derivaciones y ecocardiografía de dos dimensiones. El diagnóstico de MCH se basó en la demostración de la existencia de engrosamiento ventricular y del septo superior al 112% del valor normal en ausencia de hipertensión arterial. Se confeccionó un árbol genealógico de cada paciente y a los familiares de primer grado se les ofreció la posibilidad de acudir a consulta. Se revisaron las historias clínicas de los familiares fallecidos en los casos en los que fue posible. En 15 los casos índice y familiares vivos, previo consentimiento informado se recogieron muestras de sangre periférica para extracción y conservación de ADN.

1.2 *Oligonucleótidos para amplificar el gen MYH7*

20 Los oligonucleótidos iniciadores utilizados para amplificar distintos fragmentos del gen MYH7 son los indicados en la Tabla 1 (mostrada antes).

25 1.3 *Amplificación de las secuencias de DNA*

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias del gen MYH7 a partir del DNA obtenido de una muestra de sangre periférica procedente de sujetos enfermos (pacientes) de MCH. Los iniciadores usados se relacionan listan en la Tabla 1.

30 Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ L con 500 ng de DNA en una mezcla de Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 200 μ M de cada dNTP, 0,2 μ M de cada desoxinucleótido y 1,5 unidades de Taq DNA polimerasa (QIAGEN). Las condiciones de la PCR fueron de un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación entre 58°C y 65°C durante 1 minuto y elongación a 74°C durante 1 minuto; al final de dichos ciclos se realizó una extensión a 72°C 35 durante 5 minutos.

1.4 *SSCP*

40 Se realizó un análisis SSCP de los productos de PCR en un sistema GenePhor (Pharmacia) siguiendo las indicaciones del fabricante. Todas las muestras se corrieron bajo 2 condiciones de temperatura (12°C y 20°C) y 2 condiciones de pH (8,3 y 9). Se usaron los iniciadores de la Tabla 1.

45 1.5 *Secuenciación directa de los productos de PCR*

Se realizó secuenciación directa del producto de PCR de todas las muestras que mostraron un patrón de movilidad anormal en el gel de SSCP bajo cualquiera de las condiciones estudiadas. En todos los casos se realizó la secuencia con el iniciador directo e inverso mediante secuenciación automática en un equipo Beckman CQ 2000XL y se siguieron 50 las instrucciones del fabricante. Se usaron los iniciadores que figuran en la Tabla 1.

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ2000 Dye terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, EEUU) y los iniciadores de la Tabla 1. Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se 55 analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. Los cambios observados en la secuencia se confirmaron mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. La confirmación posterior en dicho segundo producto de PCR de la misma muestra se llevó a cabo mediante el corte del producto de PCR con una enzima de restricción específica (RFLP) o mediante el diseño de un iniciador degenerado específico para la mutación.

60 Ejemplo 2

Identificación de una mutación en el exón 13 del gen MYH7 asociada con MCH

65 En dos miembros de la familia CS se encontró la mutación 10127T>C, es decir, un cambio de T (timina) por C (citosina) en el nucleótido 10127 (según la secuencia del gen MYH7 depositada en la NCBI con el número de acceso M57965, versión M57965.2 (GI: 24429600)] lo que provoca un cambio de metionina (Met) a treonina (Thr) en el aminoácido 388 de la cadena pesada de la beta miosina cardíaca humana (Met388Thr).

ES 2 317 713 B1

Esta mutación “missense” abole una diana de corte para la enzima de restricción NlaIII que está normalmente presente en el exón 13 del gen MYH7 lo que proporciona un método independiente para realizar el diagnóstico genético. Se amplificó la secuencia correspondiente al exón 13 del gen MYH7 a partir de DNA genómico obtenido de sangre periférica. Se usaron como iniciadores los oligonucleótidos identificados mediante la SEQ. ID. NO: 20 (directo) y la SEQ. ID. NO: 21 (inverso). El producto de PCR se digirió con NlaIII y posteriormente se sometió a electroforesis en gel de agarosa. La secuencia normal producía 2 fragmentos de 128 y 61 pares de bases (pb) respectivamente. La secuencia mutada carecía del sitio de corte para NlaIII, y, por tanto, la mitad del producto de PCR de los individuos portadores tenía el tamaño de 189 pb.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar *in vitro* la predisposición de un sujeto a desarrollar miocardiopatía hipertrófica (MCH) que comprende analizar el ácido nucleico contenido en una muestra biológica procedente de dicho sujeto para detectar la presencia o ausencia de una mutación puntual en el gen MYH7, que codifica la cadena pesada de la beta miosina cardíaca humana, asociada con la MCH, en el que dicha mutación puntual asociada con la MCH es la mutación Met388Thr.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho gen MYH7 comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. NO: 1.

3. Método según la reivindicación 2, en el que dicho cambio de nucleótidos relacionado con dicha mutación puntual en el gen MYH7 asociada con la MCH, Met388Thr, es el siguiente:

<u>Mutación</u>	<u>Cambio del nucleótido</u>
Met388Thr	10127T>C

4. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica procedente del sujeto contiene ácido nucleico.

5. Método según la reivindicación 4, en el que dicho ácido nucleico se selecciona entre DNA y RNA.

6. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica procedente del sujeto se selecciona entre una muestra de tejido y una muestra de sangre de dicho sujeto.

7. Método según la reivindicación 6, en el que dicha muestra biológica comprende células nucleadas de sangre periférica del sujeto a ensayar.

8. Método según la reivindicación 1, que comprende, además, la amplificación de un fragmento del gen MYH7 en el ácido nucleico presente en la muestra biológica procedente del sujeto a ensayar, en donde dicho fragmento del gen MYH7 a amplificar comprende la región en donde se desea estudiar la presencia o ausencia de dicha mutación puntual.

9. Método según la reivindicación 8, en el que dicha amplificación se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o una variante de la misma.

10. Método según la reivindicación 9, en el que dicha amplificación se lleva a cabo mediante PCR anidada o nested-PCR.

11. Método según la reivindicación 8, en el que dicha amplificación se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación por desplazamiento de banda, la amplificación basada en la transcripción, la replicación de secuencia auto-sostenida (3 SR), el sistema de la replicasa Q β , la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) o la amplificación por la polimerasa del fago phi29.

12. Método según la reivindicación 1, en el que la presencia o ausencia de dicha mutación puntual en el gen MYH7 asociada con la MCH, Met388Thr, se detecta mediante el empleo de sondas de oligonucleótidos marcadas con un grupo marcador detectable.

13. Método según la reivindicación 12, en el que la presencia o ausencia de dicha mutación puntual en el gen MYH7 asociada con la MCH se detecta mediante el empleo de una sonda de nucleótidos fijada sobre un soporte sólido, en donde dicha sonda de nucleótidos se selecciona entre (i) una sonda de nucleótidos que es completamente complementaria a la secuencia normal de nucleótidos que codifica la cadena pesada de la beta miosina cardíaca humana o a un fragmento de la misma que contiene la región donde se desea estudiar la presencia o ausencia de dicha mutación puntual, y (ii) una sonda de nucleótidos que es completamente complementaria a la secuencia de nucleótidos que codifica para una cadena pesada de la beta miosina cardíaca humana mutada o a un fragmento de la misma que contiene la región donde se desea estudiar la presencia o ausencia de mutación puntual, y detectar la presencia o ausencia de hibridación.

14. Método según la reivindicación 1, en el que la presencia o ausencia de dicha mutación puntual en el gen MYH7 asociada con la MCH, Met388Thr, se detecta mediante digestión con enzimas de restricción y análisis de los fragmentos de restricción (RFLP).

15. Método según la reivindicación 1, en el que la presencia o ausencia de dicha mutación puntual en el gen MYH7 asociada con la MCH, Met388Thr, se detecta mediante secuenciación directa de nucleótidos, minisequenciación directa, ensayos de hibridación en array, ensayos dependientes de discriminación de alelos basada en hibridación, electroforesis en gel diagonal de fragmentos de restricción dispuestos en placas de microtitulación (MADGE) o transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET).

16. Método según la reivindicación 1, en el que la MCH es miocardiopatía hipertrófica familiar (MCHF).

17. Método según la reivindicación 1, en el que la MCH es miocardiopatía hipertrófica esporádica (MCHE).

18. Un método de diagnóstico *in vitro* de miocardiopatía hipertrófica (MCH) que comprende obtener una muestra biológica procedente de un sujeto en donde dicha muestra biológica contiene ácido nucleico y diagnosticar el sujeto de MCH mediante la detección de la presencia de una mutación puntual en el gen MYH7, que codifica la cadena pesada de la beta miosina cardíaca humana, asociada con la MCH, en el que dicha mutación puntual asociada con la MCH es la mutación Met388Thr.

19. Un método no invasivo para diagnosticar miocardiopatía hipertrófica (MCH) en un sujeto que comprende aislar, a partir de una muestra de sangre procedente de dicho sujeto, un fragmento del ácido nucleico presente en dicha muestra de sangre que comprende, al menos, una de las regiones del gen MYH7 en donde se encuentra una mutación puntual asociada con la MCH, en el que dicha mutación puntual asociada con la MCH es la mutación Met388Thr, y diagnosticar el sujeto de MCH mediante la detección de la presencia o ausencia de dicha mutación puntual en dicho fragmento de ácido nucleico.

20. Un kit que comprende, al menos, un reactivo específico para detectar la presencia o ausencia de, al menos, una mutación puntual en el gen MYH7 asociada con la MCH, en el que dicha mutación puntual asociada con la MCH es la mutación Met388Thr.

21. Kit según la reivindicación 20, en el que dicho reactivo específico para detectar la presencia o ausencia de dicha mutación puntual, es una sonda de nucleótidos que permite distinguir el alelo que contiene una T en la posición 10127 de la SEQ. ID. NO: 1 del alelo que contiene una C en dicha posición.

22. Kit según la reivindicación 20, que comprende, al menos, una enzima de restricción que permite distinguir el alelo que contiene una T en la posición 10127 de la SEQ. ID. NO: 1 del alelo que contiene una C en dicha posición.

23. Kit según la reivindicación 22, en el que dicha enzima de restricción es la enzimas de restricción NlaIII.

24. Kit según la reivindicación 20, que comprende, al menos, un oligonucleótido iniciador útil para la amplificación de un fragmento del gen MYH7 que comprende la región en donde se desea estudiar la presencia o ausencia de dicha mutación puntual.

25. Kit según la reivindicación 24, que comprende un oligonucleótido iniciador seleccionado del grupo formado por los oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ. ID. NO: 20, SEQ. ID. NO: 21, y sus mezclas.

26. Un oligonucleótido iniciador seleccionado del grupo formado por los oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ. ID. NO: 20, SEQ. ID. NO: 21, y sus mezclas.

27. Un biochip que comprende, al menos, un reactivo específico para detectar la presencia o ausencia de, al menos, una mutación puntual en el gen MYH7 asociada con la MCH, en el que dicha mutación puntual asociada con la MCH es la mutación Met388Thr, soportado sobre un soporte sólido.

28. Biochip según la reivindicación 27, en el que dicho reactivo específico para detectar la presencia o ausencia de dicha mutación puntual, es una sonda de nucleótidos que permite distinguir el alelo que contiene una T en la posición 10127 de la SEQ. ID. NO: 1 del alelo que contiene una C en dicha posición.

29. Biochip según la reivindicación 27, que comprende, al menos, un oligonucleótido iniciador útil para la amplificación de un fragmento del gen MYH7 que comprende la región en donde se desea estudiar la presencia o ausencia de dicha mutación puntual.

30. Biochip según la reivindicación 29, en el que dicho oligonucleótido iniciador se selecciona del grupo formado por los oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ. ID. NO: 20, SEQ. ID. NO: 21, y sus mezclas.

31. Biochip según la reivindicación 30, que comprende, además, uno o más oligonucleótidos iniciadores seleccionados entre los identificados como SEQ. ID. NO: 1- SEQ. ID. NO: 19, y SEQ. ID. NO: 22 - SEQ. ID. NO: 85.

ES 2 317 713 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

5 <120> MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR O DETERMINAR LA PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A DESARROLLAR MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA

10 <160> 85

<210> 1

<211> 28452

15 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

20	gatctatctg	gtccagacca	tcctttgaac	caagtggact	tagtggggct	gaaggagggtg	60
	tggggacaaa	gaacctatgg	cagggcaacc	ggccctcctg	tctgcagcct	ggcttcctca	120
	atthttgtgtt	cctaacctaa	gagctgccat	tcagttaggg	cccacagtgt	gtctgtctgtg	180
	tgtagactct	gcttgtgcaa	tctctaattg	cctgagtagc	cctggaaaca	aaatgtggct	240
	atccccatgt	tacagatgac	aaaactggct	caaagcaatt	atatgactga	cgtagaccac	300
25	acagctagaa	aatggaatca	ctgggtttca	aagtggattt	ttgtgactga	ctccaaagct	360
	gaccagagtg	ctcatcctgt	atgcttctga	ggcctctggc	cctccagacc	ggctcactccc	420
	cacaaagtct	cccttttggg	gagttgtgtc	cctccaaaca	ctccctgaag	gcaagatcaa	480
	cctgcoctaa	ctaccccaaa	gtgaactagg	ccagcccaca	gcctgtctcc	ggccctccat	540
	ctctctcttt	gttcacatcc	atcagaaaag	agagacctag	agtaggggaat	gagagggggg	600
	gcacaagtac	aaaagattht	gaagcagcag	gaagacgaaa	gaagtacaag	aaggagcagc	660
30	tgthttgtaaa	agggaaaatc	tgagacaggc	agaaagctca	gctccctaata	cctaggctcg	720
	tgtggagcca	gggcaggggc	ccccaagggtc	agggattctg	ggggcaggcg	gatgggagag	780
	tcagcctcca	ctcctgggtg	gctccctctc	gccctgtgca	caaacaacga	gtgcctcatt	840
	cctccctctg	accaagtggc	ctgcctcttc	ctgcccctgt	tcttctctcc	ctttgggtac	900
	cggatcttht	ttctgattcc	cctctctcca	tgctgacatc	gcttctaatt	cgcctgggtg	960
35	tctccctccc	tcacaattac	tgggagtaat	tttagcaact	tttccctctga	actaccgctg	1020
	gcgtgttcc	agcaaatggc	ccctgttht	gcttgacact	tgatcagggt	ggtgacagag	1080
	tgacagacaaa	ggcggcaca	tgccggggagg	ggaggaccgg	ggcagatcac	cttcccttca	1140
	cttcaggggc	ttattttggc	taccttgccg	aagcggccct	ccttccagcc	tctctthtatt	1200
40	tatagcattt	tgcttgcctc	cctttatctt	gctatcactt	gtagcacact	ctgcacaatc	1260
	cccacccacc	ccagcatggg	ggggcccctg	gctcactctc	cccacaagga	atgtgcatgt	1320
	gtgcaaaggg	taggcctgga	tgccatttct	acaaacagtt	gactaaagca	gtccagagca	1380
	gggatcttht	tttgggtcat	tgthtatgtc	ttattgacca	gaataatgcc	tggcacatag	1440
	taggcactca	ataaatactt	gttgaatgga	ggaatctgca	aagctgctca	gtcttcagac	1500
	agcagcaagc	agcaggaaga	gaatcatgat	gtaaccaaga	gcaggtgctg	gaggagctag	1560
45	ggagttagtg	gggatcttht	aggacagcag	gccctctgat	ctgtctgagc	gtgtgagcaa	1620
	agcctagtht	ggaggtgag	ttctatctgc	aatgagaggg	ggcatgggtg	gagacagata	1680
	acaccaacac	caacagacca	gacctcccaa	acccgaaagg	agagacaaa	gtgtgattgt	1740
	ttcccaaatg	cagaaaagac	tacccaagtc	ccagcccaag	aagaatcgct	ggcctgtgga	1800
	tgaagacact	ggctttgaaa	tggctcaact	acgtcccaag	cacccttht	gcatcttaatt	1860
50	tgccttgga	aatcagggag	gggtggcagt	ttggagcttg	gaaagctgga	aggtggggac	1920
	gaaaggagth	tttgcccctc	atcgccaatc	cttgaggtht	ctacaggga	cctcagacaa	1980
	cagctgtctt	aggggttht	ttccagctcc	aagcagctgt	attatctata	gctttgagag	2040
	ggtctgtctc	tgtaaatggg	gctgattcct	cagcacctgg	cagggcctgg	gggggactgc	2100
	cagagtctgt	tctgcccggc	atgttagtag	cacagactac	tgggataacc	tcagcaactg	2160
55	tataccttag	cactgcagag	ctgcggtgth	gtcagacaca	ggcccttgca	gttctgtggtc	2220
	tacccccaact	tgctgcacc	ccccttatag	ctgctcaatg	tcctcagact	gtaccttagt	2280
	gccttggtta	ccaagcaacc	cccacagagg	ccctcctcct	ggattthtccc	ttccctgcta	2340
	tgccaccccc	accttcaaaa	tgtacctgct	gcacccatcc	cccaggcctg	cctcactcct	2400
	tccaagctga	cagctaatac	gatggactaa	tcgcatgcgc	ggaagagctg	tgctcgggaa	2460
60	gaagggggag	atthtcacac	aaatcgtgca	gtggttgctt	agacacggag	ccagtcgaag	2520
	ttgcatgccc	cgttgctaga	agagcatggc	atcgggtgtg	ttctgtgctc	gtaggctggg	2580
	cccagctcc	ctthtctccc	ctcctthtgg	gctgttctct	aggcctgcag	aggggaagat	2640
	thtthtctgtc	ctgttactct	gcctcacttg	ccagaacact	agtcgcctcc	agctctggat	2700
	aaagctgagg	ctgggtgggc	cagacaacag	ctgtcttagg	ggtctccttc	cagctccaag	2760
65	tagthgtatt	atctatagct	ctgagagggg	ctgtctctgg	gctcaggcct	ttagtagcctg	2820
	tggggcagag	ccagggaacgt	gagtcaggca	aaccgctcca	aactaggacc	aatgcagctg	2880
	ggtcctgtct	tctgcgcata	gggggtcccc	acatcttht	aatcccagcc	cacctthtcca	2940
	ggctaccctc	cacaggccgg	gctccactcc	catctgctga	ggtthtccac	cttgaatcct	3000

ES 2 317 713 B1

5							
10							
15							
20							
25							
30							
35							
40							
45							
50							
55							
60							
65							

ES 2 317 713 B1

	acctcgtgcc	catctccttc	ttctctgacc	attaccctga	ccctctcttt	tgtctctcct	7140
	cttcctttct	gctttccatc	cccttcctgt	ttttctcttc	ccacctcctt	cacctctctt	7200
	ccaactcctc	acgogtttat	ccagaagctc	attatcgcca	tgtcttcacc	tctgcatttt	7260
5	ctttcccttc	agaaacattt	ccattctctc	cagccctacc	aacttttccc	aaaacagccc	7320
	aggcccatct	cccctgttta	ctttgccag	ccaagcacag	gtcagcctgc	ccaaaccagt	7380
	gccttctggt	ggcatccttc	ctggtgccag	ccctgacctc	tgtgcatcag	aagacagttg	7440
	tggatttttg	gtgtagataa	cctggcagct	tcttgcccag	ggctcctact	ctcgggtagg	7500
	cccaggcatt	ctctcctgat	ttgaggcttg	ctggtctcca	gtagtattgt	tcactgccc	7560
10	ataagcccct	gtcttcacag	cggagaatcc	ggagcaggga	agacagtcaa	caccaagagg	7620
	gtcatccagt	actttgctgt	tattgcagcc	attggggacc	gcagcaagaa	ggaccagagc	7680
	ccgggcaagg	taggcctgct	gcccctcaag	gtcctgtacc	gcagaaggga	gggagaagag	7740
	ctctcacctg	cctccttctt	ggcctctgca	gggcaccctg	gaggaccaga	tcattccaggc	7800
	caacctgtct	ctggaggcct	ttggcaatgc	caagaccgtc	cggaacgaca	actcctccc	7860
15	cttcgtgagt	ggtccctgac	cttggccttg	ggacttggtg	tgggtggagg	atggtctcag	7920
	atatgagcct	tcctcccaact	caccaccact	ctcttccatc	tctccagggg	aaattcattc	7980
	gaattcattt	tggggcaaca	gaaaagttgg	catctgcaga	catagagacc	tgtgagtggc	8040
	atgaatctgc	taggctcagc	ctaagctcac	ccttgctcta	gacctctggt	tcttgacctc	8100
	tctctctctc	ccctccctcc	ctctgttttt	ctcctcttta	agtctctgtc	tgtagggtgtc	8160
20	tctgtcttca	ggtctacata	tctgtctctc	tctgagactt	cctctgcata	tttctccatt	8220
	tctgtctctg	catggctagg	tgtctttctc	tgggattttct	ctctgagact	atctctctcc	8280
	ttctgggtct	ctgtttccat	ctctctgtgt	gatctctttg	tgtctgtcca	actagtctct	8340
	ctggctcttc	ccttccctct	gccttttgct	tgctacattt	atcattaatt	ttccttgtgc	8400
	ccaaacccta	acttttcttt	ctctccttct	tctccccacc	tgttcacaga	tcttctggaa	8460
25	aaatccagag	ttattttcca	gctgaaagca	gagagagatt	atcacatttt	ctaccaaata	8520
	ctgtctaaca	aaaagcctga	gctgctgggt	gagtcagagc	caccgactga	gaccaactat	8580
	ctccatggca	acctggtccc	ctctgcttgt	ggctggactc	agctggcatg	ccctgggttt	8640
	catggcactg	ctggattcaa	ttcagtggga	tgtggggcca	agccaagccc	tgtcctgtgc	8700
	tgtctctcca	gcccagtgct	tgtggcgagc	agcctccatg	agagccgggg	gcttgtgtcc	8760
	caccctaacc	atgttttttc	ccctagacat	gctgctgatc	accaacaacc	cctacgatta	8820
30	tgcattcatc	tcccaaggag	agaccaccgt	ggcctccatt	gatgacgctg	aggagctcat	8880
	ggccactgat	gtgagtgtgt	gaggacccag	ccaggggggt	ggaggattgg	cagtgagggg	8940
	caaacagggg	tccaaaagca	gagctaagac	gctggccatt	ggttggttta	agtggatagg	9000
	acctcctgag	agccagaatg	tgccctgtga	tcagggtgta	ctggggaatg	gatgaggtga	9060
35	gacaggactg	gccagtatct	ggtgttctat	caaacaggga	agagctgaaa	gccatgagac	9120
	agagagacac	acaagccaag	aaacaagcat	caccgaggga	gcaggacgag	gaggggaaggc	9180
	catgcagacg	gcatggggct	ggaggggctg	ttaggtgaac	agatgcagac	aggtatggaa	9240
	ggccaggcag	gaagcaagtg	tagggccagg	aagcataagt	gggtaactca	gaaaagctgt	9300
	ggccactgac	actggggctg	cggccaactg	acgtctgtct	tgtctcttga	tcttacatcc	9360
	tttgtttttg	agttccctgc	atcttacatc	ctttgttttg	gagctcccca	ctgggtatgg	9420
40	gagttctcaga	acccacaggg	attaaggaga	caagttttct	ctccaactta	caaggatctt	9480
	cacttaccca	tcatacttct	ttttctgggg	tccgccataa	tggggcctcc	ctacagaacg	9540
	cttttgatgt	gctgggcttc	acttcagagg	agaaaaactc	catgtataag	ctgacaggcg	9600
	ccatcatgca	ctttggaaac	atgaagttca	agctgaagca	gcgggaggag	caggcgagac	9660
	cagacggcac	tgaaggtggg	aggcagggat	tcttgggggc	agctgtcaag	tcattggaggg	9720
45	cctagtctgc	tcagcagtca	tctctcttct	cttttttctt	tttttttttt	ttttgagatg	9780
	gagttcttgc	ctgttgccca	ggctggagcg	cagtggcacg	atcttggctc	actggcactt	9840
	ccacatcctg	ggttcaagtg	attctcctgc	ctcagcctcc	cgagttagctg	gaattacagg	9900
	catgcaccac	catgcctggc	taatttttgt	attttttagt	gagatggggg	ttcatcatgt	9960
	tggccagggt	ggtctcaaac	tcttgacctc	aagtgtatcc	cctgccttgg	cctcccaaag	10020
50	tgtctgggatt	acaggcatga	accaccacac	ctggccagca	gtcatctctt	taccaacttt	10080
	gctacttgcc	ttttccttcc	agaggttgac	aagtctgcct	acctcatggg	gctgaactca	10140
	gccgacctga	tcaaggggct	gtgccaccct	cgggtgaaag	tgggcaatga	gtacgtcacc	10200
	aaggggcaga	atgtccagca	ggtgggtcca	tcttcagatg	ataatgggtg	ggcagggttag	10260
	ggagactggc	atgggtggat	gagagttttc	aagttcactc	ttcccaacaa	ccctgtctca	10320
55	tatgggtctc	tcctccacct	tgaggtgat	atatgccact	ggggcactgg	ccaaggcagt	10380
	gtatgagagg	atgttcaact	ggtggtgac	gcgcataaat	gccaccctgg	agaccaagca	10440
	gccacgccag	tacttcatag	gagtcctgga	catcgctggc	ttcgagatct	tcgatgtgag	10500
	ttgggacccc	tgggagtggt	agaacaatca	ctcactcgct	cccacattca	acagctattt	10560
	gcttagagcc	agctgtggac	cagacatggg	aaggcagtg	ggactgtgtg	gtgacagagg	10620
60	cagtcatttt	ctctgtcttc	aggggaagcc	ctccttcaact	gccttgacat	ggaggggacc	10680
	agccacgccc	tgtctgggtc	aggcacagtg	gacgggcaca	gccccaatgg	ccactcacac	10740
	ccactttctg	actgctccca	cccctcatgc	cccctgcagt	tcaacagctt	tgagcagctc	10800
	tgcatacaat	tcaccaacga	gaagctgcag	cagttcttca	accaccacat	gtttgtgtctg	10860
	gagcagagg	gagcaagaa	ggagggcatc	gagtggaacat	tcattgactt	tggcattgac	10920
65	ctgcaggcct	gcattgacct	catcgagaag	gtgcctcttt	ggccttacca	cctgaattct	10980
	ccctgcacac	ccaacaagaa	caccatagac	aaaatagcag	cccctctccc	ttctggggaa	11040
	tataaaaaata	gaaggggctg	aaggatccga	gcccttggtt	ccagagccta	tgttgtgtctg	11100
	agcaccagg	acaggggtggc	accaggggaca	gctgatttcc	caggggcttg	aaagtggaca	11160

ES 2 317 713 B1

	catggaggat	gggcacctgc	atgatgacct	cccacacctg	catgtttatt	gggcctgggt	11220
	tatgcatcca	aggatcagga	agtgtgaggg	tgggtgtaggg	gatcataaga	gtgcacctat	11280
	tttcaaccct	agcatctcag	gcatctgggt	cgtggagtg	tgtgtacagc	atcgatagaa	11340
5	tccatatttc	cagactttca	caaagtccct	ctgtcatcag	acaaaatnct	ccaccttgaa	11400
	ccggttccag	tcagtagata	actgtactca	gagctgagcc	tactacctta	acacccaaca	11460
	tggcacctcc	acgagcaagt	atattgacca	tagagcagaa	tccatgtcca	cctgtgtgaa	11520
	ggacactcag	tgatgctctc	tcttgcttcc	tcagcccatg	ggcatcatgt	ccatcctgga	11580
	agaggagtgc	atgttcccca	aggccaccga	catgaccttc	aaggccaagc	tgtttgacaa	11640
10	ccacctgggc	aaatccgcca	acttccagaa	gccacgcaat	atcaagggga	agcctgaagc	11700
	ccacttctcc	ctgatccact	atgccggcat	cgtggactac	aacatcattg	gctggctgca	11760
	gaagaacaag	gacccctctca	atgagactgt	cgtgggcttg	tatcagaagt	cttccctcaa	11820
	gctgctcagc	accctgtttg	ccaactatgc	tggggctgat	gcgcgtaagt	agggactgag	11880
	gctcccggta	cagaggagca	gggattctgc	caaggttctg	agccagggtca	attgctacac	11940
15	cccaccactt	caatgtcagg	ttgtacccca	aggtttacag	actcagtggg	atggaactgg	12000
	gtgaagaaac	tgaggcagcc	acattgaagg	ccctcaccca	ggggccaaat	gccagcaagg	12060
	atgtaaaagc	gggctgtgat	tctttactca	cacctacact	ccccacactg	atgcttcttt	12120
	tggtgactct	ccttcctgca	gctattgaga	agggcaagg	caaggccaag	aaaggctcgt	12180
	cctttcagac	tgtgtcagct	ctgcacaggg	tgagtgggac	acagccccag	ccaacttggc	12240
20	tccccatctg	cccaacccca	cccagcccca	cccttccctg	ccttgttcat	ccctactcc	12300
	tcccgttccc	tgtctccttg	gtgcattcgg	gaccattttc	actctgtctt	ctcttcccgt	12360
	catctcctgg	cctcttcaact	tatttacttc	ccatctccct	tctctcctct	ttcccttctg	12420
	tctcccacc	tctctcctta	tccctgtctc	ccccagggec	ccttcatctc	tgtgacttct	12480
	cgaattctct	ccatctctct	ttctcttcc	tcttctctc	tcttcttcc	gcatctcttt	12540
25	ctggcatttt	ctttactttt	ctctattgca	tttttggcca	caggaaaatc	tgaacaagct	12600
	gatgaccaac	ttgcgctcca	cccatcccca	ctttgtacgt	tgtatcatcc	ctaagtggac	12660
	aaagtctcca	ggtgaggcca	caaactaggg	ccaaccact	gctgggcata	caccgcctctg	12720
	ggaacaggac	ctcctaggac	atctccctac	ctaccaccac	agtggtttcc	aaaccacatt	12780
	cttctcctcc	catcccgcat	gaggcctccc	agggtagctc	cctctcagcg	ctaccttgca	12840
30	cttgacgtgt	gtaatgaggg	tgatgtgtaa	ggcactctga	tggacattac	ctcatcagtg	12900
	gccctacaac	cccctggata	gctgggtgtc	caagacagaa	tcttagttca	actttaaatt	12960
	tacctgcaga	accacttaag	cccccaatga	gacatattca	aattgttaat	ccatttttgg	13020
	ctaattagga	gacagaggct	cagggacctg	ggttcaagac	ctggctctgt	tcttgatcag	13080
	cttagtgaac	ttggcctgtc	ccgtaacccc	tctgggctta	atttactcat	ctagaacatt	13140
35	ggatatatct	gtttctggcta	accctatga	taataggtgt	gaatcatata	aaaaaggaat	13200
	gtgaaagcct	tttagttaaa	aatgtggcta	gaagaaaatg	aaacaaatga	ttattactaa	13260
	ctgacttgct	aagattacaa	gctaatacgt	gacaaaagcca	ggatcagaac	ccagaacttc	13320
	agtccagtg	tctcacagac	tctcctact	tcttcttgc	cacaggcgtg	atggacaacc	13380
	ccctggctcat	gcaccagctg	cgctgcaatg	gtgtgctgga	gggcatccgc	atctgcagga	13440
40	aaggcttccc	caaccgcac	ctctacgggg	acttccggca	gaggtgggta	tgagggtgca	13500
	ccagagctca	tagaacaggg	ggagccaggc	tgccctgatg	ggaatgggat	ctgcagggtga	13560
	ccctgggaatt	ctatgggcag	agcagatcac	tgacagcat	gggtgactct	ggagacttcc	13620
	ctcctcaggt	atcgatcct	gaacccagcg	gccatccctg	agggacagtt	cattgatagc	13680
	aggaaggggg	cagagaagct	gctcagctcc	ctggacattg	atcacaacca	gtacaagttt	13740
45	ggccacacca	aggtgaggaa	aggagactaa	ttaattaaag	gaagacatct	cttttccatt	13800
	gactcctctg	atgcttttcc	tgttgtaatc	atcttagcaa	aatctcttac	ctgtatgcta	13860
	ccctcccgag	tggaaactct	agcaccactc	ccctcatccc	agctccagct	gccattgacc	13920
	tctcctctgc	aatccttttc	taggctgtta	cccttccctaa	ggtaatcccc	accatctctt	13980
	tccctcgtac	ccctccctag	tcatggccaa	cacacacctt	gcctgcaggt	gttcttcaag	14040
50	gcggggctgc	tggggctgct	ggaggaaatg	agggacgaga	ggctgagccg	catcatcacg	14100
	cgtatccagg	cccagtcctg	aggtgtgctc	gccagaatgg	agtacaaaaa	gctgctggaa	14160
	cgtagggtgag	agatctcaag	aggaggtttc	ccgcttctct	gaggccacag	ctggttcagg	14220
	ggcagtgctca	ggaaaaaaag	ctcagcagat	cttcaaacac	agagacctgc	aggaggggct	14280
	catatgaaca	cactgcagtc	acagggtcag	aggcctcagg	aagggtggga	gggatgaagg	14340
55	aaatgggata	ttcccaaggt	ttcaggacct	caggtaggaa	ggaggcagag	gctcagcact	14400
	ccttttcaatg	ggcccctgca	gagactccct	gctggtaatc	cagtggaaaca	ttcgggcctt	14460
	catgggggtc	aagaattggc	cctggatgaa	gctctacttc	aagatcaagc	cgctgctgaa	14520
	gagtgcagaa	agagagaagg	agatggcctc	catgaaggag	gagttcacac	gcctcaaaga	14580
	ggcgtagag	aagtccgagg	ctcgccgcaa	ggagctggag	gagaagatgg	tgtccctgct	14640
60	gcagtagaag	aatgacctgc	agctccaagt	gcaggcgggtg	aggctcctgg	gctactgttg	14700
	gctcttccac	cctgctctgc	cttcaacttc	cacaacctg	cacctccctg	cacaggggct	14760
	cactgtcttg	ttccttcagt	cagaggactc	tgggatcaac	acttctaaag	acctccaaag	14820
	aggtccctca	ggaggaggaa	agggcagagg	gaaaagagct	gactttttaa	agcacaggct	14880
65	ttctacttgg	gttcaacctta	gatacacagc	ttaattattt	tgtgaccttg	ggcagacctt	14940
	ccatcataca	tgagcctcaa	tttcccttag	acagggaata	aagctgtcca	tttcatttaag	15000
	cagaggaaga	ggtccagatg	aagatttctg	gttcccttcc	tctctgctcc	cctccccagt	15120
	gttcccaagt	tatactatcc	tgaaactctt	cccctcccca	tactcttgaa	gctcttgcca	15180
	agtggggata	tcctagagtt	accctcctat	ttgagtgtatg	tgctctcct	tccctctacc	15240

ES 2 317 713 B1

	tgcaagaatg	aggaccttac	cccctgaaca	gcctcccttc	tgttcctcac	cttcaggaac	15300
	aagacaacct	ggcagatgct	gaggagcgct	gtgatcagct	gatcaaaaac	aagattcagc	15360
	tggaggctaa	ggtgaaggag	atgaacgaga	ggctggagga	tgaggaggag	atgaatgctg	15420
5	agctcactgc	caagaagcgc	aagctggaag	atgagtgttc	agagctcaaa	agggacatcg	15480
	atgatctgga	gctgacactg	gccaaaagtgg	agaaggagaa	acacgcaaca	gagaacaagg	15540
	taagggcagc	tccttttggc	tccagcccg	gtctcatcag	gactctcaga	ccatactgac	15600
	cttgaccag	gctagccact	cgcattccaga	gagcagcatg	gaccttgatc	atggagctcc	15660
	ccacagatgg	caccaagctg	gtgacctttg	accctaaagg	agatgggatt	cttggtcggc	15720
	agggtgaaaa	cctgacagag	gagatggctg	ggctggatga	gatcattgcc	aagctgacca	15780
10	aggagaagaa	agctctgcaa	gaggcccacc	aacaggctct	ggatgacctt	caggccgagg	15840
	aggacaaggt	caacaccctg	actaaggcca	aagtcaggct	ggagcagcaa	gtggatgatg	15900
	tgagtagatt	gagagttgtg	gggcctagat	atgccatgtc	tatctgtgcc	cagagctctg	15960
	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tttatgttta	16020
	gaggggggta	gggttagagg	atgttaactt	ttctgatata	ttcttagaaa	ggagctgggg	16080
15	aatgaaaagt	cagaggtggt	gatcaattct	gaattatgta	tctaattctca	ctgggtatgat	16140
	caataataga	gatgagtttt	cttattttaat	ttaagtgcga	tccatatata	ctctgccttt	16200
	gacacaagat	ttagagggtc	atctcataag	aacatgataa	atttcttttg	aaattttgtg	16260
	aggctcccca	agtagaattt	ttgaaattcc	aatattttaag	gcagaatctg	atcattgttc	16320
20	cctctgatgc	acatatgtct	gttgactcac	ttatcactct	gtatttttaat	tattttaagct	16380
	tctatctcag	ccataagact	acaagcttcc	tttagatagg	aacttagatc	tattcaattt	16440
	ggggactgca	gtgcttagca	agagcctgat	gcccagtagg	tgtttatagg	atgctgaaa	16500
	aatgaatacg	cgcggccagc	cgggtgctca	cacctgtaat	cccagcactt	tgggaggcca	16560
	aggcggtgtg	atcacgaggt	caagagatcg	agaccatcct	ggccaatatg	gtgaaacccc	16620
25	atctctacta	aaaatacaaa	aattagctgg	atgtggtggc	gtgcgcctgt	agtcccagct	16680
	actcaggagg	ctgaggcaga	ataatccctt	gaaccagggg	ggcgagggtt	gcagtgagcc	16740
	gagatcgcg	cactgcactc	cagcctggcg	acagagttag	actccataaa	aaaaaaaaaa	16800
	aaaaaaagga	ggaagggaag	aaggaaggag	agaaagaaag	gagagaaaga	aagaaagaaa	16860
	gaaagggaaa	gaaagaaaga	atacggcttt	ggggtttcat	cccacagtca	tttattccctt	16920
	tatctataaa	atattgattc	agcatccctt	atatctaggc	aatctcacag	tcccctaata	16980
30	acatttggcc	cactctgggg	aaggtttccc	aagtcctgaa	cacaaagatt	taccaagtcc	17040
	tgaggtaact	gaacaacaaa	atcaccaagt	caggatgctt	tgctcactg	ggcctggctc	17100
	cttctctcta	ccagctggaa	ggatccctgg	agcaagagaa	gaagggtgcg	atggacctgg	17160
	agcgagcgaa	cgggaagctg	gagggcgacc	tgaagctgac	ccaggagagc	atcatggacc	17220
35	tgggaatga	caagcagcag	ctggatgagc	ggctgaaaaa	gtactgtgtc	ccctccctgc	17280
	tgcccttctt	cctccccagc	ccataacagt	acaagcagac	ccaagacagc	catcctctga	17340
	ggcaacaacc	tcacgcagcc	tccacaagtg	gaggcgcaaa	ccatgggaaa	aggcctccca	17400
	ggcaagggtt	ttcctccctt	agtcaccgat	atcagggtta	gttagatggg	cctccctggc	17460
	aaaaagtcca	ttgtatccca	tgagaccttt	cttcttggtt	ggcactcagt	gggaatgaaa	17520
40	ataacagcct	tcccccttca	tacacatctc	tcttttgaga	ccagttccctt	gacatggagg	17580
	aaggctccac	atgagagcct	cttaggaaag	tccctttgtg	gcttttcaca	gagagccccc	17640
	agggcaccaa	gaaatgccct	cacattaaag	aagtcagggg	atcagggcca	tttctttgtt	17700
	ttgcttaact	tgtggttcca	attcttagtg	taagttcttc	caaaatgtat	agactttcca	17760
	gacttggtaa	acagttagct	tgcagaacat	attttgataa	ttgaagggtc	tatgggtgtt	17820
	caggctcagc	actttgaaag	gcttttgaaa	tcatcataat	ctacatcctc	atcaagtttg	17880
45	tgtttgcaca	ggaatcttca	taccttccca	ggcacagaat	gtgttgaaata	aatgaataaa	17940
	tacacgatcc	tatttgattc	tcaaaacacc	ttttaaggat	ggatctttta	atttcaactt	18000
	accaaagagg	aaaataagtt	tcagaaaggt	tagctgagtt	acccaaagca	atagtgacaa	18060
	aattaaagac	catcagagct	aaaaaggacc	tttgaaacaa	tctagtccga	ccccctcatt	18120
	ttacattatg	agaaaacaag	gaccaaagat	gggaatgtcc	tgtagagccc	aggccccatc	18180
50	accctgtcta	cgcactcctt	cccattacat	tcttgttggg	tttcaatcta	cgcaggtgtg	18240
	tacacttcca	gggatccctc	atcaccccca	gaagctgttt	ttctaataga	atccctactct	18300
	ttacctgtat	cattaccatt	ttcaaccact	ggtggaccct	cctgaggccc	cacgagtctc	18360
	ccttacctca	ccatccctcc	ttccccacag	aaaagacttt	gagctgaatg	ctctcaacgc	18420
	aaggatttag	gatgaacagg	ccctcggcag	ccagctgcag	agaagactca	aggagcttca	18480
55	ggtgaggtct	ggacacccac	gcgggatgct	gagtcctctg	gctggttctg	tttccctgcg	18540
	ccccctctct	aggtgtcctt	gttcacagca	ttacaggaaac	tgattatgtg	tccattggag	18600
	caggcacgca	gctatcacag	tgtgcccctg	gatacatcca	aaaggggtca	ggtgatccac	18660
	agagaccctg	aaaagggtgca	caggcctgga	gggcagaatt	cctggcttcc	tgtctcagct	18720
	ctgccttagt	tgggtgacct	ctgggagccc	actccagatc	tctgggtctc	catgcccctc	18780
	cctgttacat	ggagggtttt	aagagtcctt	cgactctgat	ggcatgactt	tcctccttca	18840
60	tctagagcag	aagctgtgtt	aggtctttag	ttgtctgtgc	agacaaatac	ggctctctca	18900
	ttttcaactt	ttgttatttt	tttatgacta	aactgcttaa	aatatcccca	gaacacaggt	18960
	ctctttgtcc	atctttaaga	gcaagtttca	accactttcc	ttccaataaa	gagccatgta	19020
	gactgtcagg	ccctcgccta	aagggaaggct	cttcaaaacta	tcttccccaa	atccttttaat	19080
	tcccacctct	ccagtggaa	agctaaactg	acttgctgtt	ccagagaagc	cgagagcctt	19140
65	ttagagccgg	gggatttcca	gtggaggggt	ccaggcgggt	ggtctgagcc	ctttgtgtct	19200
	gaccaggcac	cgatcgagga	gctggaggag	cagctggagt	ccgagcgcac	cgccagggtc	19260
	aagggtggaga	agctgcgctc	agacctgtct	cgggagctgg	aggagatcag	cgagcggtcg	19320

ES 2 317 713 B1

	gaagaggccg	gcggggccac	gtccgtgcag	atcgagatga	acaagaagcg	cgaggccgag	19380
	ttccagaaga	tgcggcgagg	cctggaggag	gccacgctgc	agcacgaggg	cactgcccgc	19440
	gccctgcgca	agaagcacgc	cgacagcgtg	gccgagctgg	gcgagcagat	cgacaacctg	19500
5	cagcgggtga	agcagaagct	ggagaaggag	aagagcgagt	tcaagctgga	gctggatgac	19560
	gtcacctcca	acatggagca	gatcatcaag	gccaaaggcag	gctctgctcg	gcctccccctc	19620
	ctccaacttc	ctcctcccac	ctcccccttc	tgtccatgta	gtgtctcttc	cttcatgggtt	19680
	cattttccca	cttcccttcc	tctgcctggt	tctcagatcc	cctccttctt	ttcacacctt	19740
	ccctcttctt	ttctccttca	gttgccacctc	ttacaccctt	tcattcccccc	cgcccccaac	19800
10	atccatcata	taactctcct	tcccttctca	ggctaacctg	gagaagatgt	gccggacctt	19860
	ggaagaccag	atgaatgagc	accggagcaa	ggcggaggag	acccagcgtt	ctgtcaacga	19920
	cctcaccagc	cagcggggcca	agttgcaaac	cgagaatggt	gagcctagag	caggggctcc	19980
	atggttccca	ccacagtctc	cccaacctcc	tgagccactc	cagcctcggg	cacaagccaa	20040
	tacacgcaca	cacagacaca	gagtctctcc	agaaaatggg	gcctgagggc	tagaggagga	20100
15	ggtggggata	gagaggagt	ctgatctaga	atggtgcttc	cccaggtgag	ctgtcccggc	20160
	agctggatga	gaaggaggca	ctgatctccc	agctgacctg	aggcaagctc	acctacacct	20220
	agcagctgga	ggacctcaag	aggcagctgg	aggaggaggt	taaggtaagg	actttgctcg	20280
	ggccacctgg	cccaagcaag	gagcacactg	actagccttg	catcaaatca	cttcccttcc	20340
	cagcaataag	gctggctgtg	gaccaacagt	tctccaagaa	ttctaaaaag	aaatcacagc	20400
	ccaaaccttg	ccacatgcc	tctactcccc	aggctgaggc	cctctgcttc	tgctgcatcc	20460
20	ctggacggga	ggcagggtgt	gagaaggagg	agagaaaatg	aactaggagg	gcacgagatg	20520
	gccttgcctg	ggcagggtgt	ggggatgtag	ggactgcaca	aatgggtcct	ggattgtctag	20580
	ggccaccttg	aaaactggag	aaagaaattc	aactggagcc	tattcttagc	actttgctgg	20640
	actcatgaaa	aaggagaaa	aacatgattt	ttaaaaaact	ccagggttca	tactaacctg	20700
25	cctcttatag	ctcagtgtac	ttagggttag	gaagtccctt	aacctttctg	agcctgtttc	20760
	cctctcccca	gccaggtaaa	atggcgggtg	tgatgacct	gtctgggtg	gggaggagct	20820
	cagggccaat	ggccatgaag	cttttcttaa	atagttcact	gctgtattgg	cattctttgt	20880
	tatcagcaaa	cagtaaacca	tgacagggtc	actgggggtt	tggacataga	tgaggccaag	20940
	ggatgatgtt	gagattgggg	tgaggagaag	ggcaagggtg	gggttgcttt	atggagaaa	21000
30	ctgaaccac	ctcctggtgc	ccacctctcc	ccaggcgaag	aacgccctgg	cccacgcact	21060
	gcagtcggcc	cgccatgact	gcgacctgct	gcgggagcag	tacgaggagg	agacggaggc	21120
	caaggccgag	ctgcagcgcg	tcctttccaa	ggccaactcg	gaggtggccc	agtgaggagc	21180
	caagtatgag	acggacgcca	ttcagcggac	tgaggagctc	gaggaggcca	agtgaattct	21240
	gagcagcctg	acttctggct	gaggccccct	tgacggcagg	actcagccca	gccccagcct	21300
35	cagcagctcc	cacacaggcg	atgcttagct	agtgtttgac	aacacaggag	gactctgccc	21360
	cgccccacc	tccttctcct	ctcagggaag	ctttttgctc	gaattatgtt	tctgatccga	21420
	atataagacg	aacaaaaggt	ttgtctgagg	gcagagtgtc	tccgtctggg	gcagggcact	21480
	gtggcaggga	aaggcagtg	ggagggtg	agaagcccat	acctcctcaa	tgtccatagc	21540
	gcagaggctg	ggccagggtc	agagggtg	tggttctcca	cgccctgctg	ggatcctctg	21600
	cctgatgttc	tcggccccctg	ggacctgtcc	tcaggcttct	ccagctacac	ttctgaggtt	21660
40	tcaaggattg	tcctttgagaa	ggttcattgt	gtttacctct	tgtccccatc	cacacctccc	21720
	atcctcccca	ccctctgcc	cctccccctg	gcaggaagaa	gctggcccag	cggtctcagg	21780
	aagctgagga	ggccgtggag	gctgttaagt	ccaagtgtc	ctcgctggag	aagaccaagc	21840
	accggctaca	gaatgagatc	gaggacttga	tggtggacgt	agagcgctcc	aatgctgctg	21900
	ctgcagccct	ggacaagaag	cagaggaact	tcgacaaggt	gggccctggg	tgggggccgc	21960
45	agccagcatg	cagggcaagg	gggcatgagg	ggttcagtga	gaggccagag	ccatcctcct	22020
	tggagggtgg	ggaggaggcc	tgagcccagg	caggtcctga	gacagacct	ggacatgggg	22080
	ctgaggctgg	ggggctgaag	agtgagcctt	gtccccgggc	agatcctggc	cgagtgggaag	22140
	cagaagtatg	aggagtgcga	gtcggagctg	gagtcctcgc	agaaggaggc	tcgtcccttc	22200
	agcacagagc	tcttcaaaact	caagaacgcc	tatgaggagt	ccctggaaca	tctggagacc	22260
50	ttcaagcggg	agaacaaaaa	cctgcagggt	gtgctggggg	cccaagaggc	tggggagggg	22320
	ctgcaactgg	agtgttccca	tatggtgcc	cccaagggct	ccaagaggcg	tctgggcaaa	22380
	gaggcgtgtc	cctccaactc	cactggacct	cagcagccct	caaccgagtt	accgtgttcc	22440
	ccacacagag	gagatctccg	acttgactga	gcagttgggt	tccagcggaa	agactatcca	22500
	tgagctggag	aaggtccgaa	agcagctgga	ggccgagaag	atggagctgc	agtcagccct	22560
55	ggaggaggcc	gaggtgtgtg	tgtgtgcagg	gcacgggggtg	cagggaagctg	agctccagga	22620
	ttttggctcc	ctgttctcat	ccccgccttt	gtcgttttgt	tcactgtccc	atccccagag	22680
	cctaggacag	agcctggcac	atagtaggca	ttcagtgaag	atgtgtggag	tgaatgaatg	22740
	accagtcact	gaactctctt	cacataggca	ttttacctat	tgcatcttag	ctgactcttc	22800
	catttccaca	tacctcccg	ttccacctc	tgcctccctc	tgttttcttt	tatactctat	22860
60	acctgattgc	ctctgtttcc	ttggcaacac	ttttttcttc	attttccctc	ttatcttcat	22920
	agctggctct	ccctgtgag	ggcctgaatc	actttctctt	aggcttattt	ttattttctc	22980
	ttagattctc	ttttcctcca	ccttctgctt	ctttgaacca	cttacacca	tcttgaagtc	23040
	acttcgtatc	catgattagt	gagcaggccc	ccacctggc	ctgtgccctg	actgtctgcc	23100
	tgcatccctc	cccccaacc	cttcccaggc	ctccctggag	cacgaggagg	gcaagatcct	23160
65	ccgggcccag	ctggagttca	accagatcaa	ggcagagatc	gagcggaaag	tgccagagaa	23220
	ggacgaggag	atggaacagg	ccaagcgcaa	ccacctgcgg	gtggtggact	cgctgcagac	23280
	ctccctggac	gcagagacac	gcagccgcaa	cgaggccctg	agggtgaaga	agaagatgga	23340
	aggagacctc	aatgagatgg	agatccagct	cagccacgcc	aaccgcatgg	ccgccgaggc	23400

ES 2 317 713 B1

	ccagaagcaa	gtcaagagcc	tccagagctt	gttgaaggta	ctcaccacaga	ggggactggc	23460
	ctccacgtgg	cctggcggaag	cagtagtgtc	ttgatacagg	caccagattc	ctcctgcccc	23520
	taggttactg	cagggaccto	tgacaggtgc	ctttagttaa	gggaaccgag	gctggctccc	23580
5	tgctcatgcc	cactctcctg	atcctcagga	caccagatt	cagctggacg	atgcagtcog	23640
	tgccaacgac	gacctgaagg	agaacatcgc	catcgtggag	cgggcgcaaca	acctgctgca	23700
	ggctgagctg	gaggagttgc	gtgccgtggt	ggagcagaca	gagcgggtccc	ggaagctggc	23760
	ggagcaggag	ctgattgaga	ctagtgcgag	ggtgcagctg	ctgcattccc	aggtgagcag	23820
	ctccccctgt	cattcctgaa	gggagcacag	gctggggctc	agcaagcaag	gcttgagagc	23880
10	tatgcataga	tgctcaatgc	ttttcctgct	ctgcccaccc	ctcccccaac	ccagaacacc	23940
	agcctcatca	accagaagaa	gaagatggat	gctgacctgt	cccagctcca	gactgaagtg	24000
	gaggaggcag	tgacaggagt	caggaatgct	gaggagaagg	ccaagaaggc	catcacggat	24060
	gtaagtcccc	cactccaccg	accgatccca	gaccagtgct	tctccgtggg	ctgggcagca	24120
	agtgtgtgag	gacttgacca	gaccatgtgc	cacctctctc	ctgcacacag	gccgcatatga	24180
	tggcagagga	gctgaagaag	gagcaggaca	ccagcgccca	cctggagcgc	atgaagaaga	24240
15	acatggaaca	gaccttaag	gacctgcagc	accggctgga	cgaagccgag	cagatcgccc	24300
	tcaaggcgcg	caagaagcag	ctgcagaagc	tgggaagcgcg	ggtgcggggag	ctggagaatg	24360
	agctggaggc	cgagcagaag	cgcaacgcag	agtcgggtgaa	gggcatgagg	aagagcgagc	24420
	ggcgcatcaa	ggagctcacc	taccaggtgc	gacgggcggt	gactccaggc	agagccctgg	24480
	caccatagcc	acagtgacaa	ccagctgagg	agaatgaaga	gtttgctctt	agcctcttcc	24540
20	agggcgagga	tgggaatgca	gccccggttt	aaactttgcc	tagccctgcc	ccactctgaa	24600
	tgtcccctag	ctcagaggtc	agtctctgag	ctcctctggc	tgggagctcc	atctcaacac	24660
	ccactcttag	cccatgcgcc	aggggacaca	cacagaattc	cagacaaaagc	tcaccagta	24720
	cagctcacca	gaaagcaa	atgtagccag	ggtcaccccc	aaaagacacc	aaaaacacac	24780
	ccatcccatt	caaaacagca	taaaaacttt	ttcattgccc	agggcagtg	ggactctagc	24840
25	tttctgaggt	gttttctaga	atcagactct	gaattagaat	ttgtttcttt	tccaatccag	24900
	gatgtcacta	tctctctaag	cacactttgt	ccttaactta	gattaagtca	gtgttttctt	24960
	ggcctgcatt	gcagccagg	aaattccatc	accactatag	cccaaaagtc	actcccagca	25020
	tgtgccgagg	tccagagcag	gggacttcat	cccgcattgg	gtccccggac	cctgaaaaac	25080
	ctgctccctg	gagcactgca	cacacacaat	tttgtgcata	atttcaggag	tcccactagt	25140
30	tctttggact	ctttcctggt	acagatcatt	taaaatattt	acacatat	ggtaagaaat	25200
	tataaggaga	attcaagtgt	ttagttagga	tcagaaaagta	gaattgggtc	aggatatcag	25260
	atgaagcagg	gcagggcgga	gggatgcta	cttctatga	ctgtgccatc	ttcaccctcc	25320
	gcctaccctc	tggccccccag	acggaggagg	cacggaaaaa	cctgctgcgg	ctgcaggacc	25380
35	tggtagacaa	gctgcagcta	aagggtcaag	cctacaagcg	ccaggccgag	gaggcggtga	25440
	gtgaccctgc	tggggactag	gcccagggga	ggcataggag	agctcgtccc	ccaagccagg	25500
	agtctgagaa	cccaggcccc	ctctcacctc	atgctccccc	ctcccgagag	aggagcaagc	25560
	caacaccaac	ctgtccaagt	tccgcaaggt	gcagcacgag	ctggatgagg	cagaggagcg	25620
	ggcgacatc	gccaggtccc	aggtcaacaa	gctgcggggc	aagagccgtg	acattggcac	25680
	gaaggtgggt	ccctcttttg	ggctttgcta	ctcaccacca	cagcaggcat	acccagacag	25740
40	agcacctca	aaccgggat	gcttcccttt	cattttattcc	acacacttga	gccacatggc	25800
	cccagaggcc	aaggtaatgc	agttctctgt	gatttcaagg	attcttccag	ctctaacttt	25860
	tttttttttt	ttttttgaga	cggtgtctca	ctctgccgcc	caggctggag	tgcaaggcca	25920
	caatctcagc	tactgcaac	ctctgcctcc	tgggttctcc	tgccctcagcc	tcccaagtga	25980
	ctgggattat	aggtcatgtg	taccatgtct	agctaaattt	tatatatttag	tagagatgag	26040
45	gtttaccat	gttggccagg	ctggtcttga	actcctgacc	ttgtgatcca	ctcgctcag	26100
	cctcccaaag	tacgggatta	caggcggtga	gcaccactcc	cagctcagct	ctaagtttca	26160
	gtggttctgg	gaatttcagc	gttagggagg	ggtgccacct	agaagaccct	aatttatata	26220
	caaccagtat	atcccagttt	cccccaact	gctagtttcc	agttcccttc	cacctaat	26280
	tgtcctgcaa	tcattgtaac	taaaacctaa	aatggacatc	ccagagaacc	cgggcctggc	26340
50	tttgttctcg	cccaggcaac	ttccctctga	ccaaccccag	aacctacc	tccagaactt	26400
	gccccccgac	catcgatccc	tggaaacaca	tgtgctgctg	ccacaggggc	ttccacctgc	26460
	ccacaaagca	ggccccccac	catcagacc	ctctcacctt	tgttcccatg	ccctgtccct	26520
	gcccataacc	atctctccaa	ggactgattg	gactttgttt	cctttcaaaa	gggcttgaat	26580
	gaggagtagc	tttgccacat	cttgatctgc	tcagccctgg	aggtgccagc	aaagcccat	26640
55	gctggagcct	gtgtaacagc	tccttgggag	gaagcagaat	aaagcaattt	tccttgaagc	26700
	cgagatcctg	actccagact	cttcttcaact	gcctgagga	ccgggggatg	gggtctggca	26760
	taggggaggt	ggaaatgcac	gggagtgagg	gcaaattcaa	aggcctggcc	taggaggcct	26820
	tcgtggagca	gcactgaaaa	cccctttcac	ttcccccaaa	ccagccaaat	gcagtagagg	26880
	cgacacctct	cctcccagcc	ttctccctgg	tccagccagg	atttaaaggga	gatttaggga	26940
	gacccctaaa	gttcacctag	agcaccctga	gcccactctac	tgtggacctg	cacccagct	27000
60	tccgtcaacc	ctgccccacc	caccacctgc	gatactgcc	agggctgggc	aaagggcagc	27060
	ggttcggggg	gtgggtgctg	gccagtgcgc	tttctgagcc	cggagaagtt	gtgaaccact	27120
	gggcccaggtg	aggcaatggc	tgccataagt	ccagtcccag	gcgagtctct	gagagtacac	27180
	aaggattcac	agctgtagcc	tgcatcccct	tttaaataga	gccaccaccc	tctccagcca	27240
	ccgcccagaag	ccagcatacc	ccctgcccac	cacaggtgga	gaaacacacc	ctcagcccac	27300
65	ctgcccgtcct	cctcagctcc	tcctgggtgc	gagccccctt	ggcccagggt	gctcccttct	27360
	tcccactcat	ttcttcccat	gttaattccc	attaccaagc	cctttgtcct	ctgggcttgt	27420
	gggaagatgg	ggttctcctg	gcccatttat	ggcaagccat	tcttgagggg	aggcagacag	27480

ES 2 317 713 B1

```

    atgaggggct ggggaagggt atgtgtgaac aggactctgg ggagagggag ggaagggatg 27540
    gctcccagaga gggccaggag gtggaggaaa gagtaagtct cctccaacta aacaagttca 27600
    gccccttttg agttcctgcc acagctggat tgcttaggca ggcctggtac tgtggggccac 27660
5    agaggtcagg ggcttgaaag gcactggggc tgctggacc cactgggaac ctgggaagga 27720
    gtggttcaac cctggactgg atctcccca acccaccac cataccact cggagcccac 27780
    tcctgctctc taccagctc tgagctctga ggactgcggc agcagagcca agggcctaag 27840
    ccggagaagg agaaacacta ctggacaata gcaggtgaca gcagaggaga aaaagggggt 27900
    agggagggga caaggaaaga acctgagggg gtggcagtgg acaaagagat tgagcaacca 27960
10   caggacaagg taaccagagg aaacagagac aaggaaaaaa gatgcaggaa atgaggaggc 28020
    cccagaaaga tccgcagcgc cgccaccttt ctctcatag ccacctccat tctccttccc 28080
    taggccaacc cagacagagc tcctcaaaac agggatgctt ccttttcatt tatccagctc 28140
    aattgaacca cacagcccca gaggccaagg taattcagta tctctgtgat ttctaggatt 28200
    ctttcagtcc tttttgtttt tgtttttgtt tttgtgacgg agtctcactc tgctgccag 28260
15   gctggagtgc agtggcacaa cctcggcttg ggccgagatc cctagggcca ttctcttggc 28320
    taggaacaga cttggacagc aatgcaagag ataactagaa acaaaggaga gaacccttga 28380
    aaagggagct atgcagagag acccagggca cctaagcaac cagagcaaga gagaccgcaa 28440
    gagatacaga tc                                     28452

20   <210> 2
    <211> 21
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

25   <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 3 del gen MYH7
        en combinación con la SEQ. ID. NO: 3

30   <400> 2

        ggcagccagc ttctgctcac t                                     21

35   <210> 3
    <211> 23
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

40   <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 3 del gen MYH7
        en combinación con la SEQ. ID. NO: 2

45   <400> 3

        gactctcaca tcagcctgac acc                                     23

50   <210> 4
    <211> 20
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

55   <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 4 del gen MYH7
        en combinación con la SEQ. ID. NO: 5

60   <400> 4

        tcactcacca actcctaacc                                     20

65   <210> 5
    <211> 20

```

ES 2 317 713 B1

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 4 del gen MYH7
en combinación con la SEQ. ID. NO: 4

<400> 5

10 gggaggacat ggatggagca 20

<210> 6

15 $\langle 211 \rangle$ 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

²⁰ <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 5 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 7

<400> 6

25 gcaactggca agtcactgct c 21

30 $\langle 210 \rangle$ 7

 $\langle 211 \rangle$ 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 5 del gen MYH7
en combinación con la SEQ. ID. NO: 6

40 <400> 7

ccagttccct tcaggaagac ctt 23

45 $\langle 210 \rangle$ 8

 $\langle 211 \rangle$ 20

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 6 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 9

55 $\langle 400 \rangle$ 8

gagaagcccc acgagagcat 20

<210> 9

 $\langle 211 \rangle$ 20

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

ES 2 317 713 B1

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 6 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 8

5 <400> 9

tggaggctgg gatcaggag 20

10 <210> 10

<211> 20

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 7 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 11

20 <400> 10

ctgatttgag gcttgctggt 20

25 <210> 11

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 7 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 10

35 <400> 11

aagaaggagg caggtagag 20

40

<210> 12

<211> 22

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 8+9 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 13

50

<400> 12

ctctcacctg cctccttctt gg 22

55

<210> 13

<211> 22

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 8+9 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 12

65

ES 2 317 713 B1

<400> 13

gctgagccta gcagattcat gg 22

5

<210> 14

<211> 22

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 10 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 15

15

<400> 14

gtgcccaaac cctaactttt ct 22

20

<210> 15

<211> 22

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 10 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 14

30

<400> 15

35 atagttggtc tcagtcggtg gc 22

<210> 16

40 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 11 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 17

<400> 16

50 cttgtgtccc accctaacca tgt 23

<210> 17

55 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 11 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 16

<400> 17

65 tttgcccctc actgccaatc ctc 23

ES 2 317 713 B1

<210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 12 del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 19
 10
 <400> 18

 tttctggggt ccgccaatat gg 22
 15
 <210> 19
 <211> 22
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 12 del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 18
 25
 <400> 19

 agctgccccca agaatacctgc ct 22
 30
 <210> 20
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 13 del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 21
 40
 <400> 20

 ctcttaccaa ctttgctctt gcc 23
 45
 <210> 21
 <211> 22
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 13 del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 20
 55
 <400> 21

 60 cctgcccacc cattatcatc tg 22

 <210> 22
 65 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 317 713 B1

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 14 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 23

5 <400> 22

cttcccaaca accctgctca atatg 25

10 <210> 23
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 14 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 22

20 <400> 23

gtgattgttc tcccactccc agg 23

25 <210> 24
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 15 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 25

35 <400> 24

tttctgactg ctcccacccc tcat 24

40 <210> 25
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 15 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 24

50 <400> 25

gggagaattc aggtggtgtaag gc 22

55 <210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 16 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 27

65

ES 2 317 713 B1

<400> 26

ttgaccatag agcagaatcc

20

5

<210> 27

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 16 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 26

15

<400> 27

ctcagaacct tggcagaatc

20

20

<210> 28

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 17 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 29

30

<400> 28

tcttactcac accctacctc

20

35

<210> 29

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 17 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 28

45

<400> 29

gggctgggtg gggttgggc

19

50

<210> 30

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 18 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 31

60

<400> 30

cttcctgcat ctctttcttg ca

22

65

ES 2 317 713 B1

<210> 31
 <211> 22
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 18 del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 30
 10
 <400> 31

 agcagtgagg tggccctagt tt 22
 15
 <210> 32
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 19 del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 33
 25
 <400> 32

 ccagttctca cagactcctc ctac 24
 30
 <210> 33
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 19 del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 32
 40
 <400> 33

 ccctgttcta tgagcttctg gtg 23
 45
 <210> 34
 50 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 20 del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 35
 55
 <400> 34
 60
 ggatctgcag gtgaccctag aat 23

 <210> 35
 65 <211> 22
 <212> ADN

ES 2 317 713 B1

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 20 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 34

<400> 35

acaacaggaa aagcatcaga gg

22

<210> 36

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 21 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 37

<400> 36

tccctagtca tggccaacac a

21

<210> 37

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 21 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 36

<400> 37

agcgggaaac ctcctcttga g

21

<210> 38

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 22 A del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 39

<400> 38

tcaggacctc aggttaggaag gag

23

<210> 39

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 22 A del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 38

ES 2 317 713 B1

<400> 39

ctcttttgagg cgtgtgaact cc 22

5

<210> 40

<211> 22

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 22 B del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 41

15

<400> 40

gctgaagagt gcagaaagag ag 22

20

<210> 41

<211> 20

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 22 B del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 40

30

<400> 41

tgtgggaagt gaaggcagag 20

35

<210> 42

<211> 23

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 23 A del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 43

45

<400> 42

aagaatgagg accttacccc ctg 23

50

<210> 43

55 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 23 A del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 42

60

<400> 43

65 gctctgagca ctcatcttcc aac 23

ES 2 317 713 B1

<210> 44
 <211> 22
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 23 B del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 45
 10
 <400> 44

 ggctaaggtg aaggagatga ac 22
 15
 <210> 45
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 23 B del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 44
 25
 <400> 45

 tctgagagtc ctgatgagac cc 22
 30
 <210> 46
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 24 del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 47
 40
 <400> 46

 ccctaaagga gatgggattc ttg 23
 45
 <210> 47
 <211> 22
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 24 del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 46
 55
 <400> 47
 60
 tctaggcccc acaactctca at 22

 <210> 48
 65 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 317 713 B1

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 25 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 49

5 <400> 48

10 agtcaggatg ctttgcctca 20

<210> 49

<211> 20

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 25 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 48

20 <400> 49

25 ttgtactggt atgggctggg 20

<210> 50

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 26 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 51

<400> 50

40 attttcacca ctggtggacc 20

<210> 51

45 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 26 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 50

<400> 51

55 aatgctgtga acaggacacc 20

60 <210> 52

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 27 A del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 53

ES 2 317 713 B1

<400> 52

attccagtgg aggggtcca

19

5

<210> 53

<211> 19

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 27 A del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. N0: 52

15

<400> 53

cgccgcatct tctggaact

19

20

<210> 54

<211> 19

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 27 B del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 55

30

<400> 54

agttccagaa gatgcggcg

19

35

<210> 55

<211> 21

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 27 B del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 54

45

<400> 55

tgggaggagg aagttggagg a

21

50

<210> 56

<211> 20

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 28 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 57

60

<400> 56

gcacctctta cacccttca

20

65

ES 2 317 713 B1

<210> 57
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 28 del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 56
 10
 <400> 57

 tgtgcgtgta ttggcttgtg 20
 15
 <210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 29 del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 59
 25
 <400> 58

 aggtggggat agagaggagt 20
 30
 <210> 59
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 29 del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 58
 40
 <400> 59

 gatgcaaggc tagtcagtgt g 21
 45
 <210> 60
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 30 del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 61
 55
 <400> 60
 60
 atggagaaaag ctgaaccac 20

 <210> 61
 65 <211> 19
 <212> ADN

ES 2 317 713 B1

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 30 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 60

<400> 61

10 ctgagtcctg cctgcaaag 19

<210> 62

 $\langle 211 \rangle$ 20

15 $\langle 211 \rangle$ 20
 $\langle 212 \rangle$ ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 31 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 63

<400> 62

25 tgtttcctct tgtccccatc 20

<210> 63

30 $\langle 211 \rangle$ 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 31 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 62

<400> 63

40 ctctcactga acccctcatg 20

<210> 64

 $\langle 211 \rangle$ 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 32 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 65

<400> 64

ctgagacaga ccctggacat 20

<210> 65

 $\langle 211 \rangle$ 20

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

ES 2 317 713 B1

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 32 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 64

5 <400> 65

gcaccatatg ggaacactgc 20

10 <210> 66
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 33 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 67

20 <400> 66

tggacctcag cagccctcaa a 21

25 <210> 67
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 33 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 66

35 <400> 67

accaaaagcc tggagctcag 20

40 <210> 68
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 34 A del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 69 i

50 <400> 68

atccatgatt agtgagcagg cc 22

55 <210> 69
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 34 A del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 68

65

ES 2 317 713 B1

<400> 69

tcttcttctt caccctcagg g

21

5

<210> 70

<211> 21

<212> ADN

10

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 34 B del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 71

15

<400> 70

ccctgagggg gaagaagaag a

21

20

<210> 71

<211> 22

25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 34 B del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 70

30

<400> 71

tcaagacact actgcttacg cc

22

35

<210> 72

<211> 20

40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 35 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 73

45

<400> 72

tagtgaaggg aaccgaggct

20

50

<210> 73

<211> 20

55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 35 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 72

60

<400> 73

gctcccttca ggaatgagca

20

65

ES 2 317 713 B1

<210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 36 del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 75
 10
 <400> 74

 caaggccttga gagctatgca 20
 15
 <210> 75
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 36 del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 74
 25
 <400> 75

 ctggtcaagt cctcacacac t 21
 30
 <210> 76
 <211> 19
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 37 A del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 77
 40
 <400> 76

 tgggcagcaa gtgtgtgag 19
 45
 <210> 77
 50 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 37 A del gen MYH7
 en combinación con la SEQ. ID. NO: 76
 55
 <400> 77
 60
 cttctgcagc tgcttcttg 19

 <210> 78
 65 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 317 713 B1

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 37 B del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 79

<400> 78

caagaagcag ctgcagaagc

20

<210> 79

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 37 B del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 78

<400> 79

cctcagctgg ttgtcactgt

20

<210> 80

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 38 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 81

<400> 80

ctatgactgt gccatcttca cc

22

<210> 81

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 38 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 80

<400> 81

ggttctcaga ctctctggctt

20

<210> 82

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 39 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 83

ES 2 317 713 B1

<400> 82

5 aagccaggag tctgagaacc c 21

<210> 83

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 39 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 82

15 <400> 83

20 tgtctgggta tgctgtctgt 20

<210> 84

<211> 21

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 40 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 85

30 <400> 84

35 accatcagac ccctctcacc t 21

<210> 85

<211> 20

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 40 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 84

45 <400> 85

50 tattctgctt cctcccaagg 20

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 317 713

⑫ Nº de solicitud: 200401428

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 07.06.2004

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	RAMÍREZ CD et al. "Familial hypertrophic cardiomyopathy: genes, mutations and animal models. A review". Investigación clínica. Mar 2004. Vol. 45, Nº. 1, páginas 69-99. ISSN 0535-5133 (Print).	1-31
X	ERDMANN J. et al. "Mutation spectrum in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy". Clinical genetics. Oct 2003. Vol. 64, Nº. 4, páginas 339-349. ISSN 0009-9163 (Print).	1-31
X	NANNI L. et al. "Hypertrophic cardiomyopathy: two homozygous cases with "typical" hypertrophic cardiomyopathy and three new mutations in cases with progression to dilated cardiomyopathy". BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. 20030919. Vol. 309, Nº. 2, páginas 391-398. ISSN 0006-291X.	1-31
X	MOHIDDIN SAIDI A. et al. "Utility of genetic screening in hypertrophic cardiomyopathy: prevalence and significance of novel and double (homozygous and heterozygous) beta-myosin mutations". Genetic testing. 2003. Vol. 7, Nº. 1, páginas 21-27. ISSN 1090-6576 (Print).	1-31
X	DAEHMLOW STEFFEN et al. "Novel mutations in sarcomeric protein genes in dilated cardiomyopathy". Biochemical and Biophysical Research Communications 18.10.2002. Vol. 298. Nº. 1, páginas 116-120. ISSN 0006-291X (Print).	1-31
A	EP 0801685 A1 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL AND HARVARD COLLEGE) 22.10.1997	1-31

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

16.03.2009

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.03.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-31	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-31	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Ramírez CD et al. "Familial hypertrophic cardiomyopathy: genes, mutations and animal models. A review". Investigación clínica. Mar 2004. Vol. 45, N°. 1, páginas 69 - 99. ISSN 0535-5133 (Print)	01.03.2004
D02	Erdmann J. et al. "Mutation spectrum in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy". Clinical genetics. Oct 2003. Vol. 64, N°. 4, páginas 339 - 349. ISSN 0009-9163 (Print).	2003
D03	Nanni L. et al. "Hypertrophic cardiomyopathy: two homozygous cases with "typical" hypertrophic cardiomyopathy and three new mutations in cases with progression to dilated cardiomyopathy". BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. 19.09.2003. Vol. 309, N°. 2, páginas 391 - 398. ISSN 0006-291X.	19.09.2003
D04	Mohiddin Saidi A. et al. "Utility of genetic screening in hypertrophic cardiomyopathy: prevalence and significance of novel and double (homozygous and heterozygous) beta-myosin mutations". Genetic testing. 2003. Vol. 7, N°. 1, páginas 21 - 27. ISSN 1090-6576 (Print).	2003
D05	Daehmlow Steffen et al. "Novel mutations in sarcomeric protein genes in dilated cardiomyopathy". Biochemical and biophysical research communications. 18.10.2002. Vol. 298. N°. 1, páginas 116 - 120. ISSN 0006-291X (Print).	18.10.2002
D06	EP 0801685 A1	22.10.1997

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga un método para diagnosticar la predisposición genética a desarrollar miocardiopatía hipertrófica.

En concreto las reivindicaciones 1-19 caracterizan el método por detectar la presencia o ausencia de una mutación puntual en el gen MYH7, que codifica la cadena pesada de la beta miosina cardiaca humana, en el que dicha mutación puntual asociada con la MCH es la mutación Met388Thr. El gen MYH7 comprende la secuencia SEQ.ID N° 1. La mutación Met388Thr conlleva el cambio de nucleótido 10127T>C. El método se basa en una amplificación PCR, que a su vez puede ser anidada u otras variantes usualmente utilizadas en el estado de la técnica.

Las reivindicaciones 20-25 caracterizan un Kit para que contenga los reactivos específicos para detectar dicha mutación. Entre esos reactivos se encuentran enzimas de restricción NlaIII y oligonucleótidos iniciadores SEQ.ID.NO 20, SEQ.ID.NO. 21 y sus mezclas (reivindicación 26).

Las reivindicaciones 27-31 caracterizan un biochip que comprende un reactivo específico para detectar la presencia o ausencia de, al menos, una mutación puntual en el gen MYH7 asociada con la MCH, en el que dicha mutación puntual asociada con la MCH es la mutación Met388Thr soportado sobre un soporte sólido. Este biochip comprende como oligonucleótidos iniciadores SEQ.ID.NO 20, SEQ.ID.NO. 21 y sus mezclas. Además comprende los oligonucleótidos identificados como SEQ.ID. NO: 1-19, SEQ.ID.NO.22-85.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga la mutación descrita en la presente solicitud, por lo que parece que cumpliría con el requisito de novedad.

Hoja adicional

Los documentos D1-D5 se consideran de particular relevancia dentro del estado de la técnica a la hora de valorar la actividad inventiva de la presente solicitud. A la luz de los documentos anteriormente citados parece que las reivindicaciones 1-31 carecerían de actividad inventiva ya que representa una alternativa de realización obvia a los métodos de detección de mutaciones en el gen MYH7 para diagnosticar o determinar la predisposición genética de un sujeto a desarrollar cardiomiopatía hipertrófica (MCH) divulgados con anterioridad a la fecha de presentación de la solicitud.