

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 815 526**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2014** **PCT/EP2014/078095**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015** **WO15091575**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2014** **E 14818946 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020** **EP 3083988**

54 Título: **Diferentes niveles en muestras de células sanguíneas de marcadores de EMT para el diagnóstico de cáncer, en particular del cáncer colorrectal (CRC) y de páncreas (PC)**

30 Prioridad:

16.12.2013 EP 13197367

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

30.03.2021

73 Titular/es:

**HUMANITAS MIRASOLE S.P.A. (100.0%)
Via Alessandro Manzoni, 56
20100 Rozzano (MI), IT**

72 Inventor/es:

**LAGHI, LUIGI y
CELESTI, GIUSEPPE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 815 526 T3

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

DESCRIPCIÓN

Diferentes niveles en muestras de células sanguíneas de marcadores de EMT para el diagnóstico de cáncer, en particular del cáncer colorrectal (CRC) y de páncreas (PC)

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo de los marcadores moleculares para el diagnóstico de enfermedades, preferiblemente para el diagnóstico de cáncer. La presente invención está dirigida a detectar y medir los niveles de mRNA de los genes implicados en la transición epitelio mesénquima en muestras biológicas, es decir, en muestras de sangre periférica de pacientes con tumores, para determinar la presencia de enfermedad, su progresión y riesgo de recurrencia.

10 Antecedentes

- Las células tumorales circulantes (CTCs) son una población heterogénea de células cancerosas que circulan en la sangre periférica y que se han desprendido de un tumor primario o su metástasis. Actualmente, el número aproximado y el fenotipo correspondiente de CTCs en la sangre total de pacientes con cáncer tiene relevancia clínica con respecto al pronóstico del paciente. El conjunto de CTCs incluye células con características epiteliales, mesenquimales y de tipo severo. Se ha demostrado que la intravasación del cáncer en humanos (Min Yu et al., Science, 2013, 339, 580) y animales se acopla con la transición epitelio mesénquima (EMT), un proceso impulsado por factores de transcripción (TFs; similares pero no limitados a TWIST1, ZEB1, ZEB2, SLUG, SNAIL, PRXX1, etc) y probablemente reversibles (transición mesénquima-epitelio, MET) en los nichos metastásicos y como consecuencia de la modificación de marcadores celulares epiteliales y/o mesenquimales (como, por ejemplo, CDH1 Plastin 3).
- 20 Todos dichos factores/genes de transcripción están implicados en la transición epitelio-mesénquima (marcadores EMT).

Por lo tanto, de detección de marcadores EMT en la sangre humana se espera que proporcione pistas de diagnóstico y pronóstico.

- 25 Celesti et al. (Gastroenterology 2013, 145, 647) mostraron que los niveles de mRNA de TWIST1 eran estadísticamente (valor medio) significativamente más altos en muestras de sangre de paciente con cáncer colorrectal (CCR) que en los controles. Desafortunadamente la distribución de los niveles de TWIST1 en pacientes y controles se superpone parcialmente, lo que hace que la medición de mRNA de TWIST1 por sí sola no sea confiable y adecuada para el diagnóstico.

- 30 Hung Pham et al. (Pancreas 2010, 39, 3, 332-339) sugieren que la sobreexpresión de mRNA de SLUG en muestras de tejido canceroso de páncreas se correlaciona con la regulación posterior de PDGH, dando como resultado una producción mejorada de PGE2. Sin embargo, el documento no muestra que la medición de mRNA de SLUG solo en muestras de sangre sea confiable y adecuada para el diagnóstico de cáncer de páncreas. Kenoki Ohuchida et al. (Int. J. Cancer 2007, 120, 8, 1634-1640) muestran la sobreexpresión de mRNA de TWIST1 en el jugo de páncreas de pacientes con cáncer de páncreas. Sin embargo, puede que no sea útil para distinguirlo de la pancreatitis crónica.

35 Descripción de la invención

Los métodos convencionales aprobados por la FDA (es decir, "Cell Search" (Veridex), "Adna Test Breast Cancer Select" y "Adna test Breast Cancer Detect" (AdnaGen AG), "Biocept Onco CEE" (Biocept Laboratories) detectan antígenos epiteliales expresados, entre otros, por CTCs. Por lo tanto, el valor de diagnóstico y pronóstico de estas pruebas es limitado.

- 40 Los autores muestran un ensayo de RT-PCR cuantitativo específico para la transición de genes epitelio-mesénquima (EMT) presentes en las células circulantes de pacientes con tumores. A diferencia de lo reportado por la técnica anterior, no se necesita una separación previa de las poblaciones de células circulantes antes de la extracción del mRNA. Este enfoque permite detectar niveles aumentados de transcripciones EMT-TF circulantes, independientemente de cualquier característica celular antigénica o fenotípica.

- 45 Los autores encontraron que altos niveles de mRNA de TWIST1, SLUG, y bajos niveles de mRNA de ZEB1 están presentes en las células sanguíneas de pacientes con CRC, mientras que altos niveles de mRNA de SLUG, TWIST1 Y ZEB2 están presentes en las células sanguíneas de pacientes con cáncer de páncreas (PC), permitiendo así un diagnóstico más fiable y robusto.

- 50 Es, por lo tanto, un objetivo de la presente invención un método para determinar si un sujeto está afectado por un cáncer colorrectal o de páncreas que comprenda la etapa de analizar una muestra de sangre de dicho sujeto para determinar la presencia de un conjunto de mRNAs que comprende al menos mRNA de SLUG Y TWIST1 en donde:

- a) el aumento de los niveles de mRNA tanto de los genes TWIST1 como SLUG pero no del gen ZEB2 con respecto a las muestras de control es indicativo de un cáncer colorrectal,

- b) el aumento de los niveles de mRNA de todos los genes TWIST1, SLUG y ZEB2 con respecto a las muestras de control es indicativo de cáncer de páncreas,
- c) el aumento de al menos el nivel de mRNA de SLUG con respecto a un primer punto de corte de SLUG es indicativo de cáncer colorrectal,
- 5 d) en sujetos en donde el nivel de mRNA de SLUG no aumenta, el aumento del nivel de mRNA de TWIST1 con respecto a un punto de corte de TWIST1 es indicativo de cáncer de páncreas, siempre que dicho sujeto muestre también un aumento del nivel de mRNA de ZEB2,
- e) el aumento tanto de los niveles de mRNA de SLUG como de TWIST1 con respecto a puntos de corte respectivos es indicativo de cáncer colorrectal, en donde dichos puntos de corte se determinan mediante el análisis de la curva Característica Operativa del Receptor (ROC).

En el método anterior las muestras de control son muestras de sujetos normales o pacientes con diferentes cánceres con respecto a PC o CRC.

Preferiblemente, en el método según la invención el aumento de los niveles de mRNA tanto de SLUG como de TWIST1 con respecto a los respectivos puntos de corte es indicativo de cáncer colorrectal o de páncreas.

- 15 Preferiblemente, en el método según la presente invención los puntos de corte relevantes son los siguientes:

- primer punto de corte de SLUG para el cáncer colorrectal $7,93018E-9$,
- segundo punto de corte de SLUG para el cáncer colorrectal $1,84E-10$,
- primer punto de corte de SLUG para el cáncer de páncreas $3,27E-9$,
- punto de corte de TWIST1 para el cáncer colorrectal $1,00725E-8$,
- 20 - punto de corte de TWIST1 para el cáncer de páncreas $1,35E-8$,
- punto de corte de ZEB2 para el cáncer de páncreas: $7,19E-6$.

Otro objetivo de la invención es un método para determinar el estadio de un cáncer colorrectal en un sujeto afectado que resultó ser positivo al método anteriormente mencionado que comprende la etapa de analizar una muestra de células sanguíneas de dicho sujeto en donde:

- 25 a) el aumento del nivel de mRNA de ZEB1 con respecto a las muestras de control de sujetos con cáncer colorrectal es indicativo de un estadio menos avanzado del cáncer colorrectal y/o
- b) la disminución de los niveles de mRNA de CDH1 con respecto a las muestras de control de sujetos con cáncer colorrectal es indicativo de enfermedad metastásica (es decir, estadio IV) en el momento del diagnóstico, y/o
- 30 c) el aumento de los niveles de mRNA de TWIST1 con respecto a las muestras de control de sujetos con cáncer colorrectal, es indicativo del desarrollo de una metástasis metacrónica.

En el método anterior para determinar el estadio del cáncer colorrectal en un sujeto afectado, en la etapa a) una muestra de control puede ser una muestra obtenida de un estadio conocido de un sujeto con cáncer colorrectal; en la etapa b) una muestra de control puede ser una muestra obtenida de un sujeto con cáncer colorrectal pero sin lesiones metastásicas; en la etapa c) una muestra de control puede ser una muestra obtenida de un sujeto con

35 cáncer colorrectal que no desarrolló progresión metastásica.

En los métodos según la invención dicha muestra de sangre es preferiblemente una muestra de células enriquecidas en células tumorales circulantes (CTC).

Preferiblemente, dicha muestra de células enriquecidas en células tumorales circulantes (CTC) es una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

- 40 En los métodos según la invención los niveles de mRNAs se obtienen preferiblemente por RT-PCR.

Cualquier otro método para detectar mRNA específico en una muestra de sangre conocido por el experto en la técnica está dentro del alcance de la presente invención. Ejemplos ilustrativos son: métodos de amplificación por PCR (QX200™ Droplet Digital™ PCR System, TaqMan Probes), otros métodos de amplificación; hasta el análisis de la expresión génica de una célula individual (miRGE - nCounter®).

- 45 El método de la invención es capaz de detectar transcripciones EMT en muestras de sangre de humanos o animales; en un aspecto particular el método comprende las etapas de:

- a) separación en un gradiente de densidad con Ficoll de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC),

- b) detección de los niveles de expresión de genes de EMT utilizando RT-PCR,
- c) comparación del nivel de genes de EMT del paciente con los niveles de control normales,
- d) diagnosticar que el paciente tiene un tumor específico si los niveles detectados de los genes de EMT son estadísticamente significativamente diferentes (más altos o más bajos que un valor del punto de corte predeterminado dependiendo del gen seleccionado) que el nivel de control.

Otro objetivo de la invención es el uso de un kit de RT-PCR cuantitativo para llevar a cabo los métodos descritos anteriormente:

- medios de retrotranscripción para obtener cDNAs específicos;
- sondas de amplificación específicas para amplificar cDNAs específicos;
- medios de detección para detectar y medir el nivel de cDNAs específicos amplificados.

Preferiblemente dichas sondas de amplificación son capaces de amplificar:

- la región nt. 781-835 de TWIST1, Acc. No.: NM_000474.3, (SEQ ID No. 1);
- la región nt. 730-830 de SLUG, Acc. No.: NM_003068.4, (SEQ ID No. 2);
- la región nt. 1262-1361 de ZEB2, Acc. No.: NM_014795.3, (SEQ ID No. 3);
- la región nt. 4113-4172 de CDH1, Acc. No.: NM_004360.3, (SEQ ID No. 5);
- la región nt. 2917-3020 de ZEB1, Acc. No.: NM_001128128.2, (SEQ ID No. 6).

Preferiblemente, dichas sondas de amplificación tienen esencialmente las secuencias:

TWIST1-directa AGCAAGATTCAGACCCTCAAGCT (SEQ ID No. 12);

TWIST1-inversa CCTGGTAGAGGAAGTCGATGTACCT (SEQ ID No. 13);

SLUG-directa TGTTTGCAAGATCTGCGGC (SEQ ID No. 14);

SLUG-inversa TGCAGTGAGGGCAAGAAAAA (SEQ ID No. 15);

ZEB2-directa GCTACACGTTTGCCTACCGC (SEQ ID No. 16);

ZEB2-inversa CGATTACCTGCTCCTTGGGTT (SEQ ID No. 17);

CDH1-directa GGAAGTATGAAAAGTGGGCTTG (SEQ ID No. 20);

CDH1-inversa AAATTGCCAGGCTCAATGAC (SEQ ID No. 21);

ZEB1-directa GAAAGTGATCCAGCCAAATGG (SEQ ID No. 22);

ZEB1-inversa TGGGCGGTGTAGAATCAGAGT (SEQ ID No. 23).

Descripción detallada de la invención

La invención se describirá con referencia a ejemplos no limitantes.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Niveles de mRNA de TWIST1 (A), SLUG (B), ZEB1(C), en sangre de 69 pacientes con CRC en comparación con 30 controles sanos.

Figura 2. Curvas ROC para los niveles de mRNA de SLUG (A), TWIST1 (B) en 69 pacientes con CRC en comparación con 30 controles sanos.

Figura 3. Algoritmo para el diagnóstico de CRC basado en los niveles circulantes de mRNAs tanto de TWIST1 como de SLUG (dos etapas).

Figura 4. Algoritmo para el diagnóstico de CRC basado en los niveles circulantes de mRNAs de TWIST1-SLUG más CDH1 (dos etapas).

Figura 5. Niveles de mRNA circulantes de ZEB1 en pacientes con CRC en estadios I y II (pT1-4 N0).

Figura 6. Niveles de mRNA circulantes de ZEB1 en pacientes con CRC en estadios II (pT3 N0) y III (pT3 N1-2).

Figura 7. Niveles de mRNA circulantes de CDH1 en pacientes sin (M0) y con (M+) enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico.

Figura 8. Los altos niveles de mRNA de TWIST1 en las células sanguíneas circulantes están asociados con la progresión metastásica del CRC (supervivencia libre de enfermedad -DFS- según las curvas de Kaplan-Meier).

5 Figura 9. Niveles de mRNA de TWIST1, SLUG y ZEB2 en la sangre de pacientes con PC y controles sanos.

Figura 10. Curva ROC de los niveles de mRNA de SLUG que discriminan los pacientes con PC (n=24) de los controles sanos (n=30).

Figura 11. Algoritmo para el diagnóstico de PC basado en los niveles circulantes de mRNAs de TWIST1-SLUG más ZEB2 (dos etapas).

10 Figura 12. Diferentes niveles de mRNA circulantes de ZEB1, ZEB2, y CDH1 en pacientes con PC y CRC.

Materiales y métodos

Cuantificación de transcripciones de genes en muestras de sangre no seleccionadas

15 Sangre periférica (6 mL) se recogió en un Vacutainer recubierto con anticoagulantes (EDTA, citrato de sodio, heparina) y se almacenó a 4°C. La sangre periférica se procesó dentro de las 4 horas posteriores a la recolección y se separó con gradiente Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Life Science) según las instrucciones del fabricante.

Brevemente, se añadieron 15 mL de Ficoll-Paque a un tubo de centrifuga y PBS diluido (6 mL + 29 mL de disolución salina equilibrada) se colocó cuidadosamente en capas de sobre el Ficoll-Paque.

20 La disolución sin mezclar se centrifugó (400 g durante 40 minutos a 20°C). Utilizando una pipeta Pasteur limpia, se separó la capa superior dejando intacta la capa de linfocito en la interfaz. Después mediante una nueva pipeta Pasteur, la capa de PBMC (que contiene células tumorales circulantes) se transfirió a un tubo de centrifuga limpio y se lavó con al menos 3 volúmenes (18 mL) de disolución salina equilibrada. Una vez resuspendidas, las células se centrifugaron (300 g durante 20 minutos a 20°C), y el sobrenadante fue después eliminado. Después de añadir 50 mL de disolución salina equilibrada, el sedimento de células se centrifugó finalmente (200 g durante 20 minutos a 20°C). El sobrenadante se retiró de nuevo y las células se lisaron con tampón de lisis Qiagen más β-Mercaptoetanol (1:100). A continuación, se aisló el RNA total utilizando el kit Qiagen Rneasy-Mini según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el RNA total resuspendido en 60 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC-water) se trató con DNasa (Ambion, Life Science) para minimizar la contaminación por el DNA genómico.

30 Todas las etapas de preparación y manipulación del RNA se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar, en condiciones libres de RNA. La concentración de RNA se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm utilizando NanoDrop.

Se sometieron a transcripción inversa 2 µg de RNA tratado a cDNA utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem, Life Science). El cDNA sintetizado se sometió a RT-PCR cuantitativa para detectar y cuantificar los niveles de mRNA de genes de EMT:

35 TWIST1: NCBI Acc. No. NM_000474.3 (SEQ ID No. 1),
SLUG o SNAI2: NCBI Acc. No. NM_003068.4 (SEQ ID No. 2),
ZEB2 o SIP1: NCBI Acc. No. NM_014795.3 (SEQ ID No. 3),
SNAIL: NCBI Acc. No. NM_005985.3 (SEQ ID No. 4),
CDH1: NCBI Acc. No. NM_004360.3 (SEQ ID No. 5),
ZEB1: NCBI Acc. No. NM_001128128.2 (SEQ ID No. 6),
40 PRRX1: NCBI Acc. No. NM_006902.4 (SEQ ID No. 7),
PLASTIN3: NCBI Acc. No. NM_005032.6 (SEQ ID No. 8).

En resumen, se colocó 1 µL de cDNA (40 ng) en 20 µL de volumen de reacción que contiene 12 µL de Fast SyberGreen Master Mix, 3 µL de limpieza y cebadores diana directos e inversos mezclados a 5 µM y 4 µL de DEPC-water.

45 Las secuencias específicas de los cebadores fueron:

18s-directa CGC CGC TAG AGG TGA AAT TCT (SEQ ID No. 9),

18s-inversa CTT TCG CTC TGG TCC GTC TT (SEQ ID No. 10);

para amplificar la región de 18s nt. 1049-1100, Acc. No.: M10098.1, NCBI, (SEQ ID No. 11), como control;

TWIST1-directa AGC AAG ATT CAG ACC CTC AAG CT (SEQ ID No. 12);

TWIST1-inversa CCT GGT AGA GGA AGT CGA TGT ACC T (SEQ ID No. 13);

5 para amplificar la región de TWIST1 nt. 781-835, Acc. No.: NM_000474.3, (SEQ ID No. 1);

SLUG-directa TGT TTG CAA GAT CTG CGG C (SEQ ID No. 14);

SLUG-inversa TGC AGT GAG GGC AAG AAA AA (SEQ ID No. 15);

para amplificar la región de SLUG nt. 730-830, Acc. No.: NM_003068.4, (SEQ ID No.2);

ZEB2-directa GCT ACA CGT TTG CCT ACC GC (SEQ ID No. 16);

10 ZEB2-inversa CGA TTA CCT GCT CCT TGG GTT (SEQ ID No. 17);

para amplificar la región de ZEB2 nt. 1262-1361 Acc. No.: NM_014795.3, (SEQ ID No. 3);

SNAIL-directa CTT CCA GCA GCC CTA CGA C, (SEQ ID No. 18);

SNAIL-inversa CGG TGG GGT TGA GGA TCT (SEQ ID No. 19);

para amplificar la región de SNAIL nt. 174-244, Acc. No.: NM_005985.3 (SEQ ID No. 4).

15 CDH1-directa GGAACATGAAAAGTGGGCTTG (SEQ ID No. 20);

CDH1-inversa AAATTGCCAGGCTCAATGAC (SEQ ID No. 21);

para amplificar la región de CDH1 nt. 4113-4172, Acc. No.: NM_004360.3 (SEQ ID No. 5);

ZEB1-directa GAAAGTGATCCAGCCAAATGG (SEQ ID No. 22);

ZEB1-inversa TGGGCGGTGTAGAATCAGAGT (SEQ ID No. 23);

20 para amplificar la región de ZEB1 nt. 2917-3020, Acc. No.: NM_001128128.2, (SEQ ID No. 6);

PRRX1-directa AACTATCCTGATGCTTTTGTG (SEQ ID No. 24);

PRRX1-inversa GAACTTGGCTCTTCGGTTC (SEQ ID No. 25);

Para amplificar la región de PRRX1 nt. 395-494, Acc. No.: NM_006902.4 (SEQ ID No. 7);

PLASTIN3-directa CCTTCCGTAAGTGGATGAACTC (SEQ ID No. 26);

25 PLASTIN3-inversa GGATGCTTCCCTAATTCAACAG (SEQ ID No. 27);

para amplificar la región de PLASTIN3 nt. 1624-1837, Acc. No.: NM_005032.6, (SEQ ID No. 8).

La amplificación se llevó a cabo en un ABI 7900 HT Real Time PCR System (Applied Biosystem) utilizando el programa: 95°C durante 10 minutos; 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

30 La cuantificación de los genes diana y el gen de referencia interno 18s se realizó utilizando la emisión de fluorescencia de SyberGreen. La contaminación de DNA se evaluó mediante la realización de PCR en la parte sin transcripción inversa de cada muestra. Para todas las muestras se detectó fluorescencia después de 0-40 ciclos para los genes de control y marcadores en una sola reacción, lo que permite la deducción de los ciclos en el valor umbral (CT) para cada producto. El valor CT se consideró como el ciclo de PCR en el que se detecta un aumento significativo de la fluorescencia debido a la acumulación exponencial de productos de PCR bicatenarios. La expresión de los genes diana se normalizó sobre la expresión del gen de limpieza, 18s para obtener la cuantificación absoluta ($2^{-\Delta CT}$), mientras que la cuantificación relativa se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para comparar los niveles de transcripciones de controles versus pacientes (Livak KJ, Methods, 2001; 25(4): 402-8).

Análisis estadístico

40 El ensayo U de Mann-Whitney se utilizó para evaluar las diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de mRNAs de EMT-TF circulantes entre los pacientes con cáncer y los controles. Para los EMT-TFs con niveles significativamente más altos en pacientes con cáncer CRC y de páncreas, la sensibilidad y especificidad se

estimaron utilizando los puntos de corte óptimos determinados mediante el análisis de las curvas ROC. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Todo el análisis estadístico se realizó utilizando el software StatDirect (StatsDirect Ltd, Altrincham CHESHIRE, UK).

Para cada marcador de diagnóstico propuesto se ha evaluado lo siguiente:

- 5 • La especificidad (también llamada tasa de verdaderos positivos) mide la proporción de positivos reales que se identifican correctamente como tales. La especificidad se refiere a la capacidad de la prueba para excluir correctamente una afección.
- La sensibilidad (también llamada tasa de verdaderos negativos) mide la proporción de negativos que se identifican correctamente como tales. La sensibilidad se refiere a la capacidad de la prueba para identificar correctamente una afección.
- 10 • La relación de posibilidades de diagnóstico es una medida de la eficacia de un ensayo de diagnóstico. Se define como la relación entre las probabilidades de que la prueba sea positiva si el sujeto tiene una enfermedad en relación con las probabilidades de que la prueba sea positiva si el sujeto no tiene la enfermedad.
- 15 • Los valores predictivos positivos y negativos (PPV y NPV respectivamente) son las proporciones de resultados positivos y negativos en estadísticas y ensayos de diagnóstico que son resultados verdaderos positivos y verdaderos negativos.
- La tasa de falsos positivos es la expectativa de la proporción de falsos positivos, que se refiere a la probabilidad de rechazar falsamente la hipótesis nula para un ensayo en particular.
- 20 • La tasa de falsos negativos es la tasa de aparición de resultados negativos de ensayos en sujetos que se sabe que tienen la enfermedad o el comportamiento por el cual se está evaluando a un individuo.
- La tasa de Falsa omisión es la probabilidad de no satisfacer la hipótesis nula entre aquellos que aceptan la hipótesis nula.
- La tasa de descubrimiento falso es la proporción esperada de errores entre las hipótesis rechazadas.
- 25 • La razón de verosimilitud positiva (LR+) define cuánto aumenta la probabilidad de enfermedad si la prueba es positiva.
- La razón de verosimilitud negativa (LR-) define cuánto disminuye la probabilidad de enfermedad si la prueba es negativa.
- La precisión es la medida que define qué tan cerca llega el resultado de un ensayo a valor real.

Pacientes y métodos

- 30 El estudio piloto incluyó 69 pacientes con CRC, y 24 pacientes con cáncer de páncreas, más 30 sujetos de control sanos. Todas las muestras se procesaron como se describió anteriormente después de obtener el consentimiento informado del paciente.

Resultados

- 35 1. Altos niveles de mRNAs de TWIST1, SLUG, y bajos niveles de mRNA de ZEB1 están presentes en las células sanguíneas de pacientes con CRC.

En controles sanos ($n = 30$), se detectaron mRNA codificantes de ZEB1, ZEB2, CDH1, y SNAIL en todas las muestras (100%). Se detectaron mRNAs de TWIST1 y SLUG en 26 (87%) y 11 (36,7%) controles, respectivamente. mRNA de Platin3 se detectó en 15 (50%), y mRNA de PRRX1 en 4 (13%) muestras.

- 40 En muestras de sangre de 69 pacientes con CRC, los autores detectaron mRNA de TWIST1 (ensayo de Fisher versus controles $p = 0,007$), mRNAs de ZEB2 y SNAIL en todos los casos (100%), y SLUG en 66 (95,7%; ensayo de Fisher versus controles $p < 0,001$) casos. CDH1 se detectó en 65 de 66 (98,5%) muestras analizadas. Además, en 57 muestras analizadas, la expresión de ZEB1 se detectó en 55 (96,5%), Platin3 en 44 (77,2%) y PRRX1 en 3 (5,3%).

- 45 Como se muestra en la Figura 1, los pacientes con CRC tenían niveles más altos de mRNA de TWIST1 (Figura 1A, cuantificación absoluta, media, controles $9,93E-9$ vs CRC $3,22E-8$; $p < 0,001$) y SLUG (Figura 1B, controles $9,09E-13$ vs CRC $1,83E-08$; $p < 0,001$). Por el contrario, los niveles de ZEB1 fueron más bajos en pacientes con CRC que en los controles (Figura 1C, controles $5,64E-7$ vs CRC $1,66E-07$; $p < 0,02$). Los niveles en sangre de mRNAs de ZEB2, SNAIL, CDH1, Platin, PRRX1 no difirieron entre los casos y los controles. En consecuencia, en comparación con los controles, los niveles de TWIST1 en las células sanguíneas de los pacientes con cáncer fueron 2,3 veces más altos, los de SLUG 386 veces más altos y los de ZEB1 5,1 veces más bajos (cuantificación relativa).
- 50

Valores umbral de mRNAs de TWIST1 y SLUG en células sanguíneas para identificar pacientes con CRC

A continuación, los autores determinaron el punto de corte óptimo para niveles altos de transcripciones que discriminan a los pacientes con CRC mediante el análisis de la curva ROC (Figura 2). Mediante este enfoque, niveles altos de TWIST1 (por encima del punto de corte, $1,01E-8$) tuvieron una sensibilidad del 94,2% y una especificidad del 50% (Tabla 1 y Figura 2B), y niveles altos de SLUG (por encima del punto de corte, $7,93E-9$) tuvieron una sensibilidad del 76,8% y una especificidad del 90% para discriminar a los pacientes con CRC de controles sanos (Tabla 2 y Figura 2A).

Tabla 1. Rendimientos de diagnóstico, sensibilidad y especificidad, para el cáncer colorrectal de niveles de mRNA de TWIST1 circulantes por encima de los valores del punto de corte óptimo.

Resultado de la prueba	Resultado de la prueba	Afección		Frecuencia	
		Afección positiva (CRC)	Afección negativa (CTR)		
		65	15	69,7%	
	Resultado de la prueba positiva			PPV	FDR
				0,81	0,19
	Resultado de la prueba negativa	4	15	FOR	NPV
				0,210526316	0,79
	LR+	TPR, Sensibilidad		FPR, razón falso positivo	
	1,884057971	0,94		0,500	
	LR-	FNR		TNR, Especificidad	
	0,115942029	0,058		0,5	
	DOR			ACC	
	16,3			0,81	

PPV = Valor predictivo positivo

FPR = Tasa de falsos positivos

FDR = Tasa de falso descubrimiento

FNR = Tasa de falsos negativos

FOR = Tasa de omisión falsa

TNR = Tasa de verdaderos negativos

NPV = Valor predictivo negativo

LR+ = Razón de verosimilitud positiva

ACC = Precisión

LR- = Razón de verosimilitud negativa

TPR = Tasa de verdaderos positivos

DOR = Razón de probabilidad diagnóstica

Tabla 2. Rendimientos de diagnóstico, sensibilidad y especificidad, para el cáncer colorrectal de niveles de mRNA de SLUG circulantes por encima de los valores del punto de corte óptimo.

Resultado de la prueba	Resultado de la prueba	Afección		Frecuencia	
		Afección positiva (CRC)	Afección negativa (CTR)		
		53	3	69,7%	
	Resultado de la prueba positiva			PPV	FDR
				0,95	0,05
	Resultado de la prueba negativa	16	27	FOR	NPV
				0,372093023	0,63
	LR+	TPR, Sensibilidad		FPR, razón falso positivo	
	7,68115942	0,768		0,100	
	LR-	FNR		TNR, Especificidad	
	0,257648953	0,232		0,9	
	DOR			ACC	
	29,8			0,81	

PPV = Valor predictivo positivo

FPR = Tasa de falsos positivos

FDR = Tasa de falso descubrimiento

FNR = Tasa de falsos negativos

FOR = Tasa de omisión falsa

TNR = Tasa de verdaderos negativos

NPV = Valor predictivo negativo

LR+ = Razón de verosimilitud positiva

ACC = Precisión

LR- = Razón de verosimilitud negativa

TPR = Tasa de verdaderos positivos

DOR = Razón de probabilidad diagnóstica

- 5 Combinación de niveles de mRNA de TWIST1 y SLUG circulantes (con y sin CDH1) en las células sanguíneas para identificar a los pacientes con CRC.

Para discriminar a los pacientes con CRC de los individuos sanos, aprovechamos la sensibilidad de TWIST1 junto con la especificidad de SLUG. Por medio de este enfoque, determinamos primero las muestras con niveles altos (es decir, por encima del punto de corte) de los mRNAs tanto del TWIST1 como de SLUG (CRC 49/69, 71%; controles 2/30, 6,6%) (Figura 3). Por otro lado, los niveles bajos (es decir, por debajo del punto de corte) de los mRNAs tanto de TWIST1 como de SLUG se detectaron solo en los controles (14/30, 33,3%). En las muestras restantes (20 casos y 14 controles), 16 casos y 13 controles mostraron niveles altos de mRNA de TWIST1 y bajos de SLUG, y 4 casos y 1 control con niveles bajos de mRNA de TWIST1 y altos de SLUG. Se trazó una curva ROC de SLUG de segundo orden (punto de corte $1,84E-10$) para estas 34 muestras. Según el punto de corte de segundo orden, 17 muestras de CRC mostraron niveles altos de SLUG y 3 niveles bajos de SLUG, en comparación con los 7 controles con los niveles altos de SLUG y 7 controles con los niveles bajos de SLUG. Finalmente, la sensibilidad y especificidad generales del algoritmo de TWIST1-SLUG de dos etapas fueron 95,7% y 70%, respectivamente. Los valores predictivos positivos y negativos fueron 88% y 87,5%, respectivamente, con una razón de probabilidad diagnóstica de 51,3 (Tabla 3).

- 20 Alternativamente, se podría dibujar una curva ROC de CDH1 de segundo orden (punto de corte 7,29E-8) para las 34 muestras con los niveles de mRNA altos de TWIST1-bajos de SLUG y bajos de TWIST1-altos de SLUG. Según el punto de corte de CDH1 de segundo orden, 14 muestras de CRC mostraron niveles bajos de CDH1 y 6 niveles altos de CDH1, en comparación con 4 controles con niveles bajos de CDH1 y 10 controles con niveles altos de CDH1 (Figura 4). En consecuencia, el algoritmo alternativo que combina los niveles de TWIST1 y SLUG más CDH1
25 alcanzó una sensibilidad general del 91,3% y una especificidad del 80%. Los valores predictivos positivos y negativos fueron del 91% y 80%, respectivamente, con una razón de probabilidad diagnóstica del 42% (Tabla 4). La combinación de dos o más marcadores mejora el rendimiento diagnóstico de un solo marcador al hacer coincidir una sensibilidad sustancialmente similar con una mayor especificidad, de modo que la tasa de pruebas de falsos positivos se minimiza en relación con la tasa de falsos negativos, lo que se traduce en una mejor razón de
30 probabilidades diagnósticas y precisión.

Tabla 3. Rendimientos de diagnóstico, sensibilidad y especificidad, para el cáncer colorrectal de niveles de mRNA de TWIST1 y SLUG circulantes por encima de los valores del punto de corte óptimo, según el algoritmo de diagnóstico

		Afección		Frecuencia	
		Afección positiva (CRC)	Afección negativa (CTR)	69,7%	30,3%
Resultado de la prueba	Resultado de la prueba positiva	66	9	PPV	0,88
	Resultado de la prueba negativa	3	21	FOR	0,125
LR+		TPR, Sensibilidad	FPR, razón falso positivo	AOC	
3,19		0,957	0,300		
LR-		FNIR	TNR, Especificidad	0,88	
0,062		0,043	0,7		
DOR (Razón de probabilidad diagnóstica)					
51,3					

- 35

PPV = Valor predictivo positivo

FPR = Tasa de falsos positivos

FDR = Tasa de falso descubrimiento

FNR = Tasa de falsos negativos

FOR = Tasa de omisión falsa

TNR = Tasa de verdaderos negativos

NPV = Valor predictivo negativo

LR+ = Razón de verosimilitud positiva

ACC = Precisión

LR- = Razón de verosimilitud negativa

TPR = Tasa de verdaderos positivos

DOR = Razón de probabilidad diagnóstica

Tabla 4. Rendimientos de diagnóstico, sensibilidad y especificidad, para el cáncer colorrectal de niveles de mRNAs de TWIST1, SLUG más CDH1 circulantes por encima de los valores del punto de corte óptimo, según el algoritmo de diagnóstico 2.

Resultado de la prueba	Afección		Frecuencia	
	Afección positiva (CRC)	Afección negativa (CTR)		
	68	6	69,7%	
Resultado de la prueba positiva	68	6	PPV	FDR
Resultado de la prueba negativa	6	24	0,91	0,09
LR+	TPR, Sensibilidad	FPR, razón falso positivo	FOR	NPV
4,57	0,91	0,20	0,2	0,8
LR-	FNR	TNR, Especificidad	ACC	
0,11	0,09	0,80	0,88	
DOR				
42				

PPV = Valor predictivo positivo

FPR = Tasa de falsos positivos

FDR = Tasa de falso descubrimiento

FNR = Tasa de falsos negativos

FOR = Tasa de omisión falsa

TNR = Tasa de verdaderos negativos

10 NPV = Valor predictivo negativo

LR+ = Razón de verosimilitud positiva

ACC = Precisión

LR- = Razón de verosimilitud negativa

TPR = Tasa de verdaderos positivos

DOR = Razón de probabilidad diagnóstica

Los niveles de mRNA de ZEB1 y CDH1 circulantes en las células sanguíneas difieren según las características TNM del cáncer en el momento del diagnóstico.

- 15 En cuanto a la invasión total, los niveles de mRNA de ZEB1 fueron significativamente más bajos en pacientes con CRCs pT1-T2 NOMO (es decir, estadio I) que en pacientes con CRCs pT3-T4 NOMO (es decir, estadio II) (Media, estadio I $1,14 \times 10^{-7}$ vs estadio II $4,51 \times 10^{-7}$, general $p = 0,001$) (Figura 5). En cuanto a la metástasis en los ganglios linfáticos, los pacientes con CCR que muestran la misma profundidad de invasión local (es decir, pT3) tenían niveles más altos de mRNA de ZEB1 circulantes en ausencia de invasión ganglionar (es decir, N0) que cuando la invasión ganglionar estaba presente en el examen patológico (N1-N2, media N0 $6,72 \times 10^{-7}$ vs N1-2 $2,66 \times 10^{-7}$; $p = 0,02$) (Figura 6).
- 20 En cuanto a la presencia de metástasis a distancia, los pacientes con enfermedad metastásica (M+) en el momento del diagnóstico, mostraron niveles circulantes significativamente más bajos de mRNA de CDH1 que aquellos sin lesiones metastásicas (M0; media, M+ $2,38 \times 10^{-8}$ vs M0 $5,88 \times 10^{-8}$, $p = 0,02$) (Figura 7).

- 25 Los niveles de mRNA de TWIST1 circulantes en las células sanguíneas discriminan la progresión a metástasis a lo largo del tiempo. En pacientes sin metástasis del CRC a distancia (estadio I-III) en el momento del diagnóstico ($n = 54$), los niveles de mRNA de TWIST1 circulantes fueron más altos ($> 3,07 \times 10^{-8}$) en 7 de los 8 (87,5%) pacientes que desarrollaron posteriormente una progresión metastásica post-quirúrgica. En consecuencia, los niveles de TWIST1 discriminaron una supervivencia libre de enfermedad significativamente diferente entre los pacientes con CRC (Figura 8).

- 30 2. Los altos niveles de mRNAs de TWIST1, SLUG, y ZEB2 están presentes en las células sanguíneas de pacientes con cáncer de páncreas (PC).

- 35 Los niveles de mRNA de EMT-TF en la sangre difieren entre los pacientes con PC y los individuos sanos. Como se muestra en la Figura 9, en comparación con los controles sanos, 24 pacientes con PC tuvieron niveles más altos de TWIST1 (Figura 9A, cuantificación absoluta, media, controles $9,935 \times 10^{-9}$ vs PC $3,41 \times 10^{-8}$; $p < 0,001$) y de SLUG (Figura 9B, controles $9,09 \times 10^{-13}$ vs PC, $1,30 \times 10^{-8}$; $p < 0,0001$), así como de ZEB2 (Figura 9C, controles $1,69 \times 10^{-6}$ vs PC $1,52 \times 10^{-5}$; $p < 0,01$). En consecuencia, los niveles de mRNAs de TWIST1, SLUG, y ZEB2 circulantes en la sangre de pacientes con PC fueron un promedio de 14, 788, y 5 veces más altos, respectivamente, que los controles (cuantificación relativa).

Valores umbral de mRNA de SLUG en sangre para identificar pacientes con PC. Mediante el análisis de la curva ROC, los niveles altos de SLUG (por encima del punto de corte, 3,27E-9) alcanzaron por sí mismos el 100% de sensibilidad y el 70% de especificidad para discriminar a los pacientes con cáncer de los controles sanos, alcanzando valores predictivos positivos del 75% y negativos del 100% con una razón de probabilidad de diagnóstico de 130 (Figura 10 y Tabla 5).

Combinación de los niveles de mRNAs de TWIST1 y SLUG circulantes con ZEB2 en células sanguíneas para identificar pacientes con PC. Para discriminar los pacientes con PC de los individuos sanos, utilizamos TWIST1 junto con SLUG. Por medio de este enfoque, determinamos primero las muestras con niveles altos (es decir, por encima del punto de corte) de mRNA tanto de TWIST1 (punto de corte, 1,35E-8) como de SLUG (PC 22/24, 91,6%; controles 6/30, 20%) (Figura 11). Por otro lado, los niveles bajos (es decir, por debajo del punto de corte) de mRNAs tanto de TWIST1 como de SLUG se detectaron solo en los controles (14/30, 33,3%). En las muestras restantes (2 casos y 10 controles), solo 8 controles mostraron niveles altos-TWIST1-bajos-SLUG, y 2 casos y 2 controles con niveles de mRNA bajo-TWIST1-alto-SLUG. Se trazó una curva ROC de ZEB2 de segundo orden (punto de corte 7,19E-8) para estas 12 muestras. Según el punto de corte de segundo orden, 1 muestra de PC mostró niveles altos de ZEB2 y 1 niveles bajos de ZEB2, en comparación con los 7 controles con niveles altos de ZEB2 y 3 controles con niveles bajos de ZEB2. Finalmente, la sensibilidad y la especificidad generales del algoritmo de TWIST1-SLUG más ZEB2 de dos etapas fueron del 95,8% y el 76,7%, respectivamente. Los valores predictivos positivos y negativos fueron 76,7% y 95,8%, respectivamente, con una razón de probabilidad de diagnóstico de 75,57 (Tabla 7).

Los niveles de mRNA de ZEB1, ZEB2 y CDH1 son más altos en las células sanguíneas de los pacientes con PC que en las de los pacientes con CRC. Además, al comparar los niveles del gen EMT en sangre entre pacientes con PC y CRC, encontramos que los niveles de ZEB1 (PC 1,14E-6 vs CRC 1,66E-7, $p = 0,002$), ZEB2 (PC 1,52E-5 vs CRC 6,62E-6, $p = 0,03$) y CDH1 (PC 1,36E-7 vs CRC 5,73E-8, $p = 0,001$) fueron significativamente más altos en pacientes con PC que pacientes con CRC. Para la cuantificación relativa, los niveles de transcripción de ZEB1 fueron un promedio de 7 veces más altos en pacientes con PC que en pacientes con CRC mientras que ZEB2 y CDH1 fueron ambos 2 veces más altos en pacientes con PC que en pacientes con CRC (Figura 12).

Valores umbral de los niveles de mRNA de CDH1 y ZEB2 en células sanguíneas que discriminan el cáncer de páncreas del cáncer colorrectal. El valor del punto de corte de CDH1 que discrimina pacientes con cáncer de páncreas de aquellos con cáncer colorrectal fue 1,022E-7 dando una especificidad del 75,4% para el cáncer de páncreas (17 positivos de cáncer colorrectal de 69) y una sensibilidad del 58,3% (detectando 14 de 24 pacientes con cáncer de páncreas). Posteriormente, un punto de corte de ZEB2 de segundo orden (4,08E-5) permitió discriminar 5 de los 17 pacientes con cáncer colorrectal (ZEB2 valores $< 4,08E-5$) que no se detectaron mediante los niveles de CDH1, mientras que detectaron 2 de 10 pacientes con cáncer de páncreas (ZEB2 valores $> 4,08E-5$) que no fueron detectados mediante los niveles de CDH1. En general, el uso combinado de los niveles de mRNA de CDH1 y ZEB2 llevó a discriminar a los pacientes con cáncer de páncreas de los que tenían cáncer colorrectal con una especificidad del 82% y una sensibilidad del 66,7%.

Tabla 5. Rendimientos de diagnóstico, sensibilidad y especificidad para el cáncer de páncreas de los niveles de mRNA de SLUG circulantes por encima del valor del punto de corte óptimo.

Resultado de la prueba	Resultado de la prueba	Afección positiva (PC)	Afección negativa (CTR)	Frecuencia	
				44,4%	
Resultado de la prueba	Resultado de la prueba positiva	24	8	PPV	FDR
	Resultado de la prueba negativa	0	22	0,75	0,25
				FOR	NPV
				0	1
	LR+	TPR, Sensibilidad	FPR, razón falso positivo	ACC	
	3,75	1,000	0,267	0,85	
	LR-	FNR	TNR, Especificidad		
	0	0,000	0,7		
	DOR				
	129,7				

PPV = Valor predictivo positivo

FPR = Tasa de falsos positivos

FDR = Tasa de falso descubrimiento

FNR = Tasa de falsos negativos

FOR = Tasa de omisión falsa

TNR = Tasa de verdaderos negativos

NPV = Valor predictivo negativo

LR+ = Razón de verosimilitud positiva

ACC = Precisión

LR- = Razón de verosimilitud negativa

TPR = Tasa de verdaderos positivos

DOR = Razón de probabilidad diagnóstica

Tabla 6. Rendimientos de diagnóstico, sensibilidad y especificidad para el cáncer de páncreas de los niveles de mRNA de TWIST1 circulante por encima del valor del punto de corte.

Resultado de la prueba	Resultado de la prueba	Afección		Frecuencia	
		Afección positiva (PC)	Afección negativa (CTR)	44,4%	
Resultado de la prueba	Resultado de la prueba positiva	22	14	PPV	FDR
	Resultado de la prueba negativa	2	16	FOR	NPV
LR+		TPR, Sensibilidad	FPR, razón falso positivo	ACC	
1,964285714		0,917	0,467	0,70	
LR-		FNR	TNR, Especificidad		
0,15625		0,083	0,533		
DOR					
12,57					

Tabla 7. Rendimientos de diagnóstico, sensibilidad y especificidad para el cáncer de páncreas de los niveles de mRNA de SLUG, TWIST1 y ZEB2 circulante por encima del valor del punto de corte.

Resultado de la prueba	Resultado de la prueba	Afección		Frecuencia	
		Afección positiva (PC)	Afección negativa (CTR)	44,4%	
Resultado de la prueba	Resultado de la prueba positiva	23	7	PPV	FDR
	Resultado de la prueba negativa	1	23	FOR	NPV
LR+		TPR, Sensibilidad	FPR, razón falso positivo	ACC	
4,107142857		0,958	0,233	0,85	
LR-		FNR	TNR, Especificidad		
0,054347826		0,042	0,767		
DOR					
75,57					

10 PPV = Valor predictivo positivo

FPR = Tasa de falsos positivos

FDR = Tasa de falso descubrimiento

FNR = Tasa de falsos negativos

FOR = Tasa de omisión falsa

TNR = Tasa de verdaderos negativos

NPV = Valor predictivo negativo

LR+ = Razón de verosimilitud positiva

ACC = Precisión

LR- = Razón de verosimilitud negativa

15 TPR = Tasa de verdaderos positivos

DOR = Razón de probabilidad diagnóstica

Listado de secuencias

<110> Humanitas Mirasole S.p.A.

<120> Diferentes niveles en muestras de células sanguíneas de marcadores EMT para el diagnóstico de cáncer, en particular de cáncer colorrectal (CRC) y de páncreas (PC)

<130> PCT 124788

<150> EP13197367.9

<151> 16-12-2013

<160> 27

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1669

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

gagggtataag agcctccaag tctgcagctc tcgccaact cccagacacc tcgcgggctc	60
tgcagcaccg gcaccgtttc caggaggcct ggcggggtgt gcgtccagcc gttgggcgct	120
ttcttttttg acctcggggc catccacacc gtcccctccc cctcccgct ccctccccgc	180
ctcccccgcg cgccctcccc gcggaggtcc ctcccgctcg tcctcctgct ctctcctccg	240
cgggcccgc at cgcccgggcc ggcgcgcgc gcgggggaag ctggcgggct gaggcgcccc	300
gctctttctcc tctgccccgg gcccgcgagg ccacgcgtcg ccgctcgaga gatgatgcag	360
gacgtgtcca gctcgccagt ctgcgcggcc gacgacagcc tgagcaacag cgaggaagag	420
ccagaccggc agcagccgcc gagcggcaag cgcgggggac gcaagcggcg cagcagcagg	480
cgcagcgcg gcggcgggcg ggggcccggc ggagcccgcg gtgggggctg cggaggcggc	540
gacgagccgg gcagcccgcc ccagggcaag cgcggaaga agtctgcggg ctgtggcggc	600
ggcggcggcg cgggcgggcg cggcggcagc agcagcgcg gcgggagtc gcagtcttac	660
gaggagctgc agacgcagcg ggtcatggcc aacgtgcggg agcgccagcg caccagtcg	720
ctgaacgagg cgttcgccc gcctgcggaag atcatcccca cgctgccctc ggacaagctg	780
agcaagattc agaccctcaa gctggcggcc aggtacatcg acttcctcta ccaggtcctc	840
cagagcgacg agctggactc caagatggca agctgcagct atgtggctca cgagcggtc	900
agctacgcct tctcgggtctg gaggatggag ggggcctggt ccatgtccgc gtcccactag	960
caggcgagc cccccacccc ctccagcagg ccggagacct agatgtcatt gtttcagag	1020
aaggagaaaa tggacagtct agagactctg gagctggata actaaaaata aaaatatatg	1080
ccaaagattt tcttggaat tagaagagca aaatccaaat tcaaagaaac agggcggtgg	1140
gcgcactttt aaaagagaaa gcgagacagg ccggtggaca gtgattccca gacgggcagc	1200

ES 2 815 526 T3

ggcaccatcc	tcacacctct	gcattctgat	agaagtctga	acagttgttt	gtgttttttt	1260
tttttttttt	tttgacgaag	aatgttttta	tttttatatt	tttcatgcat	gcattctcaa	1320
gaggtcgtgc	caatcagcca	ctgaaaggaa	aggcatcact	atggactttc	tctattttta	1380
aatggttaaca	atcagaggaa	ctataagaac	accttttagaa	ataaaaatac	tgggatcaaa	1440
ctggcctgca	aaaccatagt	cagttaattc	tttttttcat	ccttcctctg	aggggaaaaa	1500
caaaaaaaaa	cttaaaatac	aaaaaacaac	attctattta	tttattgagg	acccatggtg	1560
aaatgcaaat	agatccggtg	tctaaatgca	ttcatatttt	tatgattggt	ttgtaaaatat	1620
ctttgtatat	ttttctgcaa	taaataaata	taaaaaattt	agagaaaaa		1669

<210> 2

<211> 2112

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

aaaacgggct	cagttcgtaa	aggagccggg	tgacttcaga	ggcgccggcc	cgtccgtctg	60
ccgcacctga	gcacggcccc	tgcccagagc	tgcccgcgcg	cgatgctgta	gggaccgccc	120
tgtcctcccg	ccggaccgtt	atccgcgcgc	ggcgcccgcc	agaccgcgtg	gcaagatgcc	180
gcgctccttc	ctggtcaaga	agcatttcaa	cgcctccaaa	aagccaaact	acagcgaact	240
ggacacacat	acagtgatta	tttccccgta	tctctatgag	agttactcca	tgctgtcat	300
accacaacca	gagatcctca	gctcaggagc	atacagcccc	atcactgtgt	ggactaccgc	360
tgctccattc	cacgcccagc	tacccaatgg	cctctctcct	ctttccggat	actcctcatc	420
tttggggcga	gtgagtcccc	ctcctccatc	tgacacctcc	tccaaggacc	acagtggctc	480
agaaagcccc	attagtgatg	aagaggaaag	actacagtcc	aagctttcag	acccccatgc	540
cattgaagct	gaaaagtttc	agtgaattt	atgcaataag	acctattcaa	ctttttctgg	600
gctggccaaa	cataagcagc	tgactgcga	tgcccagtct	agaaaatctt	tcagctgtaa	660
atactgtgac	aaggaatatg	tgagcctggg	cgcctgaag	atgcatattc	ggaccacac	720
attaccttgt	gtttgcaaga	tctgcgga	ggcgttttcc	agaccctggt	tgcttcaagg	780
acacattaga	actcacacgg	gggagaagcc	tttttcttgc	cctcactgca	acagagcatt	840
tgacagacag	tcaaatctga	gggctcatct	gcagacccat	tctgatgtaa	agaaatacca	900
gtgcaaaaac	tgctccaaaa	ccttctccag	aatgtctctc	ctgcacaaac	atgaggaatc	960
tggctgctgt	gtagcacact	gagtgcgca	atcaatgttt	actcgaacag	aatgcatttc	1020
ttcactccga	agccaaatga	caaataaagt	ccaaaggcat	tttctcctgt	gctgaccaac	1080
caaataatat	gtatagacac	acacacatat	gcacacacac	acacacacac	ccacagagag	1140
agagctgcaa	gagcatggaa	ttcatgtgtt	taaagataat	cctttccatg	tgaagtttaa	1200

ES 2 815 526 T3

aattactata tattttgctga tggctagatt gagagaataa aagacagtaa cttttctctt	1260
caaagataaa atgaaaagca cattgcatct tttcttccta aaaaaatgca aagatttaca	1320
ttgctgccaa atcattttcaa ctgaaaagaa cagtattgct ttgtaataga gtctgtaata	1380
ggatttccca taggaagaga tctgccagac gcgaactcag gtgccttaaa aagtattcca	1440
agtttactcc attacatgtc ggttgtctgg ttgccattgt tgaactaaag cttttttttg	1500
attacctgta gtgcttttaa gtatatTTTT aaaagggagg aaaaaataa caagaacaaa	1560
acacaggaga atgtattaaa agtatttttg ttttgttttg tttttgcca ttaacagtat	1620
gtgccttggg ggaggaggga aagattagct ttgaacattc ctggcgcatg ctccattgtc	1680
ttactatttt aaaacatttt aataattttt gaaaattaat taaagatggg aataagtgca	1740
aaagaggatt cttacaaatt cattaatgta cttaactat ttcaaagca taccacaaat	1800
gcaataatac aataccccctt ccaagtgcct ttttaaattg tatagttgat gagtcaatgt	1860
aaatttgtgt ttatttttat atgattgaat gagttctgta tgaaactgag atgttgtcta	1920
tagctatgtc tataaacaac ctgaagactt gtgaaacaa tgtttctttt ttaaaaaaca	1980
attttcaagt tttttttaca ataaacagtt ttgatttaaa atctcgtttg tatactattt	2040
tcagagactt tacttgcttc atgattagta ccaaccact gtacaaagaa ttgtttgtta	2100
acaagaaaa aa	2112

<210> 3

<211> 9243

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

atttcatttc ttccactaaa gcgtttgcgg agacttcaag gtataatcta tcccagatcc	60
tttcccagag agaaacttgg cgatcacgtt ttcacatgat gctcacgctc agggcgcttc	120
aattatccct ccccaaaaag ataggtggcg cgtgtttcag ggtctctcgt ctctctccta	180
cagaaaagaa aaagaaaaaa atgtcattag aagaggcgta acacgtcagt ccgtcccag	240
gtttgtgttt cctggagtgg ccgaaagaga tcagttctaa cctgctctgc aggaataacg	300
gtcctgcctc ccgacactct tggcgaggtt tttgtacagt ttgctccggg agctgtttct	360
tcgcttccac ctttttctcc ccacacttc gcggcttctt catgcttttt cttctcacca	420
tttctggcca aaactacaaa caagacttcg cagatcgagc ctgcgtgctg ccgaagcagg	480
gcgccgagtc catgcgaact gccatctgat ccgctcttat caatgaagca gccgatcatg	540
gcggatggcc cccggtgcaa gaggcgcaa caagccaatc ccaggaggaa aaacgtggtg	600
aactatgaca atgtagtgga cacaggttct gaaacagatg aggaagacaa gttcatatt	660
gctgaggatg acggtattgc caaccctctg gaccaggaga cgagtcagc tagtgtgcc	720

ES 2 815 526 T3

aaccatgagt	cctccccaca	cgtgagccaa	gctctgttgc	caagagagga	agaggaagat	780
gaaataaggg	aggggtggagt	ggaacacccc	tggcacaaca	acgagattct	acaagcctct	840
gtagatggtc	cagaagaaat	gaaggaagac	tatgacacta	tggggccaga	agccacgac	900
cagaccgcaa	ttaacaatgg	tacagtgaag	aatgcaaatt	gcacatcaga	ttttgaggaa	960
tactttgcc	aaagaaaact	ggaggaacgc	gatggtcacg	cagtcagcat	cgaggagtac	1020
cttcagcgca	gtgacacagc	cattattttac	ccagaagccc	ctgaggagct	gtctcgccct	1080
ggcacgccag	aggccaatgg	gcaagaagaa	aatgacctgc	cacctggaac	tccagatgct	1140
tttgcccaac	tgctgacctg	cccctactgc	gaccggggct	acaagcgctt	gacatcactg	1200
aaggagcaca	tcaagtaccg	ccacgagaag	aatgaagaga	acttttcctg	ccctctctgt	1260
agctacacgt	ttgcctaccg	caccagctc	gagcggcata	tggtgacaca	caagccaggg	1320
acagatcagc	accaaagtct	aacccaagga	gcaggtaatc	gcaagttcaa	atgcacagag	1380
tgtggcaagg	ccttcaaata	taaacaccat	ctgaaagaac	acctgcgaat	tcacagtgg	1440
gaaaaacctt	acgagtgcct	aaactgcaag	aaacgtttct	cccattctgg	ttcctacagt	1500
tcgcacatca	gcagcaagaa	atgtattgg	ttaatctctg	taaatggccg	aatgagaaac	1560
aatatcaaga	cggttctctc	ccctaattct	gtttctctct	ctcctactaa	ttcagccatt	1620
accagttaa	gaaacaagtt	ggagaatgga	aaaccactta	gtatgtctga	acagacaggc	1680
ttacttaaaa	ttaaaacaga	accactagac	ttcaatgact	ataaagttct	tatggctaca	1740
cacgggttta	gtggcactag	tccctttatg	aatgggtggc	ttggagccac	cagcccttta	1800
ggagttcatc	catctgctca	gagtccaatg	cagcacttag	gtgtagggat	ggaagccct	1860
ttacttgggt	ttcccaccat	gaatagtaat	ttaagtgagg	tacaaaagg	tctacagatt	1920
gtggacaata	ctgtttccag	gcaaaaaatg	gactgcaagg	ctgaagaaat	ttcaaagttg	1980
aaaggttatc	acatgaagga	tccatgctct	caacctgagg	aacaaggagt	tacttctcct	2040
aatatccgc	ctgtcggtct	tccggtagtg	agtcataatg	gtgccactaa	aagtattatt	2100
gactatacgt	tggaaaaagt	caatgaagcc	aaagcttgcc	tccagagctt	gactactgac	2160
tcaaggagac	agatcagtaa	tataaagaaa	gagaagctac	gtactttaat	agatttggtc	2220
actgatgaca	aaatgattga	gaaccacaac	atatccactc	cattttcatg	ccagttctgt	2280
aaagaaagtt	ttcctggccc	catccctttg	catcagcatg	aacgttacct	ttgtaagatg	2340
aatgaagaga	tcaaggcggt	cctgcagcct	catgaaaaca	tagtcccaa	caaagccgga	2400
gtttttgttg	ataataaagc	cctcctcttg	tcatctgtac	tttctgagaa	aggaatgaca	2460
agccccatca	accatataca	ggaccacatg	tctgtactca	aagcactacta	tgctatgaac	2520
atggagccca	actccgatga	actgtgaaa	atttcatttg	ctgtgggcct	tcctcaggaa	2580
tttgtgaagg	aatggtttga	acaacgaaaa	gtctaccagt	actcaaattc	caggtcccca	2640

ES 2 815 526 T3

tccctgga	aa	gctccaa	gccgttagct	cccaacagta	accctccac	aaaagactct	2700
ttattacca	ggtctcctgt	aaaacctatg	gactccataa	catcaccatc	tatagcagaa		2760
ctccacaaca	gtgttacgaa	ttgtgatcct	cctctcaggc	taacaaaacc	ttcccatttt		2820
accaatatta	aaccagttga	aaaattggac	cactccagga	gtaataactcc	ttctccctta		2880
aatctttcct	ccacatcttc	taaaaactcc	cacagtagtt	catacactcc	aaacagcttc		2940
tcttctgagg	agctccaggc	tgagccttta	gacttgatcat	taccaaaca	aatgaaagaa		3000
cccaaagta	ttatagccac	aaagaacaaa	acaaaagcta	gtagcatcag	tttagatcat		3060
aacagtgttt	cttctctatc	tgaaaactca	gatgagcctc	tgaacttgac	ttttatcaag		3120
aaggaatttt	caaattcaaa	taatctggac	aacaaaagca	ctaaccagct	gttcagcatg		3180
aacctattta	gtgccaaacc	tttatacaca	gctcttccac	ctcaaagcgc	atttccccct		3240
gctactttca	tgccaccagt	ccagaccagt	attcctgggc	tacgaccata	cccaggactg		3300
gatcagatga	gcttctacc	acatatggcc	tacacctacc	caactggagc	agctactttt		3360
gctgatatgc	agcaaaggag	aaagtaccag	cggaaacaag	gatttcaggg	agaattgctt		3420
gatggagcac	aagactacat	gtcaggccta	gatgatatga	cagactccga	ctcctgtctg		3480
tctcgcaaaa	agatcaagaa	gacagagagt	ggcatgtatg	catgtgactt	atgtgacaag		3540
acattccaga	aaagcagttc	ccttctgcga	cataaatcgc	aacacacagg	aaaagacca		3600
catcagtgtc	agatttgtaa	gaaagcgttt	aaacacaagc	accaccttat	cgagcactca		3660
aggcttca	cgggcgagaa	gccctatcag	tgtgataaat	gtggcaagcg	cttctcacac		3720
tggggtcgt	actgcagca	catgaatcac	aggtattcct	actgcaagcg	ggaggcggag		3780
gagcgggaag	cgggcgagcg	cgaggcgcgc	gagaaagggc	acttgaacc	caccgagctg		3840
ctgatgaacc	gggcttactt	gcagagcatt	acctctcagg	ggtactctga	ctcgaggagag		3900
agggagagta	tgccgagggg	tgccgagagc	gagaaggagc	acgagaaaga	aggcgaggat		3960
ggctacggga	agctgggcag	acaggatggc	gacgaggagt	tcgaggagga	agaggaagaa		4020
agtgaata	aaagtatgga	tacggatccc	gaaacgatac	gagatgaaga	agagactgga		4080
gatcactcca	tgacgatag	ttcggaggat	gggaaaatgg	aaaccaaatac	agaccagag		4140
gaagacaata	tggaagatgg	catgtaataa	actactgcat	tttaagcttc	ctattttttt		4200
ttccagtagt	attgttacct	gcttgaaaac	actgctgtgt	taagctgttc	atgcacgtgc		4260
ctgacgcttc	caggaagctg	tagagaggga	cagaaggggc	ggttcagcca	agacagatgt		4320
agacggagtt	ggagctgggt	attgttaaaa	actgcattat	gcaaaaattt	tgtacagtgt		4380
taaggcctaa	aaactgtgtg	gttcagagac	taattcctgt	gtttaatagc	atttatactt		4440
taagcacaac	tagaaaattg	taagaattgc	actctactta	tgtatcacta	caaactttaa		4500

ES 2 815 526 T3

aaaactatgt ctaattttata ttaatacatt ttaaaaaggt gcccgacta ccatacatca	4560
gtatttttat tattattatt gttattcctt ttttaatttaa tgtgctcgca ctacaatgca	4620
tcagtattat gattcctctg tactttcctt tcgctattca tcaatttccc attttttttt	4680
tcagcttaag taaccacaca attttaggcc tcaatttttt tttttttctg tgaaggaact	4740
tgaagtgatg catgtgtgaa ttttaagatac cgaagtctta aagtgacctg gacgtgaagg	4800
aaaaagtaag atgagaaata aagaaagcct ttgtaagggtg gttttaaaag ccttatatgc	4860
aaacctttta atctgtgttt ctgcaagtgc catccttgta cagtgttaag agggtaacat	4920
gggttacctt tgcaccagct tcagtgtaa gctcaccctg ttctttgaag caccatgtc	4980
agtattagaa gaataggcag cagttcctta gtttacatat gtttgtgcaa ttattttctg	5040
tacttttttg ttcattaatt ttgtcagtat tacaccaaac tgtttttgca acaaaaaaat	5100
tttttttgca ttcatttaatt tttaggtcaa ataacatttt atttatgtgg ctcattttat	5160
atttcctaatt tttatttatt tcatactgta gtgtacagta ttatagttct tcaatatata	5220
gatatatttt agtaaaaaag gaacatgacg ttgatcattt gggcaaattt tacgtaaaga	5280
gaagagcatt tattgtgttt tggaacatta attgtgagat gggatttttc aattttatta	5340
ttttattttt gtttttttcc aattactgga aattccaaat ttgggaactt ttgatacgat	5400
cttgtgaaaa cactgtattt tcgactgaaa attccacttt cttcatcttg ttttttagct	5460
aaaaagaggg actgttaaatt acaatgtatg ataccatgac aaaaatcttt cctgaattgt	5520
ctttgtaaaa gtattattga attttcaatt tgtaatttct tttgaaaatg accatgctcg	5580
aataaaaatg tagccaaact aagaatgtag ttaatgagtt ctgtactttt agagagtttt	5640
ccttcaatga ccattaacat gtaacatgct ttatgcttat aataatgcta attatgtttt	5700
tttcatataa ttttagttta gcaataattt tgactggtac caataactgt tttttaaaat	5760
tccataccta tgtacagcaa ttttacagct tttctcaact gatcctgatt ccagattgtg	5820
tatttttatg tgaggttata ttattcaaat ttagtctatt tactttacag acatttctac	5880
ttttgcatta cgagtattta gagattatgt gttaaaaatt cacttctctg tccaaggggt	5940
ctttgtgatt tattcaaaaa aaagtctaatt ttcaaaaaga cagctattat tcagtgttat	6000
ttataaatatg taaccttttt taaaggattg ggatagttta tctcactttt tgaaatgcag	6060
acagtagttt accgtttatc tgaaactaga aggcgtgggt gggagaggaa aagctaaaag	6120
caaatgctaa caaaaaataac cgtgattttc taagacagtt tttcagtttt tacaagatga	6180
ccctaataatt cagaatatga atgtattcgt aggtttttaca taatgacttt tatcaagaaa	6240
ctagattctg cttcttaaat ctaattgcc aagtgaagaat aacagaaaaa acagattacc	6300
ttatcaaat ttagctctt gaatatag aactataata tagtagctgt ccatgtattt	6360
tttctacttt agaatacaag aagaaaagca tcattttgct attaaatttg ctaaaatttt	6420

ES 2 815 526 T3

gagtatgata	tttccagttg	gcaagaacaa	catatattata	tttatttcctt	agccataata	6480
ccactttcct	aaatttcaca	aaagtcattc	tttgcaactt	gaaactcaat	agaaagtgtg	6540
tatgtgtgtg	tgtgtatata	tatatatata	tacacacaca	cacatacaca	gaaaggatgt	6600
aatgaagata	cagtaatagt	tgagcagacc	tttttagaaa	aacatgtttt	tagctctatc	6660
ttcaaacttt	ctggcagagg	gggtgggggg	ggcaggggga	ggagtggcat	caaaatgcta	6720
tgcctcctgt	tatccacagc	ctagagtttt	tatatttgga	aagttagaa	aattctatcc	6780
tcgtttctcc	ttctttgaat	ggcacaaata	aatacactac	ataaattttt	ctggtttgaa	6840
aggctctagg	cgataacttt	attaattcaa	cctgaaaata	tcaagccatt	aaattttgtc	6900
cgggtagaat	aaatccctgt	ggcctctttt	aaagcaatgt	aggtctctgt	tgcccatggg	6960
gcatactctg	gtcccaatcc	acaagagata	ggaccaacaa	acaatgaatg	tgcaacctaa	7020
ctctttctcc	ttggaaagaa	gaaagtgtgc	acgaagtaga	ggaggggtgg	cagaccctgc	7080
cttgcctctc	ctgttaccct	cttctctgtc	atgtgttctt	aactccattt	cataggcagg	7140
ctcagaatac	ctgagtctga	aaatatcagg	ataacacttg	tgaattgtga	caatcactac	7200
aatgtcccat	atctgaggag	ttttttttaa	tgctatttat	ccgctggaca	cgattgcaca	7260
ttagggctgc	ataatcctct	aactctaggg	aaaaataaaa	acttttgatt	tgtcttaaga	7320
ttcttctcca	aggtcgcaaa	caagaaattc	ccctccacaa	ccaagagatg	tgcattttag	7380
taacatcaga	tgtgttcttc	tgttttatca	actacttact	cttcccacac	gcttagttct	7440
aaatctaacc	tttccccctt	cgaatagggg	gcaggggagg	atgaggaaac	actggaacaa	7500
ctgaacaccc	ctgccatttt	tctccaagag	ccttttgtat	tctagcatat	ctgtgcaatc	7560
ttttcttttt	tcttcacatg	acactgtaag	cttaggcctg	aaataactgg	gaagagagat	7620
gcgtatcaga	atttctccgc	aagagctaaa	caaaacatac	atcttcctta	gcatgaattg	7680
gactgggggc	ggagtgggag	ggcttgaggg	aaaggggaaa	gaagggacta	tatttgaata	7740
aatatgaata	aatgtattag	atacttttca	caatcagata	acttttaaaa	aggtcatttt	7800
ttatctttct	aataatgtaa	gccttaataa	aagcaaatct	tagtcacaaa	tttgaggaga	7860
ctgccaataa	ataagtttac	atgtatttga	actgaaaaat	tgtaaccat	gcttttgctc	7920
caagatgtgt	gaggccattc	aggggctgta	gggccctgga	tatacacaca	aacaagtgtg	7980
tgtatatctg	gagccccaca	cattgtaata	aacacagctg	catttatttg	actatgtgat	8040
cccatgtaca	tgtaaaaaa	ttcaaaaaa	cacactcagc	ggattttatt	attgtgcaat	8100
ggggcaatta	ttcaaataaa	catgctcaat	gcaattattt	gaatctcaca	ttgcatgttc	8160
atcaatcata	gcactaaaaa	aagaggggga	aaaaacacca	aagaattcac	atggggaaaa	8220
aatatatata	tgaaaaccac	cttattatag	attttatagg	gcagctgagg	ttatggctcc	8280

ES 2 815 526 T3

cttcttaact gtaactcaac tattctgtat tcaatgacat ttgtttctaa tgattaattg	8340
gttcactcac ttgatcatat aatagcaaac tttataaacc tgtatttgtt agagatgtga	8400
aatctctata tttcaagagc agaagagttc tttctagaca ccttacatca agggacactg	8460
gtccaattat tatcgcttat ataagcactc ctataaattc tgaaaaattt tatacatgca	8520
acaaaacatt cctacatttg aagacattaa gaaaaatcac aggtgactca tctgatcatt	8580
ctatatatta ataaatatta tgacatatat gtgaacacat cacaaatcat attggtgtac	8640
caagaggcaa tttatgcctc tcttaagtat gtactgacat aacctaatat actaaaatgg	8700
gaaggggctt ttagtcaactg aaatatgcat cgtgtaacaa agatgaagaa aatacatggc	8760
ttgtgcccac cataaaaaaa gattcagact gaaggccttag ctttggtttt ttcaattaaa	8820
ttgttaaaact gtgcacagtg attttttttt agaacttgag acatttgtga tgttggtgt	8880
ttaaactctt gttaccttcg ctgtgaattg aaattgtaca tathtagtaa atcatgcaga	8940
caaaacaaac ttttttagaca atatttttat tggagagttt tcttttcctg tatccatgtt	9000
aaaaaaaaa aagacctcct ttcccaaaat aaaaatgtca atactaaatt taaagaagta	9060
taaaggaatg attgcttcct ttagagcaaa atatttaaatt aaacatggag ataattggca	9120
acatgttctt tttgggctag taggctgtgt ccaatttttt gggctctgatg tttcagaggg	9180
cctctgtttc aggggtgaag atgatataat aatctcggaa ttaaacaaat gctattaaat	9240
aac	9243

<210> 4
 <211> 1722
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4 attcattgag ccgcggcacg gcctagcgag tggttcttct gcgctactgc tgccggaatc	60
ggcgacccca gtgcctcgac cactatgccg cgctctttcc tcgtcaggaa gccctccgac	120
cccaatcgga agcctaacta cagcgagctg caggactcta atccagagtt taccttccag	180
cagccctacg accaggccca cctgctggca gccatccac ctccggagat cctcaacccc	240
accgcctcgc tgccaatgct catctgggac tctgtccttg cgccccaagc ccagccaatt	300
gcctgggcct cccttcggct ccaggagagt ccagggtgg cagagctgac ctccctgtca	360
gatgaggaca gtgggaaagg ctcccagccc ccagcccac cctcaccggc tccttcgtcc	420
ttctcctcta cttcagcttc ttccctggag gccgaggcct atgctgcctt ccaggcttg	480
ggccaagtgc ccaagcagct ggcccagctc tctgaggcca aggatctcca ggctcgaaa	540
gccttcaact gcaaatactg caacaaggaa tacctcagcc tgggtgccct caagatgcac	600
atccgaagcc acacgctgcc ctgcgtctgc ggaacctgag ggaaggcctt ctctaggccc	660

ES 2 815 526 T3

tggctgctac aaggccatgt ccggacccac actggcgaga agcccttctc ctgtccccac	720
tgcagccgtg ccttcgctga ccgctccaac ctgcggggccc acctccagac ccactcagat	780
gtcaagaagt accagtgcca ggcgtgtgct cggaccttct cccgaatgtc cctgctccac	840
aagcaccaag agtccggctg ctcaggatgt ccccgctgac cctcgaggct ccctcttcct	900
ctccatacct gcccctgcct gacagccttc cccagctcca gcaggaagga ccccatatcc	960
ttctcactgc catggaattc cctcctgagt gcccacttc tggccacatc agccccacag	1020
gactttgatg aagaccattt tctggttctg tgtcctctgc ctgggctctg gaagaggcct	1080
tcccatggcc atttctgtgg agggagggca gctggcccc agccctgggg gattcctgag	1140
ctggcctgtc tgcgtgggtt tttgtatcca gagctgtttg gatacagctg ctttgagcta	1200
caggacaaag gctgacagac tcaactggaa gctcccaccc cactcagggg accccactcc	1260
cctcacacac accccccac aaggaaccct caggccaccc tccacgaggt gtgactaact	1320
atgcaataat ccacccccag gtgcagcccc agggcctgcg gaggcggtgg cagactagag	1380
tctgagatgc cccgagccca ggcagctatt tcagcctcct gtttgggtgg gtggcacctg	1440
tttcccgggc aatttaacaa tgtctgaaaa gggactgtga gtaatggctg tcacttgtcg	1500
ggggcccaag tgggtgtctc tggcttgacc gatgtgtctc ccagaactat tctgggggcc	1560
cgacaggtgg gcctgggagg aagatgttta catttttaaa ggtacactgg tatttatatt	1620
tcaaacattt tgtatcaagg aaacgttttg tatagttata tgtacagttt attgatattc	1680
aataaagcag ttaatttata tattaataaaa aaaaaaaaaa aa	1722

<210> 5

<211> 4815

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

agtggcgtcg gaactgcaaa gcacctgtga gcttgcggaa gtcagttcag actccagccc	60
gctccagccc ggcccgaccc gaccgcaccc ggcgcctgcc ctgctcggc gtccccggcc	120
agccatgggc ccttgagacc gcagcctctc ggcgctgtg ctgctgtgc aggtctcctc	180
ttggctctgc caggagccgg agccctgcc cctggcttt gacgccgaga gctacacgtt	240
cacggtgccc cggcgccacc tggagagagg ccgctcctg ggcagagtga attttgaaga	300
ttgcaccggt cgacaaagga cagcctattt ttccctcgac acccgattca aagtgggcac	360
agatggtgtg attacagtca aaaggcctct acggtttcat aaccacaga tccatttctt	420
ggtctacgcc tgggactcca cctacagaaa gttttccacc aaagtcacgc tgaatacagt	480
ggggcaccac caccgcccc cgcccatca ggcctccgtt tctggaatcc aagcagaatt	540
gctcacattt cccaactcct ctctggcct cagaagacag aagagagact gggttattcc	600

10

ES 2 815 526 T3

tcccatcagc	tgcccagaaa	atgaaaaagg	cccatttcct	aaaaacctgg	ttcagatcaa	660
atccaacaaa	gacaaagaag	gcaaggtttt	ctacagcatc	actggccaag	gagctgacac	720
acccctgtt	ggtgtcttta	ttattgaaag	agaaacagga	tggtgaagg	tgacagagcc	780
tctggataga	gaacgcattg	ccacatacac	tctcttctct	cacgctgtgt	catccaacgg	840
gaatgcagtt	gaggatccaa	tggagatfff	gatcacggta	accgatcaga	atgacaacaa	900
gcccgaattc	accagggagg	tctttaaggg	gtctgtcatg	gaaggtgctc	ttccaggaac	960
ctctgtgatg	gaggtcacag	ccacagacgc	ggacgatgat	gtgaacacct	acaatgccgc	1020
catcgcttac	accatcctca	gccaaagatcc	tgagctccct	gacaaaaata	tgttcaccat	1080
taacaggaac	acaggagtca	tcagtgtggt	caccactggg	ctggaccgag	agagtttccc	1140
tacgtatacc	ctggtggttc	aagctgctga	ccttcaaggt	gaggggttaa	gcacaacagc	1200
aacagctgtg	atcacagtca	ctgacaccaa	cgataatcct	ccgatcttca	atcccaccac	1260
gtacaagggg	cagggtgcctg	agaacgaggg	taacgtcgta	atcaccacac	tgaagtgtac	1320
tgatgctgat	gcccccaata	ccccagcgtg	ggaggctgta	tacaccatat	tgaatgatga	1380
tggtggacaa	tttgtcgtca	ccacaaatcc	agtgaacaac	gatggcattt	tgaacacagc	1440
aaagggcttg	gattttgagg	ccaagcagca	gtacattcta	cacgtagcag	tgacgaatgt	1500
ggtacctttt	gaggctctct	tcaccacctc	cacagccacc	gtcaccgtgg	atgtgctgga	1560
tgtgaatgaa	gcccccatct	ttgtgcctcc	tgaaaagaga	gtggaagtgt	ccgaggactt	1620
tggtggtggc	caggaaatca	catcctacac	tgcccaggag	ccagacacat	ttatggaaca	1680
gaaaataaca	tatcggattt	ggagagacac	tgccaactgg	ctggagatta	atccggacac	1740
tggtgccatt	tccactcggg	ctgagctgga	caggagggat	tttgagcacg	tgaagaacag	1800
cacgtacaca	gccctaata	tagctacaga	caatggttct	ccagttgcta	ctggaacagg	1860
gacacttctg	ctgatcctgt	ctgatgtgaa	tgacaacgcc	cccataccag	aacctcgaac	1920
tatatctctc	tgtgagagga	atccaaagcc	tcaggtcata	aacatcattg	atgcagacct	1980
tcctcccaat	acatctccct	tcacagcaga	actaacacac	ggggcgagtg	ccaactggac	2040
cattcagtac	aacgacccaa	cccaagaatc	tatcatfctg	aagccaaaga	tggtccttaga	2100
ggtgggtgac	tacaaaatca	atctcaagct	catggataac	cagaataaag	accaagtgtac	2160
caccttagag	gtcagcgtgt	gtgactgtga	aggggccgct	ggcgtctgta	ggaaggcaca	2220
gcctgtcgaa	gcaggattgc	aaattcctgc	cattctgggg	attcttggag	gaattcttgc	2280
tttgctaatt	ctgattctgc	tgctcttgct	gtttcttcgg	aggagagcgg	tggtcaaaga	2340
gcccttactg	ccccagagg	atgacacccg	ggacaacggt	tattactatg	atgaagaagg	2400
aggcgagaaa	gaggaccagg	actttgactt	gagccagctg	cacagggggc	tggtacgtcg	2460
gcctgaagtg	actcgtaacg	acgttgccac	aacctcatg	agtgtcccc	ggtatcttcc	2520

ES 2 815 526 T3

ccgccctgcc aatcccgatg aaattggaaa ttttattgat gaaaatctga aagcggctga	2580
tactgacccc acagccccgc cttatgattc tctgctcgtg tttgactatg aaggaagcgg	2640
ttccgaagct gctagtctga gctccctgaa ctctcagag tcagacaaag accaggacta	2700
tgactacttg aacgaatggg gcaatcgctt caagaagctg gctgacatgt acggagggcg	2760
cgaggacgac taggggactc gagagaggcg ggccccagac ccatgtgctg ggaaatgcag	2820
aaatcacggtt gctgggtggtt tttcagctcc cttcccttga gatgagtttc tggggaaaaa	2880
aaagagactg gttagtgatg cagttagtat agctttatac tctctccact ttatagctct	2940
aataagtttg tgttagaaaa gtttcgactt atttcttaaa gctttttttt ttttccatc	3000
actctttaca tgggtggtgat gtccaaaaga tacccaaatt ttaatatcc agaagaaca	3060
ctttagcatc agaaggttca cccagcacct tgcagatttt cttaaaggaat tttgtctcac	3120
ttttaaaaag aaggggagaa gtcagctact ctagtctgtg tgttttgtgt atataatttt	3180
ttaaaaaaaa tttgtgtgct tctgctcatt actacactgg tgtgtccctc tgcctttttt	3240
ttttttttaa gacagggctc cattctatcg gccaggctgg agtgcagtg tgcaatcaca	3300
gctcactgca gccttgtcct cccaggtcga agctatcctt gcacctcagc ctcccaagta	3360
gctgggacca caggcatgca ccactacgca tgactaattt tttaaatatt tgagacgggg	3420
tctccctgtg ttaccaggc tggctcctaaa ctctgggct caagtgatcc tcccatcttg	3480
gcctcccaga gtattgggat tacagacatg agccactgca cctgccagc tcccactc	3540
cctgccattt tttaaagac agtttcgctc catcgcccag gcctgggatg cagtgatgtg	3600
atcatagctc actgtaacct caaactctgg ggtcgaagca gttctccac cagcctcctt	3660
tttatttttt tgtacagatg gggctctgct atgttgccca agctggctctt aaactcctgg	3720
cctcaagcaa tccttctgcc ttggccccc aaagtgtggtg gattgtgggc atgagctgct	3780
gtgccagacc tccatgtttt aatatcaact ctcaactctg aattcagttg ctttgcccaa	3840
gataggagtt ctctgatgca gaaattattg ggctctttta gggtaagaag tttgtgtctt	3900
tgtctggcca catcttgact aggtattgtc tactctgaag acctttaatg gcttccctct	3960
ttcatctcct gagtatgtaa cttgcaatgg gcagctatcc agtgacttgt tctgagtaag	4020
tgtgttcatt aatgtttatt tagctctgaa gcaagagtga tatactccag gacttagaat	4080
agtgcctaaa gtgctgcagc caaagacaga gcggaactat gaaaagtggg cttggagatg	4140
gcaggagagc ttgtcattga gcctggcaat ttagcaaaact gatgctgagg atgattgagg	4200
tgggtctacc tcatctctga aaattctgga aggaatggag gagtctcaac atgtgtttct	4260
gacacaagat ccgtggtttg tactcaaagc ccagaatccc caagtgcctg cttttgatga	4320
tgtctacaga aaatgctggc tgagctgaac acatttgccc aattccaggt gtgcacagaa	4380

ES 2 815 526 T3

aaccgagaat attcaaaatt ccaaattttt ttcttaggag caagaagaaa atgtggccct	4440
aaagggggtt agttgagggg tagggggtag tgaggatcct gatttggatc tctttttatt	4500
taaatgtgaa tttcaacttt tgacaatcaa agaaaagact tttgttgaaa tagctttact	4560
gtttctcaag tgttttggag aaaaaaatca accctgcaat cactttttgg aattgtcttg	4620
atttttcggc agttcaagct atatcgaata tagttctgtg tagagaatgt cactgtagtt	4680
ttgagtgtat acatgtgtgg gtgctgataa ttgtgtatct tctttggggg tggaaaagga	4740
aaacaattca agctgagaaa agtattctca aagatgcatt tttataaatt ttattaaaca	4800
attttgtaa accat	4815

<210> 6

<211> 6278

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

tttctccctc ccctctggga tgcgaaacgc gaggttttgt aacctttcct ggcaatttta	60
gattttgtgt gggatttcct gtctagaagc agatacgaag atttttaagc tgtttcaaga	120
tgtttccttc caatccataa ttatatTTTT aatatattcg agccatcatt aaaatcactg	180
ctttcgtgat ttttaattatt caaataaaca cttgcatttt aaagacgtct gttgattata	240
aacgaaaggt attttggtat tctcattgtg gagagatgac ttgttatagc aaggagtgga	300
gcataggcta ttgcaatttt aatttcctgt tttagcgtca aatagtgtgt gttccatatt	360
gagctgttgc cgctgttgct gatgtggctt tatgaaagtt acaaattata atactgtggt	420
agaaacaaat tcagattcag atgatgaaga caaactgcat attgtggaag aagaaagtgt	480
tacagatgca gctgactgtg aagggtgtacc agaggatgac ctgccaacag accagacagt	540
gttaccaggg aggagcagtg aaagagaagg gaatgctaag aactgctggg aggatgacac	600
aggaaaggaa gggcaagaaa tcctggggcc tgaagctcag gcagatgaag caggatgtac	660
agtaaaagat gatgaatgcg agtcagatgc agaaaatgag caaaaccatg atcctaattgt	720
tgaagagttt ctacaacaac aagacactgc tgtcattttt cctgaggcac ctgaagagga	780
ccagaggcag ggcacaccag aagccagtgg tcatgatgaa aatggaacac cagatgcatt	840
ttcacaatta ctacactgtc catattgtga tagaggctat aaacgcttta cctctctgaa	900
agaacacatt aaatatcgtc atgaaaagaa tgaagataac tttagttgct ccctgtgcag	960
ttacaccttt gcatacagaa cccaacttga acgtcacatg acatcacata aatcaggaag	1020
agatcaaaga catgtgacgc agtctgggtg taatcgtaaa ttcaaatgca ctgagtgtgg	1080
aaaagctttc aaatacaaac atcacctaaa agagcactta agaattcaca gtggagagaa	1140
gccatatgaa tgcccaaact gcaagaaacg cttttcccat tctggctcct atagctcaca	1200

ES 2 815 526 T3

cataagcagt	aagaaatgta	tcagcttgat	acctgtgaat	gggcgaccaa	gaacaggact	1260
caagacatct	cagtgttctt	caccgtctct	ttcagcatca	ccaggcagtc	ccacacgacc	1320
acagatacgg	caaaagatag	agaataaacc	ccttcaagaa	caactttctg	ttaaccaa	1380
taaaactgaa	cctgtggatt	atgaattcaa	acccatagtg	gttgcttcag	gaatcaactg	1440
ttcaaccctt	ttacaaatg	gggttttcac	tggtggtggc	ccattacagg	caaccagttc	1500
tcctcagggc	atggtgcaag	ctgttgttct	gccaacagtt	ggtttggtgt	ctcccataag	1560
tatcaattta	agtgatattc	agaatgtact	taaagtggcg	gtagatggtg	atgtaataag	1620
gcaagtgttg	gagaataatc	aagccaatct	tgcattccaa	gaacaagaaa	caatcaatgc	1680
ttcaccata	caacaagggtg	gccattctgt	tatttcagcc	atcagctctc	ctttggttga	1740
tcaagatgga	acaacaaaa	ttatcatcaa	ctacagctct	gagcagccta	gccaaacttca	1800
agttgttctt	caaaatttaa	aaaaagaaaa	tccagtcgct	acaaacagtt	gtaaaagtga	1860
aaagttacca	gaagatctta	ctgttaagtc	tgagaaggac	aaaagctttg	aagggggggt	1920
gaatgatagc	acttgtcttc	tgtgtgatga	ttgtccagga	gatattaatg	cacttccaga	1980
attaaagcac	tatgacctaa	agcagcctac	tcagcctcct	ccactccctg	cagcagaagc	2040
tgagaagcct	gagtcctctg	tttcatcagc	tactggagat	ggcaatttgt	ctcctagtca	2100
gccaccttta	aagaacctct	tgtctctcct	aaaagcatat	tatgctttga	atgcacaacc	2160
aagtcgagaa	gagctctcaa	aaattgctga	ttcagtaaac	ctaccactgg	atgtagtaaa	2220
aaagtgggtt	gaaaagatgc	aagctggaca	gatttcagtg	cagtcttctg	aaccatcttc	2280
tcctgaacca	ggcaaagtaa	atatccctgc	caagaacaat	gatcagcctc	aatctgcaaa	2340
tgcaaatgaa	ccccaggaca	gcacagtaaa	tctacaaagt	cctttgaaga	tgactaactc	2400
cccagtttta	ccagtgggat	caaccaccaa	tggttccaga	agtagtacac	catccccatc	2460
acctctaaac	ctttcctcat	ccagaaatac	acagggttac	ttgtacacag	ctgagggtgc	2520
acaagaagag	ccacaagtag	aacctcttga	tctttcacta	ccaaagcaac	agggagaatt	2580
attagaaagg	tcaactatca	ctagtgttta	ccagaacagt	gtttattctg	tccaggaaga	2640
acccttgaac	ttgtcttgcg	caaaaaagga	gccacaaaag	gacagttgtg	ttacagactc	2700
agaaccagtt	gtaaatgtaa	tcccaccaag	tgccaacccc	ataaatatcg	ctatacctac	2760
agtcactgcc	cagttaccca	caatcgtggc	cattgctgac	cagaacagtg	ttccatgctt	2820
aagagcgcta	gctgccaata	agcaaacgat	tctgattccc	caggtggcat	acacctactc	2880
aactacggtc	agccctgcag	tccaagaacc	acccttgaaa	gtgatccagc	caaattggaaa	2940
tcaggatgaa	agacaagata	ctagctcaga	aggagtatca	aatgtagagg	atcagaatga	3000
ctctgattct	acaccgccca	aaaagaaaat	gcggaagaca	gaaaatggaa	tgtatgcttg	3060
tgatttgtgt	gacaagatat	tccaaaagag	tagttcatta	ttgagacata	aatatgaaca	3120

ES 2 815 526 T3

cacaggtaaa agacctcatg agtgtggaat ctgtaaaaag gcattttaaac acaaacatca	3180
tttgattgaa cacatgcgat tacattcttg agaaaagccc tatcaatgtg acaaatgtgg	3240
aaagcgcttc tcacactctg ggtcttattc tcaacacatg aatcatcgct actcctactg	3300
taagagagaa gcggaagaac gtgacagcac agagcaggaa gaggcagggc ctgaaatcct	3360
ctcgaatgag cacgtgggtg ccagggcgtc tccctcacag ggcgactcgg acgagagaga	3420
gagtttgaca agggaagagg atgaagacag tgaaaaagag gaagaggagg aggataaaga	3480
gatggaagaa ttgcaggaag aaaaagaatg tgaaaaacca caaggggatg aggaagagga	3540
ggaggaggag gaagaagtgg aagaagaaga ggtagaagag gcagagaatg agggagaaga	3600
agcaaaaact gaaggtctga tgaaggatga cagggctgaa agtcaagcaa gcagcttagg	3660
acaaaaagta ggcgagagta gtgagcaagt gtctgaagaa aagacaaatg aagcctaatac	3720
gtttttctag aaggaaaata aattctaatt gataatgaat ttcgttcaat attatccttg	3780
cttttcatgg aaacacagta acctgtatgc tgtgattcct gttcactact gtgtaaagta	3840
aaaactaaaa aaatacaaaa taaaaaacac acacacacac acacacacac acacacacac	3900
acacacaaaa taaatccggg tgtgcctgaa cctcagacct agtaattttt catgcagttt	3960
tcaaagttag gaacaagttt gtaacatgca gcagattaga aaaccttaat gactcagaga	4020
gcaacaatac aagagggtta aggaagctga ttaattagat atgcatctgg cattgtttta	4080
tcttatcagt attatcactc ttatgttggg ttattcttaa gctgtacaat tgggagaaat	4140
tttataatth tttatttgta aacatatgct aaatccgctt cagtatttta ttatgttttt	4200
taaaatgtga gaacttctgc actacaaaat tcccttcaca gagaagtata atgtagttcc	4260
aaccctgtct aactaccttt tataaattca gtctagaagg tagtaatttc taatatttag	4320
atgtcttagt agagcgtatt atcattttaa gtgtattgtt agccttaaga aagcagctga	4380
tagaagaact gaagtttctt actcacgtgg tttaaaatgg agttcaaaag attgccattg	4440
agttctgatt gcagggacta acaatgttaa tctgataagg acagcaaaat catcagaatc	4500
agtgtttgtg attgtgtttg aatatgtggg aacatatgaa ggatatgaca tgaagctttg	4560
tatctccttt ggccttaagc aagacctgtg tgctgtaagt gccatttctc agtattttca	4620
aggctctaac ccgccttcat ccaatgtgtg gcctacaata actagcattt gttgatttgt	4680
ctcttgatc aaaattccca aataaaactt aaaaccactg actctgtcag agaaactgaa	4740
acactgggac atttcatcct tcaattcctc ggtattgatt ttatgttgat tgattttcag	4800
aatttctcta cagaaacgaa agggaaatth tctaactctg tttatccatg tacttgcat	4860
tcagacatgg acatgctatt gttatttggc tcataactgt ttccaaatgt tagttattat	4920
ggaccaatth tattaacaac attagctgat ttttacctat cagtattatt ttatttcttt	4980

ES 2 815 526 T3

tagtttatag atctgtgcaa cttttttgta ctgtatgtct tcaaacctgg cagtattaat	5040
acccttctta ctgacatatg tacttttagt tttagaaaac ttttatattt atgtgtctta	5100
tttttatatt tctttattta ttacacagtg tagtgtataa tactgtagtt tgtattaata	5160
caataatata ttttagtatg aaaatttggg aagttgataa gatttaaagt agagatgcaa	5220
ttggttctcc tgcattgaga tttgatttaa cagtgttatg ttaacattta tacttgcctt	5280
ggactgtaga acagaactta aatgggaatg tattagtttt acaactacaa tcaagtcatt	5340
ttacctttac ccagttttta atataaaaact taaattttga aattcactgt gtgactaata	5400
gcatgatgct ctgcagtttt attaagaaat cagcctaacc atacaactct catttcctta	5460
gtaagccaaa ttaggattaa cttctataaa cagtgttggg aacaatgttt aacattttgt	5520
gccaatttgt tcctgtattc atgtatgtaa gttacagatc tgactcttca tttttaagtt	5580
ccttgttaca tcatgggtcat tttctagttt tttaccagac tcccatctca caataaaatg	5640
catcaacaag cctgaactgc tgtcattctt ttcatcatta tcagtatttt ctttgaaaa	5700
ctgtgaaatg gggtagattg tcactcctga tttgattcat cttgagctga atttgggtaa	5760
cactaaatgt ttttagacatt ctccactaaa ttatggattt tcttgtggct aaatgtttct	5820
ggagaggtca gagttgacaa aacctcttca caggttgctc cttcttcctg aaatccttaa	5880
tcctccgcat ttcattgctc aggtcatttc agggaaagcct gggtttagat gcctttctga	5940
ctctcagctc ctgcacttct gtcacatac ctctgatac attatttata ttccttcccc	6000
actaggaaca ggaaccacat ttgtcatagt cactctcaca ttcctcactg cctaacaggg	6060
tgcctggcat aagttgggac aacagatatt tgttgaataa aaatataatt tgcattgtta	6120
tggagctcag ctatgttctc actttttttg cttctaattc cagaatatat gttaaatgat	6180
ctaataattt gattattttc ttataagtct tattaaacac tagtcataat agacacaata	6240
aattatgcct tctttttcta ttgccttaaa aaaaaaaa	6278

<210> 7
 <211> 4071
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7	
tgattcgagc gggaagaggg ggggtgggtgg gatcggtggg ggagaccatg acctccagct	60
acgggcacgt tctggagcgg caaccggcgc tgggcggccg cttggacagc ccgggcaacc	120
tcgacaccct gcaggcgaaa aagaacttct ccgtcagtca cctgctagac ctggaggaag	180
ccggggacat ggtggcggca caggcggtatg agaactgtgg cgaggctggc cggagcctgc	240
tggagtcgcc gggactcacc agcggcagcg acaccccgca gcaggacaat gaccagctga	300
actcagaaga aaaaaagaag agaaagcagc gaaggaatag gacaaccttc aatagcagcc	360

ES 2 815 526 T3

agctgcaggc	tttggagcgt	gtctttgagc	ggacacacta	tcctgatgct	tttgtgcgag	420
aagaccttgc	ccgccgggtg	aacctcaccg	aggcgagagt	gcaggtgtgg	tttcagaacc	480
gaagagccaa	gttccgcagg	aatgagagag	ccatgctagc	caataaaaaa	gcttccctcc	540
tcaaatccta	ctcaggagac	gtgactgctg	tggagcagcc	catcgtacct	cgtcctgctc	600
cgagacccac	cgattatctc	tcctggggga	cagcgtctcc	gtacagatcc	tcgtccctcc	660
caagatgttg	tttacacgag	gggcttcata	acggattcta	acggaagaca	ctgaaaagcg	720
ccatggctac	ttattctgcc	acatgtgcc	acaatagccc	tgcacagggc	atcaacatgg	780
ccaacagcat	tgccaacctg	agactgaagg	ccaaggaata	tagtttacag	aggaaccagg	840
tgccaacagt	caactgagga	aaaaaaataa	ttaaacaggc	ctaagaagaa	atcaaaaacc	900
ataagacacc	tatcctgctc	tgttatttct	tcatctgctg	gggggaaaaa	gtaaattaca	960
aacaaacaaa	caaagcagaa	ctaaaatatt	gggaccatgg	cagagaaaag	caggagagga	1020
gcaaaatgaa	aattagttaa	caaagtgtcc	tcctccctct	gggataccac	caccacttgt	1080
ttctgtgtgt	gtttattttg	tttttctttc	attcatgctt	tgcttaatgt	actccaggct	1140
tcttcagcta	ggttcagccc	accaccccc	atgattgtat	gaagttttaa	aaaaaactac	1200
agcagccaaa	gaaactatat	atatatatat	atatatatat	atccagaatg	attgcctcta	1260
ctgtcctcat	tgacttgttt	gaaccttagt	gccttaccct	gtcctcttcc	cagttctctt	1320
tatagaagct	ctaggagctt	tcgaaaagcc	aaagtctttc	tgaagaatct	gtgctggaca	1380
gacataattc	cctttctcat	tgtctccatc	tttgttgggc	atggtaagg	ttttccatca	1440
gcctctgaaa	aaatagttgt	gcacaacatc	tgtcactgg	actgtctgat	ccaatgtaat	1500
tggctgcgtc	tggtcaattc	taagcactaa	agtctacatc	taagctatag	atttaagctt	1560
gaagctacag	attatatcac	tatcaccacc	accctcacc	ctatgcaatc	aatcaatcaa	1620
tcatcttaag	ttaaagatat	ttgttgtctt	tgaatgattt	gctgtcacag	actatttggt	1680
agaagaaata	tttttcacct	gagagaggaa	gagaaatttc	tctagtaaca	caaagagtga	1740
gttctaaaag	gcatgcccac	atctctttcg	tgccttaagg	atagtgagat	gcacacttat	1800
atatatactg	tatatattta	tatatattata	tatatatttc	atatatatat	ataatattgc	1860
aagcttaagt	ttgcaatttc	ccaaacaata	caaaaagcaa	attacacacc	ctcaccactg	1920
ttcttatctc	tatagtgatg	aaacattaat	tagggatctt	gctgcttttc	tttttctaca	1980
cgaagttttc	attaaagcca	cagaataatt	gatagggcag	ctgtttgaga	acaggtccca	2040
ttttcacatt	agggtcttaa	atgaattaga	aactatttga	ggctataaaa	atgtccttga	2100
gtttggagcc	tgagctctgg	tgaaatgctg	atacatctga	tctatcatgg	gaattgcagt	2160
tagagagagt	aaggaatacc	atttagtcat	ctatccgttc	ttcacttagc	aggaatatga	2220
aagaaaggca	catgtttaag	aggaatacct	aaagggtttt	ctaaattcca	acatttaaaa	2280

ES 2 815 526 T3

ggcaattgtg ggctatTTTT atTTTTtaat atTTtgaaat aaagTTtagt gtctagggct 2340
 gggagccagg actgatcttc catttctttt tctttgttcc cagccatgct tttgtaactt 2400
 gccagggtgga cttgaccaac tacattacca tgctgtgcct cagtttacc accattgtaaaa 2460
 tgggattaat aatacttacc tacctcacag ggggtgtgtg aggtcttatt catttgctcc 2520
 tttattcttt cctgtattct ctgtatgtcc agcactttgt agccatggga ggaaaggagc 2580
 tataaaagtg tacaatgtta atggaatgat acggtaacctg aaagccttgt tttctagtaa 2640
 gaaaatgcta ccttgctgta catacttata accttgattt tggaaatgag aaataggttt 2700
 atatTTtcag atctctcaaa aatcacatca tttgaccaa gaataattta agacacatag 2760
 aacagatttt ttaatttat atTTcatcc tgaccagctt agttctaata atTTtagtt 2820
 gtgagtgtt aaaaaacttt ggatcaattt tgggtcaaaca tgccaacttt gtagtctgag 2880
 tgacaggcaa ggatttttgg gtttaagatg cacttttagc acacatttgt atttcccttg 2940
 gcatatcaga ttgagcta at ggtgatgtta tttcaatcta acagccacca atctgaaatt 3000
 gtatttcaaa tgttgattct gtagttcttt aaataaataat gaagctcatc ttatacattt 3060
 tgctttcacc aattgattcc ttcttctttt agcccactat taaaacattt cttactgaat 3120
 ggttcatgta ggcttgctga acagcacgca ttacttgctt cctgaagagt tccccattc 3180
 atccatttgt cccatttagt gctgtggatt atcaagtttt gaagggaactg tacatccaa 3240
 cagactgaaa cattctaagt gaaatgagta taatccaagt aactggtgaa ctttgagggt 3300
 ttggagcttg aagagaatgg ctaagaagat ttgaattata gggagggaac agaaatcata 3360
 catgaaaagg ttttactgag aaggggaaaa ccttagatag agggacatgt gaaacaaaat 3420
 catttgaaat tttgattcag acatccattt ccagtggcaa acagcaaagc ctgaacccat 3480
 aaacccaaat gataggtgaa gttgggtggt tttatccaat gtctcaagca agcaatgtct 3540
 gggaatatca tagagtaaca agtgctggtc agccaaagaa acattcactg ctggtgaacc 3600
 aataccataa gcatgtatta tctaagcact tgatcaagaa atatacatgt tgtacaagct 3660
 ctcaattttg ttcatttatt atcaaatttt taaaatacaa gtttggtatg tgatttgga 3720
 aagatgcctt ctggatctta agccagttgt cagtggaggt cctcagggt gcaaagtca 3780
 agacataacc ctgttctca ccatcatgat accagatata ggtgaatata taggaactat 3840
 ctgcctgtgt cctcaatctc ccttcaaaca agatgctgat ttgtagggtta cttggcaggt 3900
 taaattaaac cagaagaggt gacttaataa aaaagggaat gacatttagg gtataaagat 3960
 ctcataagaa atgtaatatg taaattatat cttgctttat gttgtaaaat atacattgtt 4020
 tgcgctagaa tagaaatgat ttcttttcaa taaaagaaa gaaggactct a 4071

<210> 8

<211> 3626

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 815 526 T3

ttattaatcc cacaagattg tgtgaatgtg tactccgagc caggcacgtt ggactttctaa	60
cttcctctta gcccaagtag gaaggggaga ctcaggcgct ggggaccatt ctcctctccc	120
tgcagcagag ttgcagtccc tatccctcct ggggtgccat ccccgctgcct attttcttgg	180
atccccaccc agttgatgtg acaggctcgt ggcccaatcc ccttcctggt tcccaggccg	240
actgctagca ccacccgagc caatggcggc ggccgagggg cggagggggc tggcaggagg	300
ggagggagcg ctggcttttag agccacagct gcaaagattc cgaggtgcag aagttgtctg	360
agtgggttgg tcggcggcag tcgggccaga cccaggactc tgcgacttta catctttaa	420
tggatgagat ggctaccact cagatttcca aagatgagct tgatgaactc aaagaggcct	480
ttgcaaaagt tgatctcaac agcaacggat tcatttgtga ctatgaactt catgagctct	540
tcaaggaagc taatatgcca ttaccaggat ataaagtgag agaaattatt cagaaactca	600
tgctggatgg tgacaggaat aaagatggga aaataagttt tgacgaattt gtttatattt	660
ttcaagaggt aaaaagtagt gatattgcca agaccttccg caaagcaatc aacaggaaa	720
aaggtatttg tgctctgggt ggaacttcag agttgtccag cgaaggaaca cagcattctt	780
actcagagga agaaaaatat gcttttgtta actggataaa caaagctttg gaaaatgac	840
ctgattgtag acatgttata ccaatgaacc ctaacaccga tgacctgttc aaagctgttg	900
gtgatggaat tgtgctttgt aaaatgatta acctttcagt tcctgatacc attgatgaaa	960
gagcaatcaa caagaagaaa cttacaccct tcatcattca ggaaaacttg aacttggcac	1020
tgaactctgc ttctgccatt ggggtgtcatg ttgtgaacat tgggtgcagaa gatttgaggg	1080
ctgggaaaacc tcatctggtt ttgggactgc tttggcagat cattaagatc ggtttgttcg	1140
ctgacattga attaaagcag aatgaagcct tggctgcttt actccgagat ggtgagactt	1200
tggaggaact tatgaaattg tctccagaag agcttctgct tagatgggca aactttcatt	1260
tggaaaactc gggctggcaa aaaattaaca actttagtgc tgacatcaag gattccaaag	1320
cctatttcca tcttctcaat caaatcgac caaaaggaca aaaggaaggt gaaccacgga	1380
tagatattaa catgtcaggt ttcaatgaaa cagatgattt gaagagagct gagagtatgc	1440
ttcaacaagc agataaatta ggttgacagc agtttggtac ccctgctgat gttgtcagtg	1500
gaaaccccaa actcaactta gctttcgtgg ctaacctgtt taataaatac ccagcactaa	1560
ctaagccaga gaaccaggat attgactgga ctctattaga aggagaaact cgtgaagaaa	1620
gaaccttccg taactggatg aactctcttg gtgtcaatcc tcacgtaaac catctctatg	1680
ctgacctgca agatgccctg gtaatcttac agttatatga acgaattaaa gttcctgttg	1740

ES 2 815 526 T3

actggagtaa gggttaataaa cctccatacc cgaaactggg agccaacatg aaaaagctag 1800
 aaaactgcaa ctatgctgtt gaattaggga agcatcctgc taaattctcc ctggttggca 1860
 ttggagggca agacctgaat gatgggaacc aaaccctgac tttagcttta gtctggcagc 1920
 tgatgagaag atataccctc aatgtcctgg aagatcttgg agatggtcag aaagccaatg 1980
 acgacatcat tgtgaactgg gtgaacagaa cgttgagtga agctggaaaa tcaacttcca 2040
 ttcagagttt taaggacaag acgatcagct ccagtttggc agttgtggat ttaattgatg 2100
 ccacccagcc aggctgtata aactatgacc ttgtgaagag tggcaatcta acagaagatg 2160
 acaagcacia taatgccaag tatgcagtgt caatggctag aagaatcgga gccagagtgt 2220
 atgctctccc tgaagacctt gtggaagtaa agcccaagat ggtcatgact gtgtttgcat 2280
 gtttgatggg caggggaatg aagagagtgt aaaataacca atctgaataa aacagccatg 2340
 ctcccagggt catgattcgc aggtcagcta tttccagggt aagtgcctat ggcttaagga 2400
 actcttggcc attcaaagga cttttcattt tgattaacag gactagctta tcatgagagc 2460
 cctcagggga aagggtttta gaaaaacaac tcctctttcc catagtcaga gttgaatttg 2520
 tcaggcacgc ctgaaatgtg ctcatagcca aaacatttta ctctctcctc ctagaatgct 2580
 gcccttgaca tttccatttg ctgtatgtta tttcttgcctc tgttatcttt tgcctctta 2640
 gaatgtccct ctcttgggac ttgcttagat gatgggatat gaatattatt agacagtaat 2700
 tttgctttcc atccagtatg ctagtcttta ttcgagaact atggtcagag cgtatttgga 2760
 tatgagtatc ctttgcttat ctttgtagta ctgaaaattt gccgaagtaa ctggctgtgc 2820
 agaatgtaat agaagctttt cttattcttt tattcttaag atcagtatct ttttacagta 2880
 ttctttctac atgatccttt tttgtacatt taagaatatt ttgattatat taaacaagac 2940
 tgctgatttt gctacttttt ttaaggggtc ttcaagtaag taaaacatac atcgtagcta 3000
 gaagaaaaat gtaccttaaa tttgcatctt ccctctcata cccaagctgt aaacaattga 3060
 aatattttgt cttaaatcac ttgggtcaat acatgcttat ttgtttttaa acctgtatca 3120
 tcaaactctc tctctaaatt taaaatgctg ttgaatatga tacttttgag gagagagtgt 3180
 gctcagaact tagacgggat ttggtaggcc aagtatgcta agtgtacaat atatttttta 3240
 attttacacc tgaaacaaag aaatgtgggc actaaaaata aaagtatata tgtaggaatt 3300
 aatgtactct tgctttgtca agctgtttgc tatagtttcc aaggatttat gttactctaa 3360
 ctctgaaaag tgatgtaatc tggtagcaat gtagtagttc aaataaaggc atttacataa 3420
 taattagtct gttcttcatg cttttgtctc ttaggaagta tgccaatgtt tgtcaggatt 3480
 tttttctttt tgtttttctg atgtattctg taaaatgggtg ttgtttaaatt ttgagttttg 3540
 ggagctgaat tagaggtact gaattaagga cagtacaaat gaagtaaaaa ggttttctcc 3600
 aatttaccaa aaaaaaaaaa aaaaaa 3626

<210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador sintético

<400> 9
 cgccgctaga ggtgaaattc t 21

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

 <220>
 <223> cebador sintético

 10 <400> 10
 ctttcgctct ggtccgtctt 20

 <210> 11
 <211> 1969
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> característica_misc
 20 <222> (57)..(61)
 <223> n e s a, c, g o t

 <400> 11
 ccgtccgtcc gtcgtcctcc tcgcttgccg ggcgccgggc ccgtcctcga gccccnnnn 60
 nccgtccggc cgcgtcgggg cctcgccgcg ctctacctac ctacctggtt gatcctgcc 120
 gtagcatatg cttgtctcaa agattaagcc atgcatgtct aagtacgcac ggccggtaca 180
 gtgaaactgc gaatggctca ttaaatacgt tatggttcct ttggtcgctc gtcctctctc 240
 tacttgata actgtggtaa ttctagagct aatacatgcc gacgggcgct gaccccttc 300
 gcggggggga tgcgtgcatt tatcagatca aaaccaaccc ggtcagcccc tctccggccc 360
 cggccggggg gcgggccgcg gcggcttttg tgactctaga taacctcggg ccgacgcac 420
 gccccccgtg gcggcgacga ccatttcgaa cgtctgccct atcaactttc gatggtagtc 480
 gccgtgccta ccatggtgac cacgggtgac ggggaatcag ggttcgattc cggagaggga 540
 gcctgagaaa cggctaccac atccaaggaa ggcagcaggc gcgcaaatta cccactccc 600
 acccggggag gtagtgacga aaaataacaa tacaggactc ttctgaggcc ctgtaattgg 660
 aatgagtcca ctttaaatac tttaacgagg atccattgga gggcaagtct ggtgccagca 720
 gccgcggtaa ttccagctcc aatagcgtat attaaagttg ctgcagttaa aaagctcgta 780

25

ES 2 815 526 T3

gttggatcctt gggagcgggc gggcgggtccg ccgcgaggcg agccaccgcc cgtccccgcc 840
ccttgccctct cggcgccccc tcgatgctct tagctgagtg tcccgcgggg cccgaagcgt 900
ttactttgaa aaaattagag tgttcaaagc aggcccgagc cgcttgata ccgcagctag 960
gaataatgga ataggaccgc ggttctatct tgttggtttt cggaactgag gccatgatta 1020
agagggacgg ccggggggcat tcgtattgcg ccgctagagg tgaaattctt ggaccggcgc 1080
aagacggacc agagcgaaag catttgccaa gaatgtttc attaatcaag aacgaaagtc 1140
ggaggttcga agacgatcag ataccgtcgt agttccgacc ataaacgatg ccgaccggcg 1200
atgcggcggc gttattccca tgaccgcggc ggcagcttcc ggaaaccaa agtctttggg 1260
ttccgggggg agtatggttg caaagctgaa acttaagga attgacgga gggcaccacc 1320
aggagtggag cctgcggctt aatttgactc aacacgggaa acctcaccgc gcccgacac 1380
ggacaggatt gacagattga tagctcttcc tcgattccgt ggggtggtgt gcatggccgt 1440
tcttagttgg tggagcgatt tgtctggtta attccgataa cgaacgagac tctggcatgc 1500
taactagtta cgcgaccccc gagcgggtcgg cgtcccccaa cttcttagag ggacaagtgg 1560
cgttcagcca cccgagattg agcaataaca ggtctgtgat gcccttagat gtccggggct 1620
gcacgcgcgc tacactgact ggctcagcgt gtgcctacc tacgccggca ggcgcgggta 1680
acccgttgaa cccattcgt gatggggatc ggggattgca attattcccc atgaacgagg 1740
aattcccagt aagtgcgggt cataagcttg cgttgattaa gtccctgcc tttgtacaca 1800
ccgcccgtcg ctactaccga ttggatggtt tagtgaggcc ctcggatcgg ccccgccggg 1860
gtcggcccac ggcctggcgg agcgctgaga agacggtcga acttgactat ctagaggaag 1920
taaaagtcgt aacaaggttt ccgtaggtga acctgcggaa ggatcatta 1969

<210> 12

<211> 23

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador sintético

10

<400> 12

agcaagattc agaccctcaa gct 23

<210> 13

15 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> cebador sintético

<400> 13

cctgtagag gaagtcgatg tacct 25

25 <210> 14

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> cebador sintético

<400> 14
 tgtttgcaag atctgcggc 19
 5 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 15
 tgcagtgagg gcaagaaaaa 20
 15 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 16
 25 gctacacgtt tgctaccgc 20
 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 35 <400> 17
 cgattacctg ctcttggt t 21
 <210> 18
 <211> 19
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 45 <400> 18
 ctccagcag ccctacgac 19
 <210> 19
 <211> 18
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> cebador sintético
 <400> 19
 cgggtggggtt gaggatct 18
 60 <210> 20
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 20
 ggaactatga aaagtgggct tg 22
 5 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 21
 aaattgccag gctcaatgac 20
 15 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 22
 25 gaaagtgatc cagccaaatg g 21
 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 35 <400> 23
 tgggcggtgt agaatcagag t 21
 <210> 24
 <211> 22
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 45 <400> 24
 acactatcct gatgctttg tg 22
 <210> 25
 <211> 19
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> cebador sintético
 <400> 25
 gaacttggtc ctcggttc 19
 60 <210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 26
ccttccgtaa ctggatgaac tc 22

5 <210> 27
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador sintético

<400> 27
ggatgcttcc ctaattcaac ag 22

15

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si un sujeto está afectado por un cáncer que comprende la etapa de evaluar una muestra de sangre de dicho sujeto para la presencia de un conjunto de mRNAs que comprende al menos mRNA de SLUG y TWIST1 en donde:
 - 5 a) el aumento de los niveles de mRNA de los genes tanto TWIST1 como SLUG, pero no del gen ZEB2 con respecto a las muestras de control es indicativo de un cáncer colorrectal,
 - b) el aumento de los niveles de mRNA de todos los genes TWIST1, SLUG y ZEB2 con respecto a las muestras de control es indicativo de un cáncer de páncreas,
 - 10 c) el aumento de al menos el nivel de mRNA de SLUG con respecto al primer punto de corte de SLUG es indicativo de cáncer colorrectal,
 - d) en sujetos en los que el nivel de mRNA de SLUG no aumente, el aumento del nivel de mRNA de TWIST1 con respecto a un punto de corte de TWIST1 es indicativo de cáncer de páncreas, siempre que dicho sujeto muestre también un aumento del nivel de mRNA de ZEB2;
 - 15 e) el aumento de los niveles de mRNA tanto de SLUG como de TWIST1 con respecto a sus respectivos puntos de corte es indicativo de cáncer colorrectal,en donde dichos puntos de corte se determinan mediante el análisis de la curva Característica Operativa del Receptor (ROC).
2. Un método para determinar el estadio de un cáncer colorrectal en un sujeto afectado que resultó ser positivo al método según la reivindicación 1, que comprende la etapa de valorar una muestra de sangre de dicho sujeto en donde:
 - 20 a) el aumento del nivel de mRNA de ZEB1 con respecto a las muestras de control de sujetos con cáncer colorrectal es indicativo de un estadio menos avanzado del cáncer colorrectal y/o
 - b) la disminución de los niveles de mRNA de CDH1 con respecto a las muestras de control de sujetos con cáncer colorrectal es indicativo de enfermedad metastásica (es decir, estadio IV) en el momento del diagnóstico y/o
 - 25 c) el aumento de los niveles de mRNA de TWIST1 con respecto a las muestras de control de sujetos con cáncer colorrectal, es indicativo del desarrollo de una metástasis metacrónica.
3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde dicha muestra de sangre es una muestra de células enriquecidas en células tumorales circulantes (CTC).
- 30 4. El método según la reivindicación 3 en donde dicha muestra de células enriquecidas en células tumorales circulantes (CTC) es una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde los niveles de mRNAs se obtienen mediante RT-PCR.
- 35 6. Uso de un kit de RT-PCR cuantitativo para llevar a cabo los métodos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que incluye:
 - a) medios de retrotranscripción para obtener cDNAs específicos;
 - b) sondas de amplificación específicas para amplificar cDNAs específicos;
 - c) medios de detección para detectar y medir el nivel de cDNAs específicos amplificados.
- 40 7. Uso de un kit de RT-PCR cuantitativo según la reivindicación 6 en donde dichas sondas de amplificación son capaces de amplificar:
 - a) la región nt. 781-835 de TWIST1, Acc. No.: NM_000474.3, (SEQ ID No. 1);
 - b) la región nt. 730-830 de SLUG, Acc. No.: NM_003068.4, (SEQ ID No. 2);
 - c) la región nt. 1262-1361 de ZEB2 Acc. No.: NM_014795.3, (SEQ ID No. 3);
 - d) la región nt. 4113-4172 de CDH1, Acc. No.: NM_004360.3, (SEQ ID No. 5);
 - 45 e) la región nt. 2917-3020 de ZEB1, Acc. No.: NM_001128128.2, (SEQ ID No. 6).

8. Uso del kit de RT-PCR cuantitativo según la reivindicación 7 en donde dichas sondas de amplificación tienen esencialmente las secuencias:

TWIST1-directa AGCAAGATTCAGACCCTCAAGCT (SEQ ID No. 12);

TWIST1-inversa CCTGGTAGAGGAAGTCGATGTACCT (SEQ ID No. 13);

5 SLUG-directa TGTTTGCAAGATCTGCGGC (SEQ ID No. 14);

SLUG-inversa TGCAGTGAGGGCAAGAAAAA (SEQ ID No. 15);

ZEB2-directa GCTACACGTTTGCCTACCGC (SEQ ID No. 16);

ZEB2-inversa CGATTACCTGCTCCTTGGGTT (SEQ ID No. 17);

CDH1-directa GGAACATGAAAAGTGGGCTTG (SEQ ID No. 20);

10 CDH1-inversa AAATTGCCAGGCTCAATGAC (SEQ ID No. 21);

ZEB1-directa GAAAGTGATCCAGCCAAATGG (SEQ ID No. 22);

ZEB1-inversa TGGGCGGTGTAGAATCAGAGT (SEQ ID No. 23).

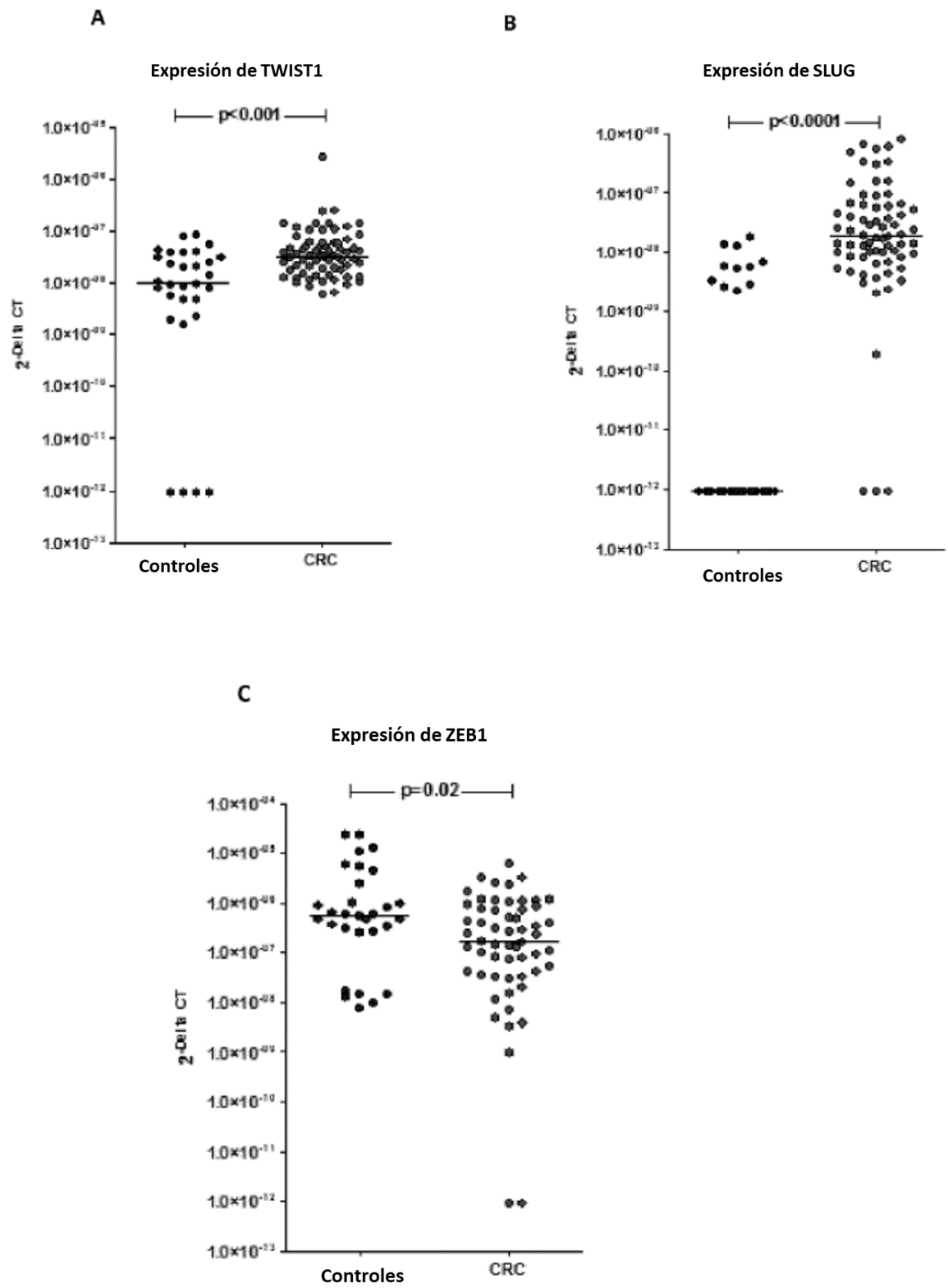
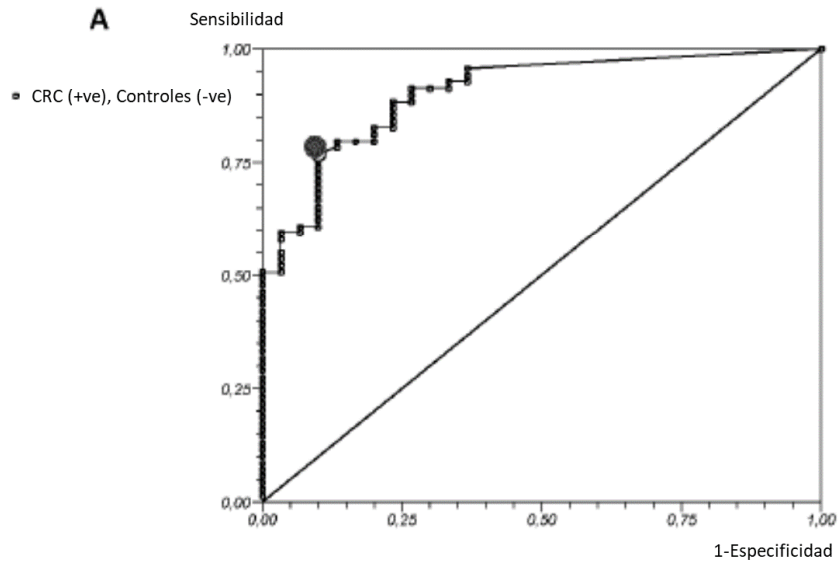


Fig. 1

SLUG



TWIST1

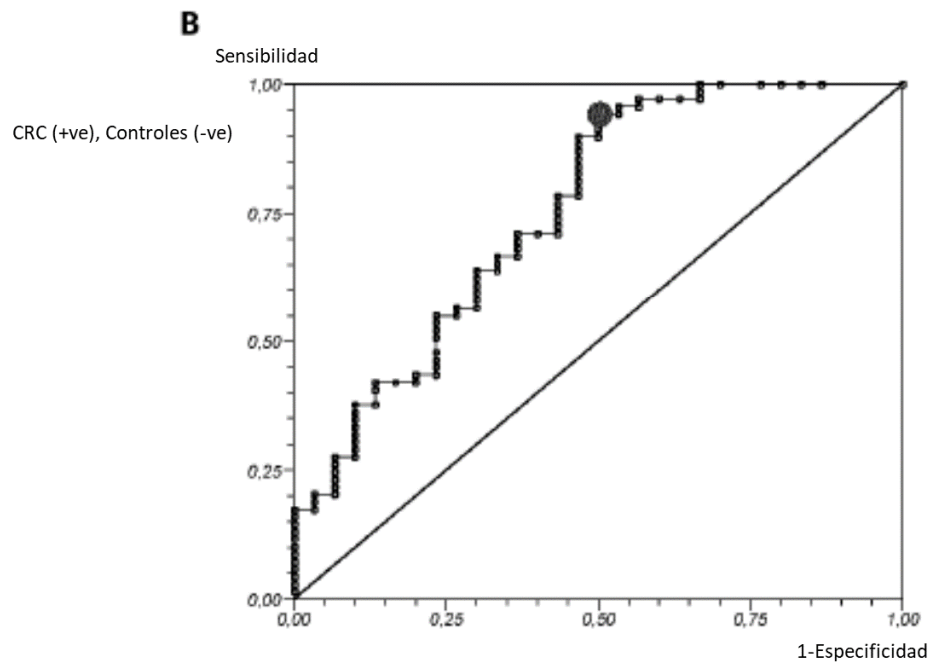


Fig. 2

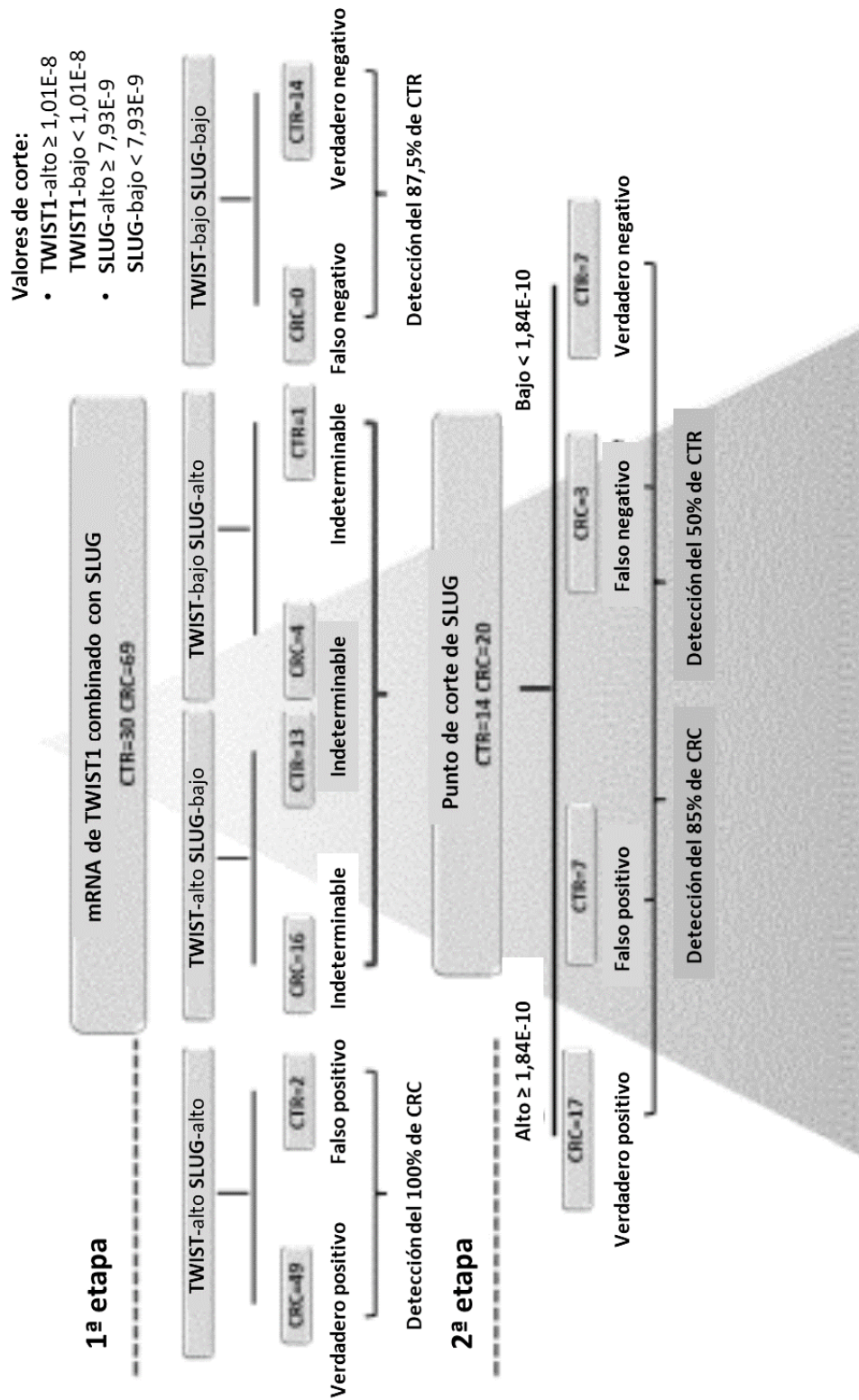


Fig. 3

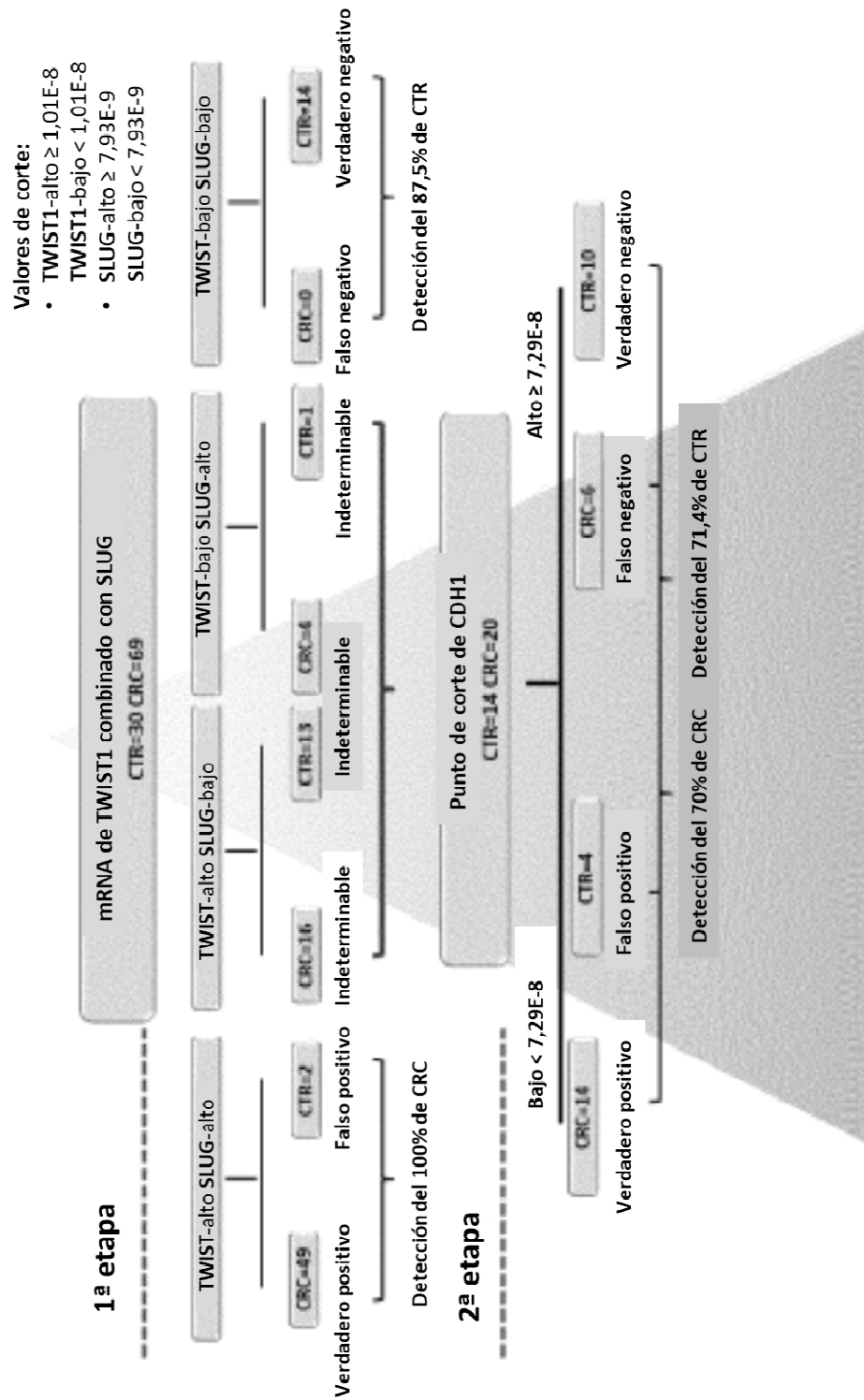


Fig. 4

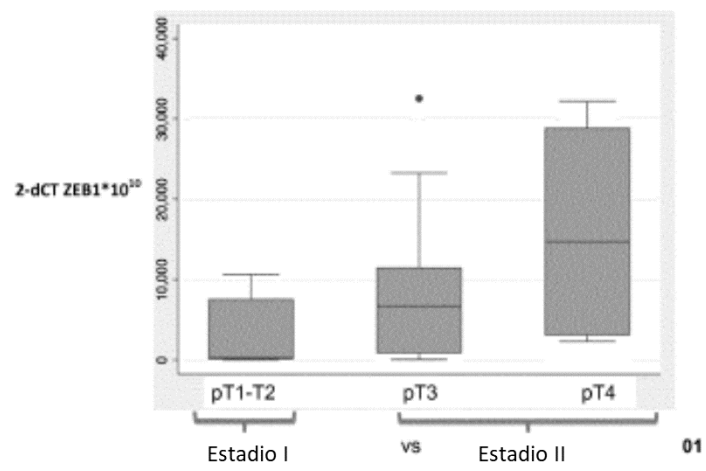


Fig. 5

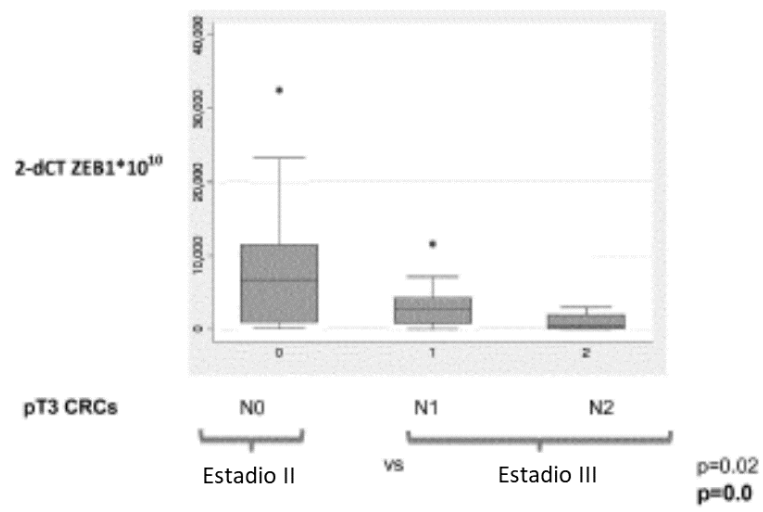


Fig. 6

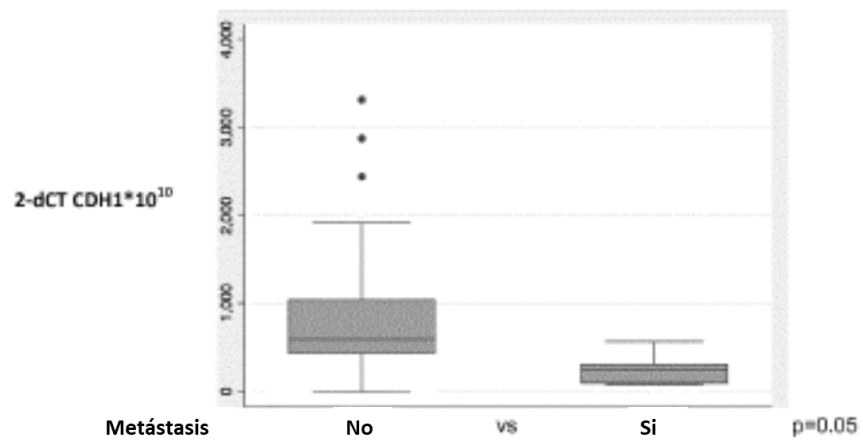


Fig. 7

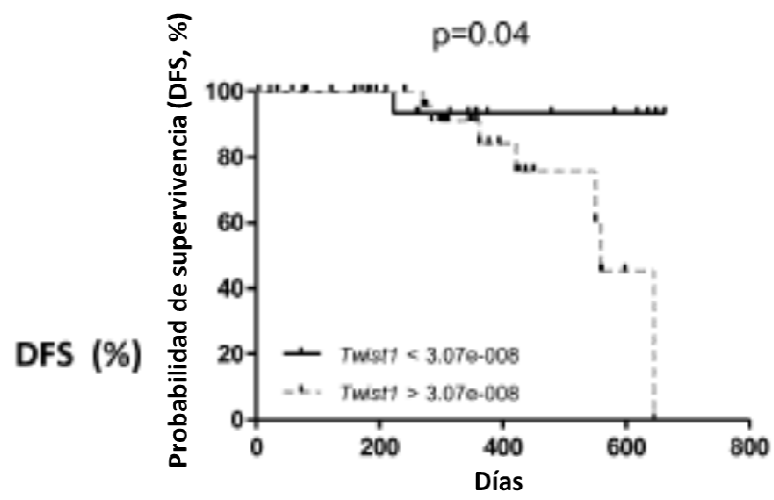


Fig. 8

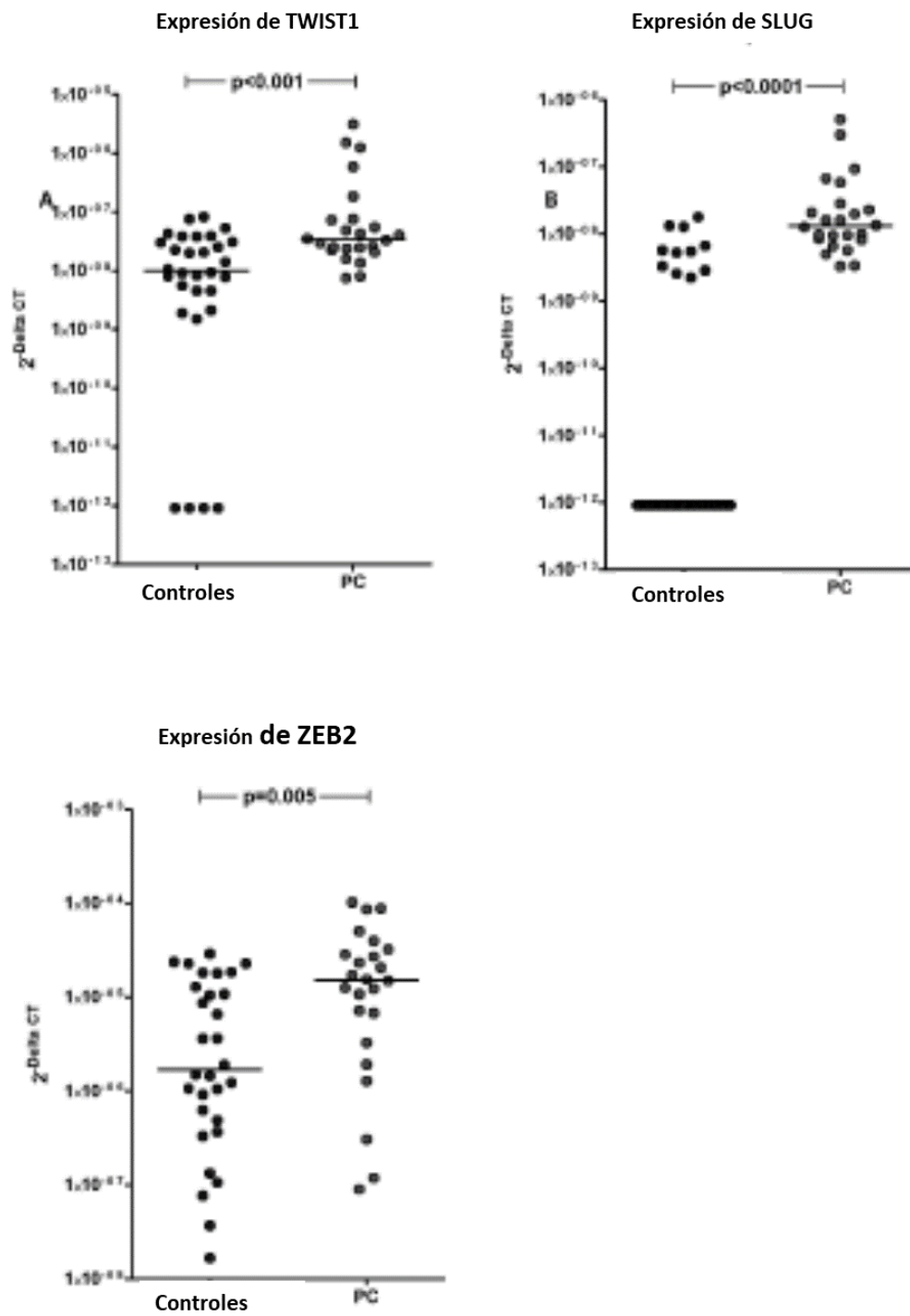


Fig. 9

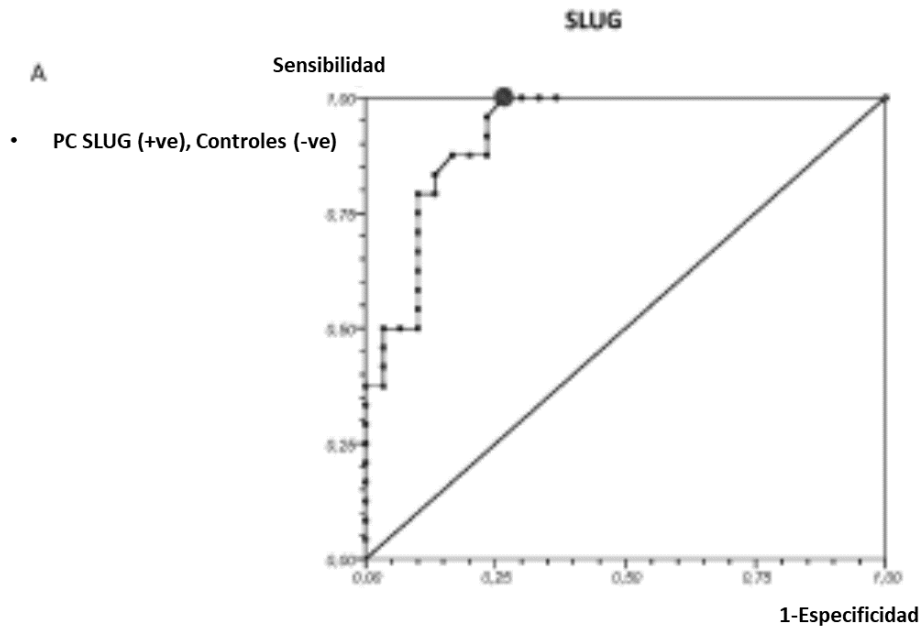


Fig. 10

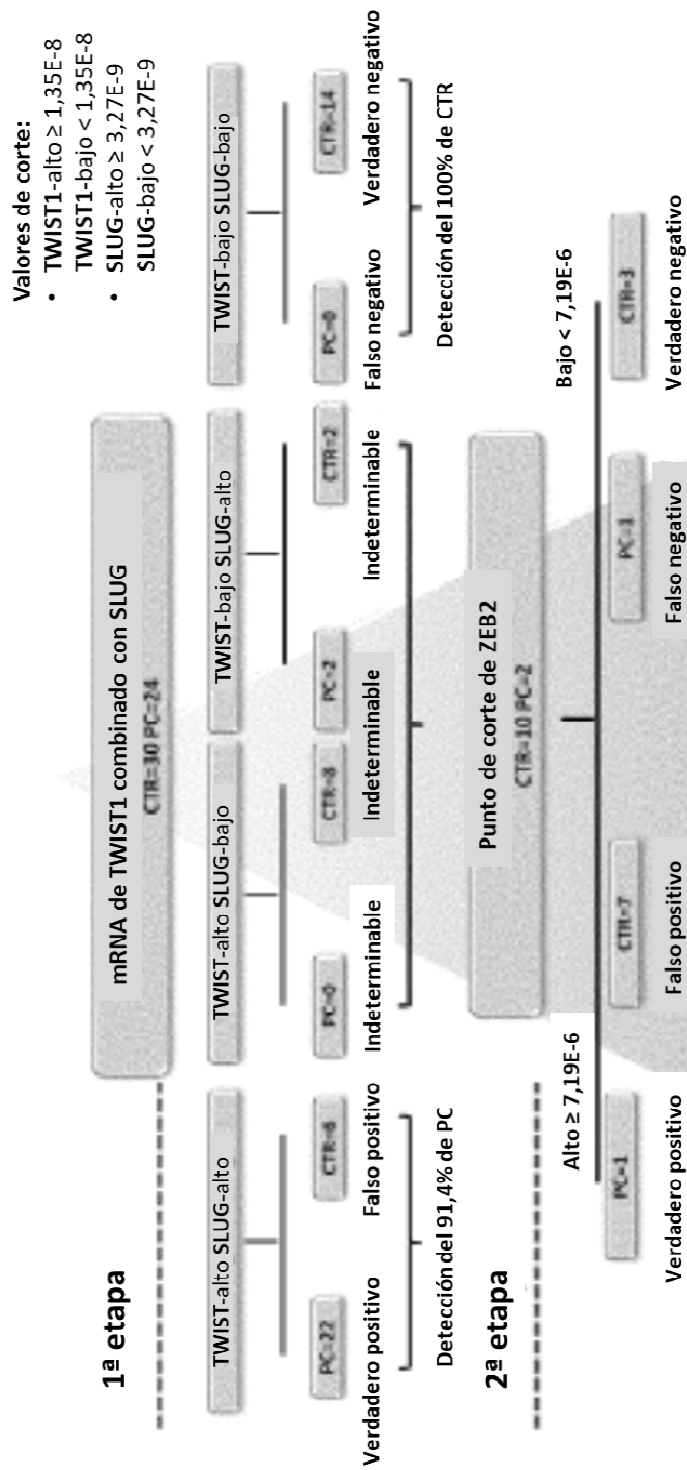


Fig. 11

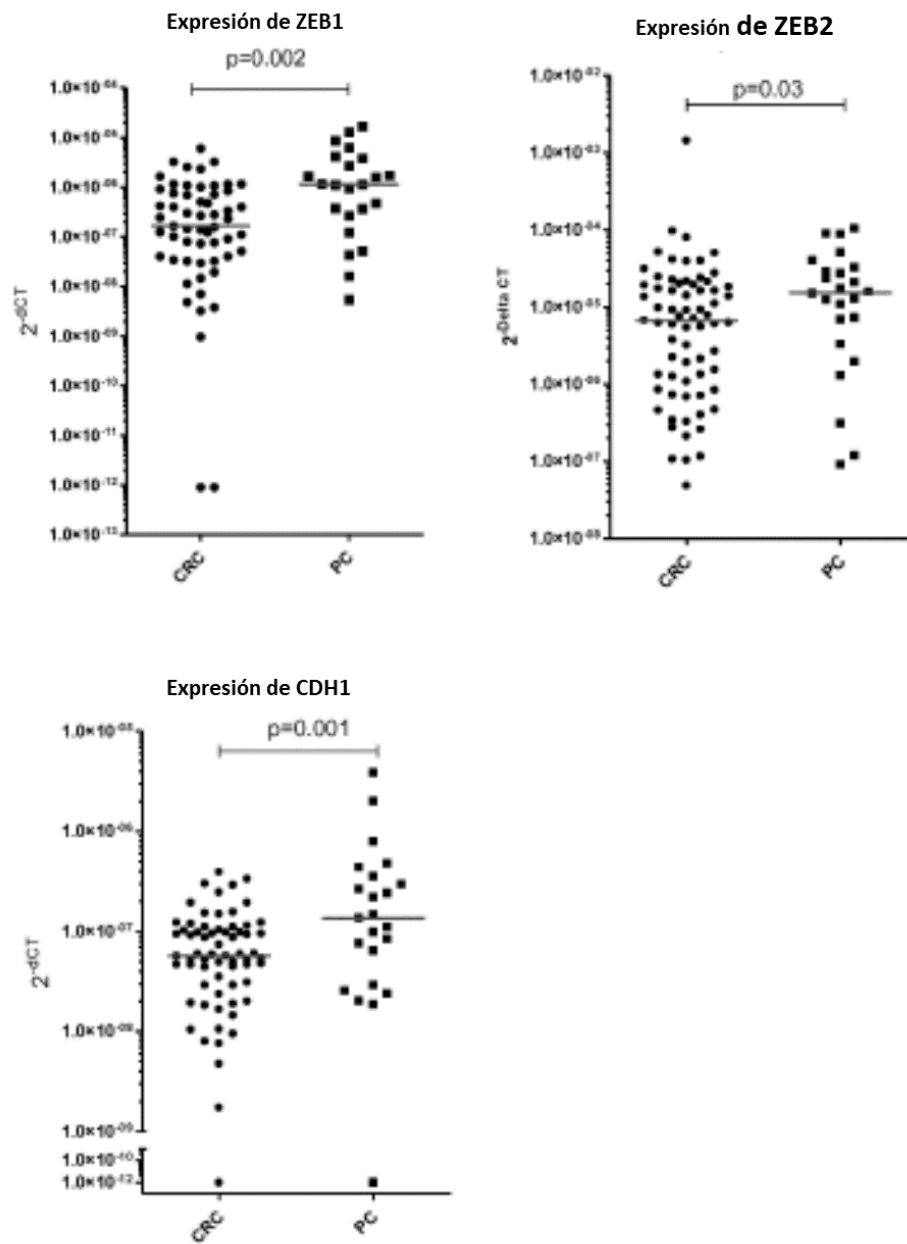


Fig. 12