



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 340 459**

② Número de solicitud: 200803452

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

ADICIÓN A LA PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **01.12.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2010**

Fecha de la concesión: **16.02.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **28.02.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
28.02.2011

⑰ Número de solicitud de la patente principal:
200401428

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;
Muñiz García, Javier;
Montserrat Iglesias, Lorenzo y
Hermida Prieto, Manuel**

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 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

15 La miocardiopatía hipertrófica (MCH) es una enfermedad autosómica dominante que representa un grupo heterogéneo 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
20 y aparentemente sanos.

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
25 bien establecidas (Marón 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 engrasamiento 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).

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 (TNNC1); 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 quinasa (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).

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>).

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
55 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.

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.

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

ES 2 340 459 B1

MYH7 asociada con el desarrollo o la predisposición a desarrollar MCH identificada en esta invención es la mutación Ala797Pro, la cual se definirá detalladamente más adelante.

5 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.

10 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 Ala797Pro.

15 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 Ala797Pro, como indicador de la enfermedad.

20 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 Ala797Pro, y diagnosticar el sujeto de MCH mediante la detección de la presencia o ausencia de, al menos, dicha mutación, como indicador de la enfermedad.

25 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.

30 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.

40 Descripción detallada de la invención

Definiciones

45 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).

50 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.

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

60 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.

65 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.

ES 2 340 459 B1

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) denDunnen 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 Ala797Pro.

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>
Ala797Pro	14131G>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.

ES 2 340 459 B1

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.

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.

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.

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).

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.

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.

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).

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 dideoxinucleótidos (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).

ES 2 340 459 B1

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 Ala797Pro.

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 Ala797Pro, 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 Ala797Pro.

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 oligonucleótidos que permite distinguir el alelo que contiene una G en la posición 14131 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 G en la posición 14131 de la SEQ. ID. NO: 1 del alelo que contiene una C en dicha posición, tal como, por ejemplo, la enzima de restricción Cac81.

ES 2 340 459 B1

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: 36, SEQ. ID. NO: 37, y sus mezclas. Dichos oligonucleótidos iniciadores constituyen un aspecto adicional de la presente invención.

Los oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ. ID. NO: 36 (directo) y SEQ. ID. NO: 37 (inverso) permiten amplificar un fragmento correspondiente al exón 21 del gen MYH7 útil para identificar la mutación Ala797Pro (14131G>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 Ala797Pro 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 cardiaca 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: 36, SEQ. ID. NO: 37, y sus mezclas.

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

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 340 459 B1

TABLA 1

Oligonucleótidos iniciadores para la amplificación de fragmentos del gen MYH7

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

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
	SEQ. ID. NO: 43	Inverso
Ex 23 B	SEQ. ID. NO: 44	Directo

ES 2 340 459 B1

	SEQ. ID. NO: 45	Inverso	
5	Ex 24	SEQ. ID. NO: 46	Directo
		SEQ. ID. NO: 47	Inverso
10	Ex 25	SEQ. ID. NO: 48	Directo
		SEQ. ID. NO: 49	Inverso
15	Ex 26	SEQ. ID. NO: 50	Directo
		SEQ. ID. NO: 51	Inverso
20	Ex 27 A	SEQ. ID. NO: 52	Directo
		SEQ. ID. NO: 53	Inverso
25	Ex 27 B	SEQ. ID. NO: 54	Directo
		SEQ. ID. NO: 55	Inverso
30	Ex 28	SEQ. ID. NO: 56	Directo
		SEQ. ID. NO: 57	Inverso
35	Ex 29	SEQ. ID. NO: 58	Directo
		SEQ. ID. NO: 59	Inverso
40	Ex 30	SEQ. ID. NO: 60	Directo
		SEQ. ID. NO: 61	Inverso
45	Ex 31	SEQ. ID. NO: 62	Directo
		SEQ. ID. NO: 63	Inverso
50	Ex 32	SEQ. ID. NO: 64	Directo
		SEQ. ID. NO: 65	Inverso
55	Ex 33	SEQ. ID. NO: 66	Directo
		SEQ. ID. NO: 67	Inverso
60	Ex 34 A	SEQ. ID. NO: 68	Directo
		SEQ. ID. NO: 69	Inverso
65	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 2 340 459 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 engrasamiento 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).

1.3 Amplificación de las secuencias de DNA

25 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 durante 5 minutos.

35

1.4 SSCP

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.

40

1.5 Secuenciación directa de los productos de PCR

45 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 las instrucciones del fabricante. Se usaron los iniciadores que figuran en la Tabla 1.

50 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 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
55 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.

Ejemplo 2

60

Identificación de una mutación en el exón 21 del gen MYH7 asociada con MCH

65 En la familia FL se encontró la mutación 14131G>C, es decir, un cambio de G (guanina) por C (citosina) en el nucleótido 14131 (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 alanina (Ala) a prolina (Pro) en el aminoácido 797 de la cadena pesada de la beta miosina cardíaca humana (Ala797Pro).

ES 2 340 459 B1

Esta mutación “missense” abole una diana de corte para la enzima de restricción Cac8I que está normalmente presente en el exón 21 lo que proporciona un método independiente para realizar el diagnóstico genético. Se amplificó la secuencia correspondiente al exón 21 del gen MYH7 a partir de DNA genómico obtenido de sangre periférica. Se usaron como iniciadores los oligonucleótidos identificados mediante la SEQ. ID. NO: 36 (directo) y la SEQ. ID. NO: 37 (inverso). El producto de PCR se digirió con Cac8I y posteriormente se sometió a electroforesis en gel de agarosa. La secuencia normal producía 3 fragmentos de 30, 66 y 106 pb respectivamente. La secuencia mutada carecía del sitio de corte para Cac8I, y, por tanto, la mitad del producto de PCR de los individuos portadores tenía el tamaño de 172 pb.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 340 459 B1

REIVINDICACIONES

5 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 Ala797Pro.

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

15 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, Ala797Pro, sones el siguiente:

<u>Mutación</u>	<u>Cambio del nucleótido</u>
Ala797Pro	14131G>C

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

25 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.

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

35 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.

40 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.

45 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 (3SR), 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.

50 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, Ala797Pro, se detecta mediante el empleo de sondas de oligonucleótidos marcadas con un grupo marcador detectable.

55 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.

60 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, Ala797Pro, se detecta mediante digestión con enzimas de restricción y análisis de los fragmentos de restricción (RFLP).

65 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, Ala797Pro, se detecta mediante secuenciación directa de nucleótidos, minisequencia-

ES 2 340 459 B1

ción 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).

- 5 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
10 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 Ala797Pro.
- 15 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 Ala797Pro, y diagnosticar el sujeto de MCH mediante la detección de la presencia o ausencia de dicha mutación puntual en dicho
20 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 Ala797Pro.
- 25 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 oligonucleótidos que permite distinguir el alelo que contiene una G en la posición 14131 de la SEQ. ID. NO: 1 del alelo que contiene una C en dicha posición.
- 30 22. Kit según la reivindicación 20, que comprende, al menos, una enzima de restricción que permite distinguir el alelo que contiene una G en la posición 14131 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 enzima de restricción Cac8I.
- 35 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.
- 40 25. Kit según la reivindicación 24, que comprende un oligonucleótido iniciador seleccionado del grupo formado por los oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ. ID. NO: 36, SEQ. ID. NO: 37, y sus mezclas.
26. Un oligonucleótido iniciador seleccionado del grupo formado por los oligonucleótidos iniciadores identificados como SEQ. ID. NO: 36, SEQ. ID. NO: 37, y sus mezclas.
- 45 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 Ala797Pro, soportado sobre un soporte sólido.
- 50 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 oligonucleótidos que permite distinguir el alelo que contiene una G en la posición 14131 de la SEQ. ID. NO: 1 del alelo que contiene una C en dicha posición.
- 55 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: 36, SEQ. ID. NO: 37, y sus mezclas.
- 60 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: 35, y SEQ. ID. NO: 38- SEQ. ID. NO: 85.

ES 2 340 459 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDADE DA 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	tcagtgagg	cccacagtgt	gtctgctgtg	180
	tgtagactct	gcttgtgcaa	tctctaattg	cctgagtagc	cctggaaca	aatgtggct	240
	atccccatgt	tacagatgac	aaaactggct	caaagcaatt	atatgactga	cgtagaccac	300
25	acagctagaa	aatggaatca	ctgggttca	aagtggattt	ttgtgactga	ctccaaagct	360
	gaccagagtg	ctcatcctgt	atgcttctga	ggcctctggc	cctccagacc	ggcactccc	420
	cacaaagtct	cccttttgg	gagttgtgtc	cctccaaaca	ctccctgaag	gcaagatcaa	480
	cctgccctaa	ctaccccaa	gtgaactagg	ccagcccaa	gcctgtctcc	ggccctccat	540
	ctctctcttt	gttcacatcc	atcagaaagc	agagacctag	agtagggaat	gagaggggt	600
	gcacaagtac	aaaagatttt	gaagcagcag	gaagacgaa	gaagtacaag	aaggagcagc	660
30	tgtttgtaaa	agggaaaatc	tgagacaggc	agaaagctca	gctccctaata	cctaggctcg	720
	tgtggagcca	gggcagggtc	ccccaaagtc	agggattctg	ggggcaggcg	gatgggagag	780
	tcagcctcca	ctcctgggtg	gctcccctct	gccctgtgca	caaacaacga	gtgcctcatt	840
	cctcccctgc	accaagtgcc	ctgcctcttc	ctgcccggt	tcttccttcc	ctttgggtac	900
	cggatctttt	ttctgattcc	cctctctcca	tgtctgacatc	gcttctaatt	cgccctgggtg	960
35	tctccctccc	tcacaattac	tgggagtaat	tttagcaact	tttcctctga	actaccgctg	1020
	gcgtgttcac	agcaaatggc	ccctgttttg	gcttgacact	tgatcagggt	ggtgacagag	1080
	tgcagacaaa	gocggcacia	tgcggggagg	ggaggaccgg	ggcagatcac	cttcctttca	1140
	cttcaggggc	ttatthttgtc	taccttgccg	aagcggccct	ccttccagcc	tctctttatt	1200
	tatagcattt	tgtttgtct	cctttatctt	gctatcactt	gtagcacact	ctgcacaatc	1260
40	cccaccacc	ccagcatggc	ggggccctcg	gctcactctc	cccacaagga	atgtgcatgt	1320
	gtgcaaagg	taggcctgga	tgccatttct	acaaacagtt	gactaaagca	gtccagagca	1380
	gggatctttc	tttgggtcat	tgttatgtcc	ttattgacca	gaataatgcc	tggcacatag	1440
	taggcactca	ataaatactt	gttgaatgga	ggaatctgca	aagctgctca	gtcttcagac	1500
	agcagcaagc	agcaggaaga	gaatcatgat	gtaaccaaga	gcaggtgctg	gaggagctag	1560
45	ggagttagtg	gggatcttta	aggacagcag	gcctctgat	ctgtctgagc	gtgtgagcaa	1620
	agcctagtta	gggaggtgag	ttctatctgc	aatgagagg	ggcatgggtg	gagacagata	1680
	acaccaacac	caacagacca	gacctccaa	acccgaaagg	agagacaaag	tgtgattgat	1740
	ttoccaaagt	cagaaaagac	tacccaagtc	cccagccaag	aagaatcgct	ggcctgtgga	1800
	tgaagacact	ggctttgaaa	tggctcaact	acgtcccaag	caccctttgt	gcatcttaat	1860
50	tgcctgggga	aatcagggag	gggtggcagt	ttggagcttg	gaaagctgga	aggtggggac	1920
	gaaaggagtt	tttgcccctc	atcgccaatc	cttgaggttc	ctacagggaa	cctcagacaa	1980
	cagctgtctt	aggggtttcc	ttccagctcc	aagcagctgt	attatctata	gctttgagag	2040
	ggctctgtct	tgtcaatggg	gctgattcct	cagcacctgg	cagggcctgg	gggggactgc	2100
	cagagtctgt	tctgccgggc	atgtagtag	cacagactac	tgggataacc	tcagcaactg	2160
55	tataccttag	cactgcagag	ctgcgggtgt	gtcagacaca	ggcccttgca	gttctgtggtc	2220
	tacccact	tgctgcacc	ccccttatag	ctgctcaatg	tcctcagact	gtaccttagt	2280
	gccttgggta	ccaagcaacc	cccacagagg	ccctcctcct	ggattttccc	ttccctgcta	2340
	tgccaccacc	accttcaaaa	tgtacctgct	gcaccatcc	cccaggcctg	cctcactcct	2400
	tccaagctga	cagctaataca	gatggactaa	tgcctgctgc	ggaagagctg	tgtctgggaa	2460
	gaagggggag	atthtcacacc	aaatcgtgca	gtggttgcct	agacacggag	ccagtcaagc	2520
60	ttgctatgcc	cgttgctaga	agagcatggc	atcggttggt	ttctgtgctc	gtagctggg	2580
	cccagctcc	ctttcctccc	ctcctttgtg	gctgttctct	aggcctgcag	aggggaagat	2640
	ttttcctgtc	ctgttaactct	gectcaactg	ccagaacact	agtcgcctcc	agctctggat	2700
	aaagctgagg	ctgggtgggc	cagacaacag	ctgtccttagg	ggtctccttc	cagctccaag	2760
	tagttgtatt	atctatagct	ctgagagggt	ctgtctctgg	gctcaggcct	ttagtacctg	2820
65	tggggcagag	ccaggaacgt	gagtcaggca	aaccgctcca	aactaggacc	aatgcagctg	2880
	ggctctgtct	tctgctgata	gggggtccc	acatctttgg	aatcccagcc	cacctttcca	2940
	ggctaccctc	cacaggccgg	gctccactcc	catctgctga	ggtttcccac	cttgaatcct	3000

ES 2 340 459 B1

	gctgccccga	ttagctgtat	aaccttaaag	aatgcactgt	ccctctccat	taaatgaagt	3060
	gcttggatga	attgctaag	gectgtctgg	ctcggaggct	tgggtgectca	acacattgcc	3120
	tgctggtcca	aggaatcag	tgccctgagcc	atagtcoccca	tctctaagct	coatggttat	3180
5	tgttcttgcc	acctggctag	gaaatgtect	tcacagtgcc	ccagtctagc	tgccctcacc	3240
	tggggccatg	ccccactct	gtcctaccct	tctctgctgc	tgacactcag	ccccttccca	3300
	gcttccagtt	ggatacagga	cctgggccag	gagagcaggg	aggacactgt	ggaaatgccc	3360
	ccaggccatc	aggggcctcg	cagcagggga	ctggaggggg	agcagtgctc	agggccagaa	3420
	gtgcccctgg	ggagagccag	gacattggct	gectgtggtc	ttggtggctg	tggtcagttc	3480
10	cctctcctgc	cagctgtgga	atgtgaggcc	tggcctggga	gatatttttg	ctgcactttg	3540
	agccaccccg	ccccctgga	ctcagaccct	gcacagtcca	tgccataaca	atgacgacca	3600
	cttccaattg	tttcttagct	ggagaggcgg	ggaggggagc	actgtttggg	aaggggggga	3660
	gcctggggga	aatgcttcta	gtgacaacag	ccctttctaa	atccggctag	ggactgggtg	3720
	ccgttggggg	tggggtgccc	ctgctgcccc	atatatacag	ccctgagac	caggtctggc	3780
	tccacagctc	tgtcctgctc	tgtgtctttc	ctgctgctc	tcaggtagga	gctggagctg	3840
15	gagcctttac	tctgggataa	ggggctcca	ggcttaggaa	gggattcctc	ttggaaatag	3900
	aagcttcatg	caggacttca	tgacaggtac	caggtccagt	cactgggcac	acatgtgcag	3960
	gtctaaacat	gggcgtatgt	gccacaggag	ttccataggg	gcagatatct	gcatctgagc	4020
	atatgggacc	aatatgcatt	acaggtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgga	4080
	caagcctgca	tagtctgaat	gtgagaaagg	gtatgtacct	cactgactga	tacagaaata	4140
20	tcaagtggga	gatgtgggtg	tatgatcag	tctgtgaacg	aggaggttcc	tttgacggga	4200
	catgagtgtt	catcagaggg	cctgtgaggg	gtgtttggct	atgtgatggg	ttgtctgtg	4260
	aggcctggaa	tgtgtagcta	ccccgtcca	tgcatgcaga	ggttcttgtc	tatgctcca	4320
	cgagtaatga	ctgttatagt	atctgtacc	tctgcagaag	gaactcacag	gcacgggggt	4380
	gtaggatgtt	ccaggtcttt	gtgtactgaa	gaacacgcag	atgtgatcta	cttacgtggc	4440
25	acacatcctc	aaatgtgcac	atgtgtggt	gaggcatata	tggcacctcg	gggttgggg	4500
	gcggattgag	gtatgggaag	gaagcctgtc	ctcatgtgag	aggcatgccc	aagcagcagg	4560
	catgagtgtt	catcagaggg	cctgtgaggg	gtgtttggct	atgtgatggg	ttgtctgtg	4620
	agaggaagcc	cacagtgtct	tctctctgag	aatgtccaca	aagtctgaca	acaaaatggg	4680
	gacaggatgg	aaaagaagtc	tctttagagt	catcagactt	gcattcaagt	cttggctctc	4740
30	ccacttggtg	tcatgggctc	ttggccaagc	aagccattta	acctcgattt	cctcatctgt	4800
	caaatgggg	gaagactgag	taggagaaag	tgcatgaag	tgcttttaga	ctggaaagtg	4860
	ccgaacaaat	gtgaccatta	gttgtctctc	agatggctca	aagaaaggta	ccactagatg	4920
	ggtacagggca	gggggtggac	catctcgcag	gagtgaagag	gattaggggt	caggttagt	4980
35	tgacacagga	agctgttaga	actagtctt	gaggaaaaag	ggaatagggt	ttgaaaaaca	5040
	agaaggatgg	gttgggccag	agaagctgac	caccctttcc	acctgtttt	ggaagagggt	5100
	ggatgctgaa	gaacagagcc	agggagaagc	aggaaggtgg	gactggtcag	gtgggcacag	5160
	cctgcctga	cacagcctct	tcctctctc	caggtccctc	gcaggccttg	gcccctttcc	5220
	tcatctgtag	acacacttga	gtagcccag	taagaaaagc	tgaagctaga	gcgttgaaaa	5280
	tctagtaaga	ctgggatta	gagccccaaa	gagccctat	ggaactctag	ttctgccc	5340
40	gtgctggaga	gaatatcttg	gctatcaaga	gctacttacc	tgtgaccagg	gggtccagg	5400
	atagatgagg	gtcagagatg	gaaatagtta	gatttctgct	cctacagggg	acctgcagg	5460
	agctcagaat	gctcttctt	cccctaggag	agccccagct	tgaacaatag	ttagttgtt	5520
	cttttaccct	ggcaggtttg	ctaggctgct	cctctggtta	aggggtaacc	tcaaaaggaa	5580
	gggactcact	ggtaactcct	cttgactctt	gagcatgggt	ctaggttttg	gggctccc	5640
45	tgaaggggag	agcccaggg	gggaagggaa	gaatgggcag	atgggagggc	agccactctc	5700
	tgctcactcc	aggcacagcc	atgggagatt	cggagatggc	agtctttggg	gctgccgcc	5760
	cctacctgag	caagtcagag	aaggagcggc	tagaagcgca	gaccaggcct	tttgacctca	5820
	agaaggatgt	cttcgtgcct	gatgacaaac	aggagtgtgt	caaggccaag	atcgtgtctc	5880
	gagaggggtg	caaagtcact	gccgagactg	agtatggcaa	ggtgggtgct	aggctgatgt	5940
50	gagagtccac	cctggccacc	tgtacacctg	ggtggacaga	gaggggtaca	cccagcccc	6000
	atgcccatgc	agacctgagg	atggtcccat	tctccttccc	tttgggaaga	atccagacct	6060
	tccaaagagc	cctctccttc	ccaatatccc	ttctgtcttc	cctgtgagat	cctggttcct	6120
	tctctcttga	gcactattgc	cctgtcactc	accaactcct	aaccctcttg	aggaaggagg	6180
	gaaagcccag	gctgacagga	gggcttgggt	ggggctctt	gcagacagtg	accgtgaagg	6240
55	aggaccaggt	gatgcagcag	aaccaccca	agttcgaca	aatcgaggac	atggccatgc	6300
	tgaccttctc	gcatgagccc	gcgtgctct	acaacctcaa	ggatcgctac	ggctcctgga	6360
	tgatctacgt	gagtgtgca	cctggcccta	cgttgggata	tctgttcttg	ctccatccat	6420
	gtccacccca	ggagccaaga	gtgtctttctg	tttgtgtcta	ggcagggtta	cactctaacc	6480
	tcgtcccaac	atccttgggt	caattccaac	actctgggga	ctggcattac	tcagattgag	6540
	tgcatgcaga	ggttttctt	tctcttctt	ctctcctggg	atctttctct	aactcccaaa	6600
60	atcaccagcc	ctccccctc	gcaactggca	agtcactgct	ccttttctat	cccagacct	6660
	actcggcctc	cttctgtgct	accgtcaacc	cttacaagtg	gctgccgggtg	taccactcctg	6720
	aggtggtggc	tgcttaccgg	ggcaagaaga	ggagcgaggg	cccgcaccac	atcttctcca	6780
	tctccgacaa	cgctatcag	tacatgctga	caggtgagag	gccttggag	gtcttcttga	6840
	agggactgg	gataggccgg	gaggagaggg	gagaaggaag	ggagaagccc	cacgagagca	6900
65	ctctgtgcag	ctcctgacct	ttcctccca	ccctctcccc	acagacagag	aaaaccagtc	6960
	catcctgac	acgtgagtgt	agctgctact	gtattccctt	tcagaatctc	ctgatccca	7020
	gcctccagcc	ccatcaggtg	tcccaggccc	cgaggcatag	actcagcctc	tttccccca	7080

ES 2 340 459 B1

	acctcgtgcc	catctccttc	ttctctgacc	attaccctga	cccctctctt	tgctctccct	7140
	cttcctttct	gctttccoatc	cccttcgatgt	ttttcctctc	ccacctcctt	caccctactct	7200
	ccaactcatc	acgcgtttat	ccagaagctc	attatogcca	tgtcttcacc	tctgcatttt	7260
5	ctttcccttc	agaaacattt	cccattcttc	cagccctacc	aacttttccc	aaaacagccc	7320
	aggcccatct	cccctgttta	ctttgccocag	ccaagcacag	gtcagcctgc	ccaaaccagt	7380
	gccttctggt	ggcatccttc	ctggtgccag	ccctgacctc	tgtgcatcag	aagacagtgt	7440
	tggattttgg	gtgtagataa	cctggcagct	tcttgcccag	ggctcctact	ctcgggtagg	7500
	cccaggcatt	ctctcctgat	ttgaggcttg	ctggtctcca	gtagtattgt	tcaactgcca	7560
10	ataagcccct	gtcttcacag	cggagaatcc	ggagcagggg	agacagtcaa	caccaagagg	7620
	gtcatccagt	actttgctgt	tattgcagcc	atgggggacc	gcagaagaa	ggaccagagc	7680
	ccgggcaagg	taggcctgct	gccctccaag	gtcctgtacc	gcagaagggg	gggagaagag	7740
	ctctcacctg	cctccttctt	ggcctctgca	ggcacccctg	gaggaccaga	tcatccaggc	7800
	caaccctgct	ctggaggcct	ttggcaatgc	caagaccgtc	cggaacgaca	actcctcccg	7860
15	cttcgtgagt	ggtccctgac	cttggccttg	ggacttggac	tgggtggagga	atggtctcag	7920
	aatatgagcct	tccccaaact	catcaccact	ctcttccatc	tctccagggg	aaattcattc	7980
	gaattcattt	tggggcaaca	ggaaaagtgg	catctgcaga	catagagacc	tgtgagtgcc	8040
	atgaatctgc	taggctcagc	ctaagctcac	ccttgctcta	gaccatctgg	tcttgacctc	8100
	tctctctctc	ccctccctcc	ctctgttttt	ctcctcttta	agtctctgtc	tgtaggtgtc	8160
20	tctgtcttca	ggtctacata	tctgtctctc	tctgagactt	cctctgcatc	tttctccatt	8220
	tctgtctctg	catggctagg	tgtctttctc	tgggatttct	ctctgagact	atctctctcc	8280
	ttctgggtct	ctgtttccat	ctctctgtgt	gatctctttg	tgtctgtcca	actagtctct	8340
	ctggctcttc	ccttccctct	gccttttctg	tgtctacattt	atcattaatt	tctcttctgc	8400
	ccaaacccta	acttttcttt	ctctccttct	tctccccacc	tgttcacaga	tcttctggaa	8460
25	aaatccagag	ttattttcca	gctgaaagca	gagagagatt	atcacatttt	ctaccaaact	8520
	ctgtctaaca	aaaagcctga	gctgctgggt	gagtcagagc	caccgactga	gaccaactat	8580
	ctccatggca	acctggctcc	ctctgcttgt	ggctggactc	agctggcatg	ccctgggttt	8640
	catggcactg	ctggattcaa	ttcagtggga	tgtggggcca	agccaagccc	tgtcctgtgc	8700
	tgcttctctc	ggccatgtgc	tgtggcgagc	agctccatg	agagccgggg	gcttgtgtcc	8760
	caccctaacc	atgttttttc	ccctagacat	gctgctgatc	accaacaacc	cctacgatta	8820
30	tgcattcatc	tcccaaggag	agaccaccgt	ggcctccatt	gatgacgctg	aggagctcat	8880
	ggccactgat	gtgagtgtgt	gaggaccocag	ccaggggggtg	ggaggatttg	cagtgagggg	8940
	caaacagggg	tccaaaagca	gagctaagac	gctggccatt	ggttgtttta	agtggtatgg	9000
	acctcctgag	agccagaatg	tgcctgtgta	tcaggggtga	ctggggaatg	gatgaggtga	9060
	gacaggactg	gccagtatct	ggtgttctat	caaacaggga	agagctgaaa	gccatgagac	9120
35	agagagacac	acaagccaag	aaacaagcat	caccgagggg	gcaggacgag	gaggggaagg	9180
	catgcagacg	gcatggggct	ggaggggctg	ttaggtgaac	agatgcagac	aggtatggaa	9240
	ggccaggcag	gaagcaagtg	tagggccagg	aagcataagt	gggtaactca	gaaaagctgt	9300
	ggccactgac	actggggctg	cggccaactg	acgtctgctc	tgtctttgca	tcttacatcc	9360
	ttgtttttg	agttccctgc	atcttacatc	ctttgttttg	gagctcccca	ctgggtatgg	9420
40	gagtctcaga	acccacaggg	attaaggaga	caagttttct	ctccaactta	caagggatct	9480
	cacttaccca	tcatacttct	ttttctgggg	tccgccaata	tggggcctcc	ctacagaacg	9540
	cttttgatgt	gctgggcttc	acttcagagg	agaaaaactc	catgtataag	ctgacaggcg	9600
	ccatcatgca	ctttggaaac	atgaagttca	agctgaagca	gctgggaggag	caggcggagc	9660
	cagacggcac	tgaaggtggg	aggcagggat	tcttgggggc	agctgtcaag	tcatggaggg	9720
45	cctagtctgc	tcagcagtca	tctctctctc	cttttttctt	tttttttttt	ttttgagatg	9780
	gagtcttctg	ctggtgcccc	ggctggagcg	cagtggcacg	atcttggctc	actgccacct	9840
	ccacatcctg	ggttcaagtg	attctcctgc	ctcagcctcc	cgagttagctg	gaattacagg	9900
	catgcaccac	catgcctggc	taatttttgt	attttttagta	gagatggggg	tcatcatatg	9960
	tggccagggt	ggtctcaaac	tcttgacctc	aagtgatccg	cctgccttgg	cctcccaag	10020
50	tgttgggatt	acaggcatga	accaccacac	ctggccagca	gtcatctctt	taccaacttt	10080
	gctacttggc	ttttccttcc	agaggctgac	aagtctgcct	acctcatggg	gctgcaactca	10140
	gocgacctgc	tcaaggggct	gtgccaccct	cgggtgaaag	tgggcaatga	gtacgtcacc	10200
	aaggggcaga	atgtccagca	ggtgggtoca	tcttcagatg	ataatgggtg	ggcagggtag	10260
	ggagactggc	atgggtggat	gagagtttct	aagttcaact	ttcccaacaa	ccctgctcaa	10320
	tatgggtctc	tcttccacct	tgcaggtgat	atatgccact	ggggcactgg	ccaagggcag	10380
55	gtatgagagg	atgttcaact	ggatggtgac	gcgcatcaat	gccaccctgg	agaccaagca	10440
	gccacgccag	tacttcatag	gagtcttggg	catcgtggc	ttcgagatct	tcgatgtgag	10500
	ttgggacccc	tgggagtggg	agaacaatca	ctcactogct	cccacattca	acagctattt	10560
	gcttagagcc	agctgtggac	cagacatggg	aaggcagtgg	ggactgtgtg	gtgacagagg	10620
	cagtcatttt	ctctgtcttc	aggggaagcc	ctccttcaact	gccttgacat	ggaggggacc	10680
60	agccacgccc	tgttgggctc	agccacagtg	accgggcaca	gccccaatgg	ccactcacac	10740
	ccactttctg	actgctccca	cccctcatgc	cccctgcagt	tcaacagctt	tgagcagctc	10800
	tgcatcaact	tcaccaacga	gaagctgcag	cagttcttca	accaccacat	gtttgtgctg	10860
	gagcaggagg	agtacaagaa	ggagggcatc	gagtggacat	tcattgactt	tggcatggac	10920
	ctgcaggcct	gcattgacct	catcgagaag	gtgcctcttt	ggccttacca	cctgaattct	10980
65	ccctgcacac	ccaacaagaa	caccatagac	aaaatagcag	cccctctccc	ttctggggaa	11040
	tataaaaata	gaaggggctg	aaggatocga	ccccttgggt	ccagagccta	tgttgtgctg	11100
	agcaccacag	acaggggtgg	accagggaca	gctgatttcc	caggggcttg	aaagtggaca	11160

ES 2 340 459 B1

	catggaggat	gggcacctgc	atgatgacct	cccacacctg	catgtttatt	gggcctgggt	11220
	tatgcacca	aggatcagga	agtgtgaggg	tgggtaggg	gatcataaga	gtgcacctat	11280
	tttcaacct	agcatctcag	gcatctgggt	cgtggagtgg	tgtgtacagc	atcgatagaa	11340
5	tccatattcc	cagactttca	caaagtccct	ctgtcatcag	acaaaatnct	ccaccttgaa	11400
	ccggtccag	tcagtagata	actgtactca	gagctgagcc	tactacctta	acaccaaca	11460
	tggcacctcc	acgagcaagt	atattgacca	tagagcagaa	tccatgtcca	cctgtgtgaa	11520
	ggacactcag	tgatgctctc	tctgtcttcc	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	gatcctctca	atgagactgt	cgtgggcttg	tatcagaagt	cttccctcaa	11820
	gctgtctcag	accctgtttg	ccaactatgc	tggggctgat	gcgctgaagt	agggactgag	11880
	gctcccggta	cagaggagca	gggattctgc	caaggttctg	agccaggtca	attgctacac	11940
15	cccaccactt	caatgtcagg	ttgtacccca	aggtttacag	actcagtggg	atggaactgg	12000
	gtgaagaaac	tgaggcagcc	acattgaagg	ccctcaccca	ggggccaaat	gccagcaagg	12060
	atgtaaagag	gggctgtgat	tctttactca	cacctacct	cccacacctg	atgcttcttt	12120
	tgttgactct	ccttctctga	gctattgaga	agggcaagg	caaggccaag	aaagctcctt	12180
	cctttcagac	tgtgtcagct	ctgcacaggg	tgagtgggac	acagccccag	ccaacttggc	12240
20	tccccatctg	cccaacccca	ccagcccca	cccttccctg	ccttgttcat	cccctactcc	12300
	tcccgctccc	tgtctccttg	gtgcattogg	gaccattttc	actctgtctt	ctcttcccgt	12360
	catctcctgg	cctcttcact	tatttacttc	ccatctccct	tctctcctct	ttcccttctg	12420
	tctcccaccc	tctctcctta	tcctgtctc	ccccagggcc	ccttcatctc	tgtgacttct	12480
	cgaattctct	ccatctctct	tttcttctct	tcttctctct	tcttcttctt	gcactcttct	12540
25	ctggcatttt	ctttactttt	ctctattgca	tttttggcca	caggaaaatc	tgaacaagct	12600
	gatgaccaac	ttgcgctcca	ccatcccca	ctttgtaagt	tgtatcatcc	ctaatgagac	12660
	aaagtctcca	ggtgaggcca	caaactaggg	ccaaccact	gctgggcata	caccgccttg	12720
	ggaacaggac	ctcctaggac	atctccctac	ctaccaccac	agtggtttcc	aaaccacatt	12780
	cttctcctcc	catcccgat	gaggcctccc	aggtacctc	cctctcagcg	ctaccttgca	12840
30	tttgacagt	gtaatgaggg	tgatgtgtaa	ggcactctga	tggacattac	ctcatcagtg	12900
	gccctacaac	cccctggata	gctggttgtc	caagacagaa	tcttagttca	actttaaatt	12960
	tacctgcaga	accacttaag	ccccaatga	gacatattca	aattgttaat	ccatttttgg	13020
	ctaattagga	gacagaggct	cagggacctg	ggttcaagac	ctggctctgt	tcttgatcag	13080
	cttagtgaac	ttggcctgtc	ccgtaacccc	tctgggctta	atttactcat	ctagaacatt	13140
35	ggatatact	gttctggcta	ccacctatga	taataggtgt	gaatcatata	aaaaaggaat	13200
	gtgaaagcct	tttagttaa	aatgtggcta	gaagaaaatg	aaacaaatga	ttattactaa	13260
	ctgacttgct	aagattacaa	gctaactcagt	gacaaaacca	ggatcagaac	ccagaacttc	13320
	agtccagtgt	tctcacagac	tcctcctact	tccttcttgc	cacaggcgtg	atggacaacc	13380
	ccctggtcat	gcaccagctg	cgctgcaatg	gtgtgctgga	gggcatccgc	atctgoagga	13440
40	aaggcttccc	caaccgcac	ctctacgggg	acttccggca	gaggtgggta	tgaggggtgca	13500
	ccagagctca	tagaacaggg	ggagccaggc	tgccctgatg	ggaatgggat	ctgcaggtga	13560
	ccctggaatt	ctatggcgag	agcagatcac	tgcagagcat	gggtgactct	ggacacttcc	13620
	ctcctcaggt	atcgatcct	gaaccacagc	gccatccctg	agggacagtt	cattgatagc	13680
	aggaaggggg	cagagaagct	gctcagctcc	ctggacattg	atcacaacca	gtacaagttt	13740
45	ggccacacca	aggtgaggaa	aggagactaa	ttaattaaag	gaagacatct	cttttccatt	13800
	gactcctctg	atgcttttcc	tgttghtaat	atcttagcaa	aatctcttac	ctgtatgcta	13860
	cccctcccag	tggaaacatc	agcaccactc	ccctcatccc	agctccagct	gccattgacc	13920
	tcctccctgc	aatccttttc	taggtgttta	cccttcttaa	ggtaatcccc	accatctctt	13980
	tcctcgttac	ccctccctag	tcatggccaa	cacacacctt	gcctgcaggt	gttcttcaag	14040
50	gccgggctgc	tggggctgct	ggaggaaatg	agggacgaga	ggctgagccg	catcatcacg	14100
	cgatccagg	cccagctccg	aggtgtgctc	gccagaatgg	agtacaaaa	gctgctggaa	14160
	cgtaggtgag	agatctcaag	aggaggtttc	ccgcttctct	gaggcccagg	ctggttcagg	14220
	ggcagtgctc	ggaaaaaaag	ctcagcagat	cttcaaacac	agagacctgc	aggaggggct	14280
	catatgaaca	catgctcagc	acaggtcag	agcctcagc	aaggttggga	gggatgaagg	14340
	aaatgggata	ttcccaaggt	ttcaggacct	caggtaggaa	ggaggcagag	gctcagcact	14400
55	cctttcaatg	ggcccctgca	gagactccct	gctggtaatc	cagtggaaca	ttcgggcctt	14460
	catgggggtc	agaattggc	cctggatgaa	gctctacttc	aagatcaagc	cgctgctgaa	14520
	gagtgacaga	agagagaagg	agatggcctc	catgaaggag	gagttcacac	gcctcaaaga	14580
	ggcgctagag	aagtcgagag	ctcgcgcaa	ggagctggag	gagaagatgg	tgtccctgct	14640
	gcaggagaag	aatgacctgc	agctccaagt	gcagcggtg	aggtcctg	gctactgtt	14700
60	gctcttccac	cctgctctgc	cttcaacttc	cacaaccttg	cacctcctg	cacaggggct	14760
	cactgtcttg	ttccttcagt	cagaggactc	tgggatcaac	acttctaaag	acctccaaag	14820
	aggtccctca	ggaggaggaa	agggcagagg	gaaaagagct	gacttttaa	agcacaggct	14880
	ttctacttgg	gttcaacctc	gatacacagc	ttaattattt	tgtgaccttg	ggcagacctt	14940
	gcactactct	tgagctcaa	tttctctag	acagggata	aagctgtcca	ttcattaaag	15000
	ccatcataca	taagtgtctg	gcatcagcaa	atgcaattcc	caccttctga	tggaggagac	15060
65	cagaggaga	ggtccagatg	aagatttctg	gttcttctcc	tctctgctcc	cctcccagct	15120
	gttccaagct	tatactatcc	tgaactctt	cccctcccca	tacttctgaa	gctcttgcca	15180
	agtggggata	tcctagagtt	accctcctat	ttgagtgtg	tgctctcct	tcctctacc	15240

ES 2 340 459 B1

	tgcaagaatg	aggacettac	cccctgaaca	gcctcccctc	tgttcctcac	cttcaggaac	15300
	aagacaacct	ggcagatgct	gaggagcgct	gtgatcagct	gatcaaaaac	aagattcagc	15360
	tggaggctaa	ggtgaaggag	atgaacgaga	ggctggagga	tgaggaggag	atgaatgctg	15420
5	agctcactgc	caagaagcgc	aagctggaag	atgagtgtct	agagctcaaa	agggacatcg	15480
	atgatctgga	gctgacactg	gccaaagtgg	agaaggagaa	acacgcaaca	gagaacaagg	15540
	taagggcagc	tccctttggc	tccagcccgg	gtctcatcag	gactctcaga	ccatactgac	15600
	cttgaccag	gctagccact	cgcatccaga	gagcagcatg	gaccttgatc	atggagctcc	15660
	ccacagatgg	caccaagctg	gtgacctttg	accctaaagg	agatgggatt	cttggctggc	15720
10	aggtgaaaaa	cctgacagag	gagatggctg	ggctggatga	gatcattgcc	aagctgacca	15780
	aggagaagaa	agctctgcaa	gaggcccacc	aacaggctct	ggatgacctt	caggccgagg	15840
	aggacaaggt	caacaccctg	actaaggcca	aagtcaagct	ggagcagcaa	gtggatgatg	15900
	tgagtagatt	gagagttgtg	gggcctagat	atgccatgtc	tatctgtgcc	cagagctctg	15960
	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtttgtg	tttatgttta	16020
	gaggggggta	gggttagagg	atgttaactt	ttctgataac	tttctagaaa	ggagctgggg	16080
15	aatgaaaagt	cagaggtggt	gatcaattct	gaattatgta	tctaattcta	ctggtatgat	16140
	caataataga	gatgagtttt	cttattttaat	ttaagtgcaa	tcccatatat	ctctgccttt	16200
	gacacaagat	ttagaggggtc	atctcataag	aacatgataa	atctctttgg	aaattttgtg	16260
	aggctcccca	agtagaattt	ttgaaattcc	aatattttaag	gcagaatctg	atcattgttc	16320
	cctctgatgc	acatatgtct	gttgactcac	ttatcactct	gtattttaat	tatttaagct	16380
20	tctatctcag	ccataagact	acaagcttcc	tttagatagg	aacttagatc	tattcaattt	16440
	ggggactgca	ctgcttagca	agagcctgat	gcccagtagg	tgtttatagg	atgtgaaag	16500
	aatgaatacg	cgcgccagc	cggtggctca	cacctgtaat	cccagcactt	tgggaggcca	16560
	aggcgggtgg	atcacgaggt	caagagatcg	agaccatcct	ggccaatatg	gtgaaacccc	16620
	atctctacta	aaaaatacaaa	aattagctgg	atgtggtggc	gtgcgccctgt	agtcccagct	16680
25	actcaggagg	ctgaggcaga	ataatccctt	gaaccaggga	ggcggagggt	gcagtgagcc	16740
	gagatcgcg	cactgcactc	cagcctggcg	acagagtgag	actccataaa	aaaaaaaaaa	16800
	aaaaaaaaagga	ggaagggaag	agaagagag	gaaagaaaag	gagagaaaag	aagaaaagaa	16860
	gaaagggaaa	gaaagaaaga	atacggcttt	gggtttcat	cccacagtca	tttattcctt	16920
	tatctataaa	atattgattc	agcatcccct	atatctaggc	aatctcacag	tcccctaata	16980
30	acatttggcc	cactctgggg	aaggtttccc	aagtcctgaa	cacaaagatt	taccaagtcc	17040
	tgaggtaaat	gaacaacaaa	atcaccaagt	caggatgctt	tgccctactg	ggcctggctc	17100
	cttctctcta	ccagctggaa	ggatccctgg	agcaagagaa	gaaggtgctc	atggaccctg	17160
	agcgactgaa	gcggaagctg	gagggcgacc	tgaagctgac	ccaggagagc	atcattgacc	17220
	tggagaatga	caagcagcag	ctggatgagc	ggctgaaaaa	gtactgtgtc	ccctccctgc	17280
35	tgcccttct	cctccccagc	ccataacagt	acaagcagac	ccaagacagc	catcctctga	17340
	ggcaacaacc	tcacgcagcc	tccacaagtg	gagggcgaaa	ccatgggaaa	aggcctcca	17400
	ggcaagggct	ttcctcccct	agtcccagat	atcaggggta	gttagatggt	cctcccctggc	17460
	aaaaagtcca	ttgtatccca	tgagaccttt	cttcttggtta	ggcactcagt	gggaatgaaa	17520
	ataacagcct	ttccccttca	tacacatctc	tctttggaga	ccagttcctt	gacatggagg	17580
40	aaggctccac	atgagagcct	cttaggaaaag	tccccttgtg	gcttttcaca	gagagcccac	17640
	agggcaccaa	gaaatgccct	cacattaaag	aagtcagggg	atcagggcca	tttctttggt	17700
	ttgcttaact	tgtggttcca	attcttagtg	taagttcttc	caaaatgtat	agactttcca	17760
	gacttggtaa	acagtgagct	tgcagaacat	atthttgataa	ttgaaggctt	tatgggtggtt	17820
	caggctcag	actttgaaag	gctttgagaa	tcacataaat	ctacatcctc	atcaagtttg	17880
45	tgtttgcaca	ggaatcttca	taccttccca	ggcacagaat	gtggttgaata	aatgaataaa	17940
	tacacgatcc	tatttgattc	tcaaaaacacc	ttttaaggat	ggtatcttta	atthcacttt	18000
	accaagagg	aaaataagtt	tcagaaaggt	tagctgagtt	acccaaagca	atagtgacaa	18060
	aattaaagac	catcagagct	aaaaaggacc	tttgaacaaa	tctagtccga	ccccctcatt	18120
	ttacattatg	agaaaacaag	gaccaaaagat	gggaatgtcc	tgtagagccc	aggccccatc	18180
50	accctgtcta	cagcactcct	cccattacat	tcttgttggg	tttcaatcta	ccgcaggtgt	18240
	tacacttcca	gggatoctac	atcaccccga	gaaagctggtt	ttctaatagaa	atcctactct	18300
	ttacctgtat	cattaccatt	ttcaaccact	gtgggaccct	cctgaggccc	cacgagtctc	18360
	ccttacctca	ccatcccctc	ttcccacag	aaaagacttt	gagctgaatg	ctctcaacgc	18420
	aaggattgag	gatgaacag	ccctcggcag	ccagctgcag	aagaagctca	aggagcttca	18480
55	ggtgagggtc	ggacaccac	gcgggatgct	gatccctgg	gctggttctg	tttcccctgc	18540
	cccctcctct	aggtgtcct	gttcacagca	ttacaggaac	tgattatgtg	tccatggagg	18600
	caggcacgca	gctatcacag	tgtgcccatg	gatacatcca	aaaggggtca	ggtgatccac	18660
	agagaccctg	aaaaggtgca	caggcctgga	gggcagaatt	cctggcttcc	tgtctcagct	18720
	ctgccttagt	tgggtgacct	ctgggagccc	actccagatc	tctgggtctc	catgccctcc	18780
	cctgttacat	ggaggttttt	aagagtcctt	cgactctgat	ggcatgactt	tcctccttac	18840
60	tctagagcag	aagctgtggt	aggtcttttag	ttgtctggtc	agacaaatac	ggctctctca	18900
	tttcaactt	ttgttatttt	ttatgacta	aactgcttaa	aatatcccga	gaacacaggt	18960
	ctctttgtcc	atctttaaga	gcaagtttca	accactttcc	ttccaataaa	gagccatgta	19020
	gactgtcagg	ccctcgccta	aaggaaggct	cttcaaacta	tcttcccga	atcctttaat	19080
	tcccacctct	ccagtggaag	agctaaactg	acttgctggt	ccagagaagc	cgagagcctt	19140
65	ttagagccgg	ggggattcca	gtggaggggt	ccaggcgggtg	ggtctgagcc	ctttgtgtct	19200
	gaccaggcac	gcatoagga	gctggaggag	gagctggagt	ccgagcgcac	cgccagggct	19260
	aaggtggaga	agctgcgctc	agacctgtct	cgggagctgg	aggagatcag	cgagcggctg	19320

ES 2 340 459 B1

	gaagaggccg	gcggggcccac	gtccgtgcag	atcgagatga	acaagaagcg	cgaggccgag	19380
	ttocagaaga	tgcggcggya	cctggaggag	gccacgctgc	agcacgaggc	cactgcccgc	19440
	gccctgcgca	agaagcacgc	cgacagcgtg	gccgagctgg	gcgagcagat	cgacaacctg	19500
5	cagcgggtga	agcagaagct	ggagaaggag	aagagcgagt	tcaagctgga	gctggatgac	19560
	gtcacctcca	acatggagca	gatcatcaag	gccaaaggcag	gctctgctcg	gcctcccctc	19620
	ctccaacttc	ctcctcccac	ctcccccttc	tgtccatgta	gtgtctcttc	cttcatggtt	19680
	cattttccca	cttccccttc	tctgcctggt	tctcagatcc	cctccttctt	ttcacacctt	19740
	ccctcttctt	ttctccttca	gttgcacctc	ttacaccctc	tcatcccccc	cgcccccaac	19800
10	atccatcata	taactctcct	tcccttctca	ggctaacctg	gagaagatgt	gccggacctt	19860
	ggaagaccag	atgaatgagc	accggagcaa	ggcggaggag	accagcgtt	ctgtcaacga	19920
	cctcaccagc	cagcgggcca	agttgcaaac	cgagaatggt	gagcctagag	caggggctcc	19980
	atggttccca	ccacagtctc	cccaacctcc	tgagccactc	cagcctcggg	cacaagccaa	20040
	tacacgcaca	cacagacaca	gagtctctcc	agaaaatggg	gcctgagggc	tagaggagga	20100
	ggtggggata	gagaggagtg	ctgatctaga	atggtgcttc	cccaggtgag	ctgtcccggc	20160
15	agctggatga	gaaggaggca	ctgatctccc	agctgacctg	aggcaagctc	acctacacct	20220
	agcagctgga	ggacctcaag	aggcagctgg	aggaggaggt	taaggttaagg	ctgtcactcg	20280
	ggccacctgg	cccaagcaag	gagcacactg	actagccttg	catcaaatca	cttccccttc	20340
	cagcaataag	gctggctgtg	gaccaacagt	tctccaagaa	ttctaaaaag	aatcacagc	20400
	ccaaaccctg	ccacatgcc	tctactcccc	aggctgaggc	cctctgcttc	tgctgcatcc	20460
20	ctggacggga	ggcagggtgt	gagaaggagg	agagaaaatg	aactagggag	gcacgagatg	20520
	gcccctggccg	ggcacggcta	ggggatgtag	ggactgcaca	aatgggtcct	ggattgctag	20580
	gcctaccctg	aaaactggag	aaagaaaatc	aactggagcc	tattcctagc	actttgctgg	20640
	actcatgaaa	aaggagaaa	aacatgattt	ttaaaaaact	ccagggttca	tactaacctg	20700
	cctcttatag	ctcagtgatc	ttaggttagg	gaagtcccct	aacctttctg	agcctgtttc	20760
25	cctctcccca	gccaggtaaa	atggcgtgta	tgatgaccat	gtctggtgtg	gggaggagct	20820
	cagggccaat	ggccatgaag	cttttcttaa	atagttcact	gctgtattgg	cattctttgt	20880
	tatcagcaaa	cagtaaacca	tgacaggtcc	actgggggtt	tggacataga	tgaggccaag	20940
	ggatgatggt	gagattgggg	tgaggagaag	ggcaagggtg	gggttgcttt	atggagaaa	21000
	ctgaaccac	ctcctggtgc	ccaccctcc	ccaggcgaag	aacgccctgg	cccacgcact	21060
30	gcagtcggcc	cgcatgact	gcgacctgct	gcgggagcag	tacgaggagg	agacggaggc	21120
	caaggccgag	ctgcagcgcg	tcccttccaa	ggccaactcg	gaggtggccc	agtggaggac	21180
	caagtatgag	acggacgcca	ttcagcggac	tgaggagctc	gaggaggcca	agtgagttct	21240
	gagcagcctg	acttctggct	gagggcccct	tgcaggcagg	actcagccca	gccctagcct	21300
	cagcagatcc	cacacaggcg	atgcttagct	agtgttgac	aacacaggag	gactctgccc	21360
35	cggccccacc	tccttctcct	ctcaggaag	ctttttgctc	gaattatggt	tctgatccga	21420
	atataagacg	aacaaaaggt	ttgtctgagg	gcagagtgct	tccgtctggg	gcagggcact	21480
	gtggcaggg	aaggcagtg	ggagggctgc	agaagcccat	acctcctcaa	tgtccatagc	21540
	gcagaggttc	ggccagggtc	agaggggtcc	tgggtctcca	cgccctgctg	ggatcctctg	21600
	ctgactgttc	tcggcccctg	ggacctgtcc	tcaggcttct	ccagctacac	ttctgaggtt	21660
40	tcaaggattg	tctttgagaa	ggttcatggt	gtttacctct	tgtccccatc	cacaccctcc	21720
	atcctcccca	ccctctgcca	cctcccctgg	gcaggaagaa	gctggcccag	cggctgcagg	21780
	aagctgagga	ggccgtggag	gctgttaatg	ccaagtgtc	ctcgctggag	aagaccaagc	21840
	accggctaca	gaatgagatc	gaggacttga	tggtggacgt	agagcgtcc	aatgctgctg	21900
	ctgcagccct	ggacaagaag	cagaggaact	tcgacaaggt	gggcccctgg	tggggggccc	21960
45	agccagcatg	cagggcaagg	gggcatgagg	ggttcagtga	gaggccaagag	ccatcctcct	22020
	tgagggtggg	ggaggagggc	tgagcccagg	caggtcctga	gacagaccct	ggacatgggg	22080
	ctgaggctgg	ggggctgaag	agtgagcctt	gtccccgggc	agatcctggc	cgagtggag	22140
	cagaagtatg	aggagtgcga	gtcggagctg	gagtcctcgc	agaaggaggc	tcgctcccct	22200
	agcacagagc	tcttcaaact	caagaacgcc	tatgaggagt	ccctggaaca	tctggagacc	22260
50	ttcaagcggg	agaacaaaaa	cctgcagggt	gtgctggggg	ccaagaggc	tggggagggg	22320
	ctgcactggc	agtgttccca	tatggtgcca	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
	ggaggaggcc	gaggtgtgtg	tgtgtgcagg	gcacgggggtg	cagggagctg	agctccagga	22620
55	ttttgcatcc	ctgttctcat	ccccgcctt	gtcgttttgt	tactgtccc	atccccagag	22680
	cctaggacag	agcctggcac	atagtgagca	ttcagtgaa	atgttgagg	tgaatgaatg	22740
	accagtcact	gaactctctt	cacataggca	ttttaccat	tgcactcttag	ctgagcttcc	22800
	catttccaca	tacctcccgg	ttcccacctc	tgccctccctc	tgttttcttt	tatactctat	22860
	acctgattgc	ctctgtttcc	ttggcaacac	ttttttcttc	attttctctc	ttatcttcat	22920
60	agctggctct	ccctgtgag	ggcctgaatc	actttctctt	aggcttattt	ttattttctc	22980
	ttagattctc	ttttcctcca	ccttctgctt	ctttgaacca	cttacaccac	tcttggaagtc	23040
	acttctgtatc	catgattagt	gagcaggccc	ccaccctgcc	ctgtgccctg	actgtctgcc	23100
	tgcaccccct	cccccaacc	cttcccaggc	ctccctggag	cacgaggagg	gcaagatcct	23160
	ccgggcccag	ctggagttca	accagatcaa	ggcagagatc	gagcggaaagc	tggcagagaa	23220
65	gtcagaggag	atggaacagg	ccaagcga	ccacctgcgg	gtggtggact	cgctgcagac	23280
	ctccctggac	gcagagacac	cgagccgcaa	cgagccctg	agggtaaga	agaagatgga	23340
	aggagacctc	aatgagatgg	agatccagct	cagccacgcc	aaccgcatgg	ccgccgaggc	23400

ES 2 340 459 B1

	ccagaagcaa	gtcaagagcc	tccagagctt	gttgaaggtg	ctcaccacaga	ggggactggc	23460
	ctcccactgtg	cctggcgaag	cagttagtgc	ttgatacagg	caccagattc	ctcctgcccc	23520
	taggttactg	cagggacctc	tgacagggtc	ctttagttaa	gggaaccgag	gctgtgtccc	23580
5	tgctcatgcc	cactctcctg	atcctcagga	caccagatt	cagctggacg	atgcagtccg	23640
	tgccaacgac	gacctgaagg	agaacatcgc	catcgtggag	cggcgcaaca	acctgctgca	23700
	ggctgagctg	gaggagtgtc	gtgccgtggt	ggagcagaca	gagcgggtcc	ggaagctggc	23760
	ggagcaggag	ctgattgaga	ctagtgagcg	ggtgcagctg	ctgcattccc	aggtgagcag	23820
	ctccccctgct	cattcctgaa	gggagcacag	gctggggctc	agcaagcaag	gcttgagagc	23880
	tatgcataga	tgctcaatgc	ttttcctgct	ctgccccaac	ctccccaac	ccagaacacc	23940
10	agcctcatca	tccagaagaa	gaagatggat	gctgacctgt	cccagctcca	gactgaagtg	24000
	gaggaggcag	tgcaaggagt	caggaatgct	gaggagaagg	ccaagaaggc	catcacggat	24060
	gtaagtcccc	cactccaccg	acccgatcca	gaccagtgtc	tctccgtggg	ctgggcagca	24120
	agtgtgtgag	gacttgacca	gacctgtgc	cacctctctc	ctgcacacag	gccgccatga	24180
	tggcagagga	gctgaagaag	gagcaggaca	ccagcgccca	cctggagcgc	atgaagaaga	24240
15	acatggaaca	gacattaag	agctcgcagc	accggctgga	cgaagccgag	cagatcgccc	24300
	tcaagggcgg	caagaagcag	ctgcagaagc	tggaaagcgc	ggtgcgggag	ctggagaatg	24360
	agctggaggc	cgagcagaag	cgcaacgcag	agtcggtgaa	gggcatgagg	aagagcgagc	24420
	ggcgcatcaa	ggagctcacc	taccaggtgc	gacgggcggt	gactccaggc	agagccctgg	24480
	caccatagcc	acagtgacaa	ccagctgagg	agaatgaaga	gtttgctctt	agcctcttcc	24540
20	agggcagagga	tgggaatgca	gccccgctt	aaactttgcc	tagccctgcc	ccacttgaa	24600
	tgtcccctag	ctcagaggtc	agtctctgag	ctcctggcc	tgggagctcc	atctcaaac	24660
	ccactcttag	cccatgcgcc	aggggacaca	cacagaattc	cagacaaagc	tcaccagta	24720
	cagctcacca	gaaagcaaat	atgtagccag	ggtcaccccc	aaaagacacc	aaaaacacac	24780
	ccatcccatt	caaacaagca	taaaaacttt	tccattgccc	agggcagtgt	ggactctagc	24840
25	tttctgaggt	gttttctaga	atcagactct	gaattagaat	ttgtttcttt	tccaatccag	24900
	gatgtcacta	tctctctaag	cacactttgt	ccttaactta	gattaagtca	gtgttttctt	24960
	ggcctgcatt	gcagcccag	aaattccatc	actcatag	ccccaaagtc	actcccagca	25020
	tgtgccgagg	tccagagcag	gggacttcat	cccgcattgg	gtccccggac	cctgaaaaac	25080
	ctgctccctg	gagcactgca	cacacacaat	tttgtgcata	atttcaggag	tcccactagt	25140
30	tctttggact	ctttcctggt	acagatcatt	taaaatattt	acacatattt	ggtaagaaat	25200
	tataagggag	attcaagtgt	ttagtgagga	tcagaaagta	gaattgggtc	aggatatcag	25260
	atgaagcagc	gcagggcggg	gggatgcta	cttctatga	ctgtgccatc	ttcaccctc	25320
	gccccctg	tgccccccag	acggagaggg	acaggaaaaa	cctgctgcg	ctgcaggacc	25380
	tggtagacaa	gctgcagcta	aagggtcaagg	cctacaagcg	ccaggccgag	gaggcgggtg	25440
35	gtgaccctgc	tggggactag	gcccagggga	ggcataggag	agctcgtccc	ccaagccagg	25500
	agtctgagaa	cccaggcccc	ctctcacctc	atgctcccac	ctccccgag	aggagcaagc	25560
	caacaaccaac	ctgtccaagt	tccgcaaggt	gcagcacgag	ctggatgagg	cagaggagcg	25620
	ggcggacatc	gccgagtccc	aggtcaacaa	gctgcgggcc	aagagccgtg	acattggcac	25680
	gaaggtgggt	ccctcttttg	gcttttgcta	gtcaccocca	cagcaggcat	accagccagc	25740
40	agcaccctca	aaaccgggat	gcttctcttt	cattttattcc	acacacttga	gccacatggc	25800
	cccagaggcc	aaggtaatgc	agttctctgt	gatttcaagg	attcttccag	ctctaacttt	25860
	tttttttttt	ttttttgaga	cggtgtctca	ctctgccgcc	caggctggag	tgcagtggca	25920
	caatctcagc	tactgcaac	ctctgcctcc	tgggttctcc	tgcctcagcc	tcccagtag	25980
	ctgggattat	aggcatgtgc	taccatgtct	agctaaat	tatattttag	tagagatgag	26040
45	gtttcaccat	gttggccagg	ctggtcttga	actcctgacc	ttgtgatcca	ctgcctcag	26100
	ctccccaaag	tacgggatta	caggcgtgga	gcaccactcc	cagctcagct	ctaagtttca	26160
	gtggttctgg	gaatttcagc	gttagggagg	ggtgccacct	agaagaccct	aatttatata	26220
	caaccagtat	atcccagttt	ccccccaact	gctagtttcc	agttcccttc	cacctaat	26280
	tgtcctgcaa	tattgtaac	taaaacctaa	aatggacatc	ccagagaacc	cgggcctggc	26340
50	tttgttctcg	cccaggcaac	ttcctctgta	ctaaccocag	aacctacce	tccagaactt	26400
	gccccctg	catcgatccc	tggaacacaa	tgtgctgctg	ccacagggcg	ttccacctgc	26460
	ccacaaagca	ggccccccac	catcagacc	ctctcacctt	tgttcccatg	ccctgtccct	26520
	gcccataacc	atctctccaa	ggactgattg	gactttgttt	cctttcaaaa	gggcttgaat	26580
	gaggagttag	tttgccacat	cttgatctgc	tcagccctgg	aggtgccagc	aaagccccat	26640
55	gctggagcct	gtgtaacagc	tccttgggag	gaagcagaat	aaagcaattt	tccttgaagc	26700
	cgagatcctg	actccagact	cttcttcact	gcccattgga	cccggggatg	gggtctggca	26760
	taggggaggt	ggaaatgcac	gggagtgggg	gcaaattcaa	aggcctggcc	taggagccct	26820
	tcgtggagca	gcaactgaaa	cccccttcc	ttccccaaa	ccagccaaat	gcagttagag	26880
	cgacacctct	cctcccagcc	ttctccctgg	tccagccagg	attdaaagga	gatttaggga	26940
	gaccctaaa	gttcaactag	agcaccctga	gcccattctac	tgtggacctg	caccctcagc	27000
60	tccgtcaacc	ctgccccacc	caccaccatg	gatactgccc	agggctgggc	aaagggcagc	27060
	ggttccgggt	gtgggtgctg	gccagtgccc	tttctgagcc	cggagaagtt	gtgaaccact	27120
	gggccagggt	aggcaatggc	tgccaaagt	ccagtcccag	gcgagtctct	gagagtacac	27180
	aaggattcac	agctgtagcc	tgcatcccct	tttaaataga	gccaccacc	tctccagcca	27240
	ccgccagaag	ccagcatacc	ccctgcccac	cacaggtgga	gaaacacacc	ctcagccac	27300
65	ctgcctgct	cctcagctcc	tcctgggtgc	gagccccctt	ggcccagggt	gctcccttct	27360
	tcccactcat	ttctcccct	tgtaattccc	attaccaagc	cctttgtcct	ctgggcttgt	27420
	gggaagatgg	ggttctcctg	gcccatttat	ggcaagccat	tcttgagggy	aggcagacag	27480

ES 2 340 459 B1

```

5   atgaggggct ggggaaggtt atgtgtgaac aggactctgg ggagagggag ggaagggatg 27540
    gctcccgaga gggccaggag gtggaggaaa gagtaagtct cctccaacta aacaagttca 27600
    gcccctttgg agttcctgcc acagctggat tgcttaggca ggcctggtac tg-gggccac 27660
10  agaggtcagg ggcttgaaag gcaactgggc tgtcggacc cactgggaac ctgggaagga 27720
    gtggttcaac cctggactgg atctcccca accaccaac catacccact cggagcccac 27780
    tctgtctctc taccagctc tgagctctga ggactgcggc agcagagcca agggcctaag 27840
    ccggagaagg agaaacta ctggacaata gcaggtgaca gcagaggaga aaaagggggt 27900
    agggagggga caaggaaaga acctgagggg gtggcagtgg acaaagagat tgagcaacca 27960
15  caggacaagg taaccagagg aaacagagac aaggaaaaaa gatgcaggaa atgaggaggc 28020
    cccagaaaaga tccgcagcgc cgccacctt ctcctcatag ccacctccat tctcctccc 28080
    taggccaacc cagacagagc tctcaaaac agggatgctt ccttttcatt tatccagctc 28140
    aattgaacca cacagcccca gaggccaagg taattcagta tctctgtgat ttctaggatt 28200
    ctttcagtcc tttttgttt tgttttgtt tttgtgacgg agtctcactc tgctgccag 28260
20  gctggagtgc agtggcaca cctcggcttg ggccgagatc ctagggcca ttctctggc 28320
    taggaacaga cttggacagc aatgcaagag ataactagaa acaaaggaga gaacccttga 28380
    aaagggagct atgcagagag acccagggca cctaagcaac cagagcaaga gagaccgcaa 28440
    gagatacaga tc 28452

```

20

<210> 2

<211> 21

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<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

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<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

gacttcaca tcagcctgac acc

23

50

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<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 2 340 459 B1

- <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 5 <223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 4 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 4
- <400> 5
- 10 ggggtggacat ggatggagca 20
- <210> 6
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 15
- 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
- <210> 7
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30
- 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
- <400> 7
- 40 ccagttccct tcaggaagac ctt 23
- <210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 45
- 50 <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
- <400> 8
- 55 gagaagcccc acgagagcat 20
- <210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 60
- 65 <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

ES 2 340 459 B1

<400> 9

tggaggctgg gatcaggag 20

5 <210> 10
<211> 20
<212> ADN
10 <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

15 <400> 10

ctgattgag gcttgctgt 20

20 <210> 11
<211> 20
<212> ADN
25 <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

30 <400> 11

aagaaggagg cagtgagag 20

35 <210> 12
<211> 22
<212> ADN
40 <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

45 <400> 12

ctctcacctg cctccttctt gg 22

50 <210> 13
<211> 22
<212> ADN
55 <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

60 <400> 13

gctgagccta gcagattcat gg 22

65 <210> 14
<211> 22
<212> ADN

ES 2 340 459 B1

<400> 18
tttctggggt cgc caatat gg 22

5 <210> 19
<211> 22
<212> ADN
10 <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: 18

15 <400> 19
agctgcccc aagaatcctgc ct 22

20 <210> 20
<211> 23
<212> ADN
25 <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

30 <400> 20
ctcttacc aa ctttgctgtt gcc 23

35 <210> 21
<211> 22
<212> ADN
40 <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: 20

45 <400> 21
cctgcccacc cattatcgc tg 22

50 <210> 22
<211> 25
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<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

60 <400> 22
cttccaaca accctgctca atatg 25

65 <210> 23
<211> 23
<212> ADN

ES 2 340 459 B1

<400> 27
ctcagaacct tggcagaatc 20

5 <210> 28
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

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

15 <400> 28
tcttactcac accctacctc 20

20 <210> 29
<211> 19
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<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

30 <400> 29
gggctgggtg gggttgggc 19

35 <210> 30
<211> 22
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 18 del gen HYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 31

45 <400> 30
cttctgcat ctcttctg ca 22

50 <210> 31
<211> 22
<212> ADN
55 <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

60 <400> 31
agcagtgggt tggccctagt tt 22

65 <210> 32
<211> 24
<212> ADN

ES 2 340 459 B1

<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

5

<400> 32

10 ccagttctca cagactcctc ctac 24

<210> 33

<211> 23

<212> ADN

15 <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: 32

20

<400> 33

25 ccctgttcta tgagcttctg gtg 23

<210> 34

<211> 23

<212> ADN

30 <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

35

<400> 34

40 ggatctgcag gtagccctag aat 23

<210> 35

<211> 22

<212> ADN

45 <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

50

<400> 35

55 acaacaggaa aagcatcaga gg 22

<210> 36

<211> 21

<212> ADN

60 <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

65

ES 2 340 459 B1

- <400> 36
- tcctagtca tggccaacac a 21
- 5 <210> 37
<211> 21
<212> ADN
- 10 <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
- 15 <400> 37
- agcgggaaac ctctcttga g 21
- 20 <210> 38
<211> 23
<212> ADN
- 25 <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: 39
- 30 <400> 38
- tcaggacctc aggtaggaag gag 23
- 35 <210> 39
<211> 22
<212> ADN
- 40 <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
- 45 <400> 39
- ctctttgagg cgtgtgaact cc 22
- 50 <210> 40
<211> 22
<212> ADN
- 55 <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
- 60 <400> 40
- gctgaagagt gcagaaagag ag 22
- 65 <210> 41
<211> 20
<212> ADN

ES 2 340 459 B1

<400> 45
tctgagagtc ctgatgagac cc 22

5 <210> 46
<211> 23
<212> ADN
10 <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

15 <400> 46
ccctaaagga gatgggattc ttg 23

20 <210> 47
<211> 22
<212> ADN
25 <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: 46

30 <400> 47
tctaggcccc acaactctca at 22

35 <210> 48
<211> 20
<212> ADN
40 <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

45 <400> 48
agtcaggatg cttgctca 20

50 <210> 49
<211> 20
<212> ADN
55 <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

60 <400> 49
ttgtactgtt atgggctggg 20

65 <210> 50
<211> 20
<212> ADN

ES 2 340 459 B1

- <400> 54
- agttccagaa gatgcggcg 19
- 5 <210> 55
<211> 21
<212> ADN
- 10 <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
- 15 <400> 55
- tgggaggagg aagttggagg a 21
- 20 <210> 56
<211> 20
<212> ADN
- 25 <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: 57
- 30 <400> 56
- gcaccttta caccctca 20
- 35 <210> 57
<211> 20
<212> ADN
- 40 <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
- 45 <400> 57
- tgtgcgtgta ttggcttg 20
- 50 <210> 58
<211> 20
<212> ADN
- 55 <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
- 60 <400> 58
- agtggggat agagaggagt 20
- 65 <210> 59
<211> 21
<212> ADN

ES 2 340 459 B1

<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

5

<400> 59

10 gatgcaaggc tagtcagtgt g 21

<210> 60

<211> 20

<212> ADN

15 <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

20

<400> 60

25 atggagaaag ctgaaccac 20

<210> 61

<211> 19

<212> ADN

30 <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: 60

35

<400> 61

40 ctgagtcttg cctgcaaag 19

<210> 62

<211> 20

<212> ADN

45 <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

50

<400> 62

55 tgtttctctt tgtcccatc 20

<210> 63

<211> 20

<212> ADN

60 <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

65

ES 2 340 459 B1

	<400> 63	
	ctctcactga acccctcatg	20
5	<210> 64	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<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	
15	<400> 64	
	ctgagacaga ccctggacat	20
20	<210> 65	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<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	
30	<400> 65	
	gcacatgatg ggaacactgc	20
35	<210> 66	
	<211> 21	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 33 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 67	
45	<400> 66	
	tggacctcag cagcctcaa a	21
50	<210> 67	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<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	
60	<400> 67	
	accaaaagcc tggagctcag	20
65	<210> 68	
	<211> 22	
	<212> ADN	

ES 2 340 459 B1

<213> Secuencia artificial

<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

5

<400> 68

10 atccatgatt agtgagcagg cc 22

<210> 69

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<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

20

<400> 69

25 tcttcttctt cacctcagg g 21

<210> 70

<211> 21

<212> ADN

30 <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: 71

35

<400> 70

40 ccctgagggt gaagaagaag a 21

<210> 71

<211> 22

<212> ADN

45 <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

50

<400> 71

55 tcaagacact actgcttacg cc 22

<210> 72

<211> 20

<212> ADN

60 <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

65

ES 2 340 459 B1

	<400> 72		
	tagtgaaggg aaccgaggct		20
5	<210> 73		
	<211> 20		
	<212> ADN		
10	<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		
15	<400> 73		
	gctccctca ggaatgagca		20
20	<210> 74		
	<211> 20		
	<212> ADN		
25	<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		
30	<400> 74		
	caaggcttga gagctatgca		20
35	<210> 75		
	<211> 21		
	<212> ADN		
40	<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: 74		
45	<400> 75		
	ctggtcaagt cctcacacac t		21
50	<210> 76		
	<211> 19		
	<212> ADN		
55	<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		
60	<400> 76		
	tgggcagcaa gtgtgtgag		19
65	<210> 77		
	<211> 19		
	<212> ADN		

ES 2 340 459 B1

	<400> 81	
	ggttctcaga ctctggctt	20
5	<210> 82	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<223> Oligonucleótido iniciador directo utilizado para la amplificación de un fragmento del exón 3 9 del gen MYH7 en combinación con la SEQ. ID. NO: 83	
15	<400> 82	
	aagccaggag tctgagaacc c	21
20	<210> 83	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<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	
30	<400> 83	
	tgtctgggta tgctgtgt	20
35	<210> 84	
	<211> 21	
	<212> ADN	
40	<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: 85	
45	<400> 84	
	accatcagac cccttcacc t	21
50	<210> 85	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<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	
60	<400> 85	
	tattctgctt cctccaagg	20
65		



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 340 459

② Nº de solicitud: 200803452

③ Fecha de presentación de la solicitud: 01.12.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2002127548 A1 (SEIDMAN CHRISTINE et al.) 12.09.2002	1-31
X	MÖRNER STELLAN et al. "Identification of the genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden". Journal of molecular and cellular cardiology. Jul. 2003. Vol. 35, Nº. 7, páginas 841-849. ISSN 0022-2828 (Print).	1-31
X	ENJUTO M. et al. "Malignant hypertrophic cardiomyopathy caused by the Arg723Gly mutation in beta-myosin heavy chain gene". Journal of molecular and cellular cardiology. Dic. 2000. Vol. 32, Nº. 12, páginas 2307-2313. ISSN 0022-2828 (Print).	1-31
X	MOOLMAN-SMOOK JOHANNA C. et al. "The origins of hypertrophic cardiomyopathy-causing mutations in two South African subpopulations: A unique profile of both independent and founder events". American Journal of Human Genetics. Nov. 1999. Vol. 65, Nº. 5, páginas 1308-1320. ISSN 0002-9297.	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

03.04.2010

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/4

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)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, NPL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.04.2010

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	US 2002127548 A1	12-09-2002
D02	Mörner Stellan et al. "Identification of the genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden". Journal of molecular and cellular cardiology. Jul. 2003. Vol. 35, N°. 7, páginas 841 - 849. ISSN 0022-2828	2003
D03	Enjuto M. et al. "Malignant hypertrophic cardiomyopathy caused by the Arg723Gly mutation in beta-myosin heavy chain gene". Journal of molecular and cellular cardiology. Dic. 2000. Vol. 32, N°. 12, páginas 2307 - 2313. ISSN 0022-2828 (Print).	2000
D04	Moolman-Smook Johanna C. et al. "The origins of hypertrophic cardiomyopathy-causing mutations in two South African subpopulations: A unique profile of both independent and founder events". American Journal of Human Genetics. Nov. 1999. Vol. 65, N°. 5, páginas 1308-1320. ISSN 0002-9297.	1999

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 Ala797Pro.

El gen MYH7 comprende la secuencia SEQ.ID N° 1. La mutación Ala797Pro conlleva el cambio de nucleótido 14131 G>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 que contenga los reactivos específicos para detectar dicha mutación. Entre esos reactivos se encuentran oligonucleótidos iniciadores SEQ.ID.NO 36, SEQ.ID.NO. 37 y sus mezclas (reivindicación 26).

Las reivindicaciones 27-31 caracterizan un biochip que comprende un reactivo específico, soportado sobre un soporte sólido, 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 Ala797Pro. Este biochip comprende los oligonucleótidos iniciadores SEQ.ID.NO 20, SEQ.ID.NO. 21 y sus mezclas. Además comprende los oligonucleótidos identificados como SEQ.ID. NO: 1-35, SEQ.ID.NO. 38-85.

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.

Los documentos D01-D04 se consideran de particular relevancia dentro del estado de la técnica a la hora de valorar la actividad inventiva de la presente solicitud. En concreto el documento D01 divulga un método de screening para determinar la predisposición a padecer miocardiopatía hipertrófica que comprende la detección de la presencia o ausencia de una mutación en el gen MYH7. D02 divulga una mutación, Ala797Thr, en el gen de la cadena pesada de la beta miosina. D03 divulga la mutación Arg723Gly, como causante de la enfermedad, que da lugar a la transversión 12307C>G. D04 divulga la mutación Ala430Glu (tabla 1). Por tanto, la divulgación de nuevos cambios polimórficos de base única en el gen MYH7, la elaboración de un Kit para detectarlas o el diseño de un biochip con los oligonucleótidos necesarios para su detección, no parece tener otro efecto que la provisión de mutaciones alternativas a las ya existentes en el gen de la cadena pesada de la beta miosina para la determinación de la probabilidad de un sujeto a desarrollar la enfermedad. Alternativas que, a la vista de lo divulgado en el estado de la técnica, parecen ser de realización obvia para el experto en la materia. Así pues, la presente solicitud carecería de actividad inventiva.