



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 299 697**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G06F 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03722673 .5**
86 Fecha de presentación : **25.02.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1478780**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.2004**

54 Título: **Procedimiento de detección *in vitro* de cánceres mediante la verificación de desequilibrios alélicos de marcadores de inserción-delección.**

30 Prioridad: **25.02.2002 FR 02 02380**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

73 Titular/es:
ASSISTANCE PUBLIQUE, HOPITAUX DE PARIS
3, avenue Victoria
75004 Paris, FR

72 Inventor/es: **Grandchamp, Bernard y**
Mentre, France

74 Agente: **Esteban Pérez-Serrano, María Isabel**

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

Procedimiento de detección *in vitro* de cánceres mediante la verificación de desequilibrios alélicos de marcadores de inserción-delección.

La presente invención se refiere al campo médico, e interesa en particular a las unidades y servicios hospitalarios clínicos de cancerología así como a laboratorios de análisis médicos. La invención se refiere en efecto al diagnóstico no invasivo y/o al pronóstico y/o al seguimiento de la eficacia de un tratamiento anti-canceroso.

Para este fin, la invención emplea técnicas de biología molecular para el análisis *in vitro* de extracciones biológicas, asociadas a un método estadístico de tratamiento de los datos obtenidos de dicho análisis, permitiendo esta combinación de la biología molecular y la estadística descubrir anomalías genéticas presentes en los tumores de pacientes que padecen cáncer.

De este modo, la invención se refiere a un procedimiento de detección de células tumorales contenidas en una extracción biológica mediante la verificación de desequilibrios alélicos de marcadores cromosómicos de inserción-delección, refiriéndose dicho procedimiento a la amplificación múltiple de dichos marcadores mediante una reacción en una cadena termodependiente, al cálculo de un valor estadístico global, en el conjunto de los marcadores estudiados y a la comparación de dicho valor con respecto al umbral de normalidad fijado.

Desde un punto de vista epidemiológico, los tumores de vejiga (TV) representan una afección muy frecuente. Los TV figuran particularmente en la quinta posición de los cánceres más frecuentes en occidente, donde son responsables del 3% de todas las muertes vinculadas al cáncer. En los Estados Unidos, los TV representan respectivamente el cuarto y octavo cáncer más frecuente en el hombre y en la mujer, con 53000 nuevos casos al año y una mortalidad estimada en 12000 casos por año (1, 2). En Francia, como en todos los países industrializados, la incidencia de los TV está actualmente en aumento. De este modo, ha pasado de 13 a 17,4/100.000 por año entre 1980 y 1994 (3). En 1990, el número de muertes en Francia imputadas a los TV era de aproximadamente 7/100.000 habitantes, es decir el 5% de todas las muertes por cáncer.

Histológicamente, los TV corresponden, para un 95% de ellos, a carcinomas de células transicionales. En Francia, los carcinomas epidermoides así como adenocarcinomas siguen siendo raros.

La clasificación de la UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer) ha definido diferentes estadios de invasión de la pared de la vejiga, así como diversos grados citológicos. Esta clasificación se encuentra resumida en las siguientes tablas I y II.

TABLA I

	Estadio histológico						
	Carcinoma <i>in situ</i>	pTa	pT1	pT2	pT3a	pT3b	pT4/b
Invasión							
Urotelio	+	+	+	+	+	+	+
Corion	-	-	+	+	+	+	+
Músculo superficial	-	-	-	+	+	+	+
Músculo profundo	-	-	-	-	+	+	+
Grasa perivesical	-	-	-	-	-	+	+
Órganos próximos	-	-	-	-	-	-	+

TABLA II

Grado histológico	Atipias nucleares	Actividad mitótica	Diferenciación
G1	+	+	Célula bien diferenciada
G2	++	++	Célula medianamente diferenciada
G3	+++	+++	Célula poco diferenciada

Desde un punto de vista sintomático, la hematuria y los signos funcionales urinarios irritantes (polaquiuria, imperiosidades miccionales y fugas imperiosidad) representan la parte esencial de las manifestaciones clínicas de los TV. Se observa más raramente complicaciones vinculadas a la lesión (obstrucciones del uréter, fenómenos de compresión de la pelvis) o bien a su diseminación (metástasis a distancia).

En el momento del diagnóstico inicial, aproximadamente del 70 al 80% de los tumores se clasifican como superficiales (es decir, que no invaden el músculo de la vejiga) y del 20 al 30% invasivos. Entre estos últimos, más de la mitad presentan desde el primer diagnóstico una invasión ganglionar o sistémica.

Después de la resección trans-uretral opcionalmente asociada a un tratamiento adyuvante (inmunoterapia o quimioterapia endovesical), la historia natural de las lesiones superficiales está marcada por dos riesgos principales, que son la recidiva y la progresión.

Parece por lo tanto necesario, a la luz de su importancia tanto en términos epidemiológicos como evolutivos, realizar una observación médica con vigilancia de los TV superficiales.

Esta observación puede realizarse mediante diferentes métodos, los cuales se muestran más o menos adecuados en función del caso. A veces son insuficientes por sí solos, y solamente son útiles combinados y presentan en cualquier caso, cierto número de ventajas e inconvenientes que se recuerdan en resumen a continuación.

El examen clínico, aunque rara vez contributivo, se refiere a la búsqueda de la aparición de hematurias (macroscópicas o microscópicas detectadas gracias a bandas urinarias) y la aparición de problemas de irritación en la micción (polaquiuria, imperiosidad). Finalmente, los tactos pelvianos permiten descubrir una infiltración en la base de la vejiga, signo del carácter infiltrante de un tumor.

La cistoscopia se realiza con ayuda de un cistoscopio rígido o un fibroscopio flexible. Este examen, en algunos casos, es invasivo y a veces se tolera mal y puede ser fuente de complicaciones (estenosis de la uretra, infecciones urinarias). Además, la cistoscopia no permite siempre una buena exploración de la cara anterior de la vejiga, ni de las regiones intradiverticulares.

El citodiagnóstico urinario tiene la doble ventaja de ser a la vez sencillo y uno invasivo. Su sensibilidad global, es decir su capacidad para descubrir la anomalía mientras tiene lugar, sigue siendo sin embargo reducida (entre el 40 y 60%) (4, 5). En efecto, esta sensibilidad depende en gran medida del médico que realiza el examen dado que una parte de la subjetividad interviene ineludiblemente en la interpretación final. Además, la sensibilidad y la especificidad del citodiagnóstico urinario varían considerablemente de acuerdo con el grado del tumor, representando la especificidad en este caso la actitud del método para concluir con toda la razón en la ausencia de anomalías. De este modo, en el caso de lesiones de alto grado (G3, tabla II, anteriormente), la sensibilidad se evalúa en el 90% y la especificidad en el 98% (6). Por el contrario, la sensibilidad cae entre un 11 y un 25% cuando se trata de tumores de bajo grado (G1, *ibid.*) (6).

Otro método de observación de los TV consiste en dosificar la Nuclear Matrix Protein 22 (proteína 22 de la matriz nuclear, NMP22). Esta proteína juega un papel en la organización del haz mitótico. En esencia se dosifica en la orina gracias a un ensayo inmuno-enzimático cuantitativo. En función de los límites de positividad seleccionados, la sensibilidad se vuelve muy variable (7). Sin embargo, la mayor parte de los estudios encuentran sensibilidades y especificidades del 60 al 70% (8). La ventaja de este ensayo reside en el hecho de que su sensibilidad no depende del grado tumoral.

El "ensayo BTA TRAK" utiliza anticuerpos monoclonales dirigidos contra el factor H del complemento humano, cuya tasa urinaria se correlaciona con la presencia de TV. Se trata de un ensayo cuantitativo, cuya sensibilidad oscila entre el 62 y 77% y permanece fuertemente vinculada al grado (G1: 48%; G2: 59% y G3: 88%) (8, 9). Por el contrario, su especificidad es más reducida: entre el 48 y el 65% según los estudios. Esto se debe a que el ensayo reacciona no

solamente en caso de lesiones tumorales, sino también con el factor H sanguíneo en caso de hematurias. Por lo tanto, todas las circunstancias que pueden acarrear una hematuria pueden ser fuentes de falsos positivos (8).

El ácido hialurónico (HA) es un glicosaminoglicano degradado por la hialuronidasa (HAasa) en pequeños fragmentos implicados en la adhesión celular y la angiogénesis. En el ámbito del ensayo HA-HAasa, los índices de estos dos elementos se dosifican en la orina de acuerdo con una técnica de ELISA. Se han presentado una sensibilidad del orden del 90% (independientemente de los grados y estadios tumorales) y una especificidad del 84% (8, 10).

El “inmunocyt” consiste en un método que combina citología urinaria convencional y ensayo de inmunofluorescencia, utilizando dicho ensayo tres anticuerpos monoclonales dirigidos contra dos mucinas y una forma de la enzima de conversión de la angiotensina (ECA). La sensibilidad de este método combinatorio es del 90% (independientemente del grado tumoral) y su especificidad del 98% en controles sanos. Por el contrario, la especificidad cae considerablemente en pacientes portadores de afecciones urológicas benignas: 85% en caso de microhematuria, 60% en caso de cistitis y 50% en caso de adenoma prostático (8, 11).

Inicialmente explorado para la verificación de la actividad telomérica *in vitro* (kit PCR-ELISA), las últimas versiones del método de dosificación de dicha actividad se basan en la cuantificación de ARN mensajeros (ARNm) que codifican la telomerasa mediante RT-PCR (transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa). La sensibilidad de esta técnica varía entre el 0 y el 83%; su especificidad es del orden del 70% (12, 13). La especificidad sin embargo puede caer en caso de procesos inflamatorios que se produzcan a nivel del aparato urinario (expresión de la telomerasa por linfocitos activos). Por otro lado, la existencia de una hematuria macroscópica puede acarrear la detección de falsos negativos. Finalmente, la técnica de RT-PCR precisa un tratamiento cuasi-extemporáneo de la orina (12).

Conviene observar que actualmente están en proceso de desarrollo numerosos marcadores diferentes útiles para la detección de TV (citoqueratina 20, variantes de CD44, NMP de tipo BLCA-4, uroplaquina, etc.).

Sin embargo, hasta el momento, ningún método de observación y detección de los TV se distingue verdaderamente por sus “rendimientos”, en términos de sensibilidad y especificidad.

En dicho contexto, la búsqueda de anomalías genéticas que permita una detección a la vez fiable y no invasiva de dichos TV representa una apuesta importante.

Los tumores se forman mediante acumulación de mutaciones genéticas que alteran la función de genes específicos, es decir oncogenes y genes supresores de tumores. Esta acumulación puede acelerarse mediante una gran inestabilidad cromosómica, que se traduce por la pérdida de uno o varios cromosomas completos o de parte(s) de un solo cromosoma, incluso la duplicación de un cromosoma o también una disomía uniparental (es decir, la pérdida de un cromosoma y después la duplicación del cromosoma restante).

La comparación, en un individuo dado, del ácido nucleico obtenido de tejido normal (por ejemplo, ADN leucocitario) y del tejido tumoral, puede permitir la detección de una modificación o pérdida de material cromosómico y, del mismo modo, revelar un proceso tumoral.

Un individuo heterocigoto para un marcador cromosómico polimorfo presenta una copia de cada alelo de dicho marcador. La proporción teórica entre estos dos alelos es de 1 (es decir 1/1).

Algunas anomalías genéticas pueden modificar esta proporción. Por definición, los “desequilibrios alélicos” (DA) representan cualquier modificación de la proporción entre las copias alélicas de un marcador.

Las anomalías genéticas pueden ser de varias naturalezas. Puede tratarse de: (i) un aumento de la cantidad de cromosomas (por ejemplo, una trisomía que hace pasar la proporción de 1/1 a 2/1); (ii) una delección más o menos extensa de la región cromosómica que contiene el alelo; (iii) una monosomía (paso de la proporción de 1/1 a 1/0); o una disomía uniparental adquirida (paso de la proporción de 1/1 a 2/0).

Los microsatélites son secuencias cortas de ADN constituidas por mono-, di-, tri- o tetranucleótidos, estando dichas secuencias repetidas N veces (N que varía entre 10 y 60). Aproximadamente 100.000 secuencias microsatélites estarían distribuidas de forma aleatoria y homogénea en el genoma humano (14). Estas secuencias se sitúan generalmente en regiones no codificantes, aunque también pueden estar presentes en intrones o incluso en exones de los genes.

Los microsatélites se caracterizan por una gran estabilidad individual, estabilidad tal que cada uno posee una distribución alélica de microsatélites que le es propia. A pesar de esta estabilidad en la escala del individuo, los microsatélites son altamente polimorfos entre varios individuos. A este respecto, dichos microsatélites son multialélicos, pudiendo existir un gran número de alelos diferentes, en función de la cantidad de repeticiones. Además, su índice de heterocigosis varía entre el 70 y el 95%.

En particular, tratándose de TV, se encuentra un repertorio en la bibliografía de gran cantidad de casos de anomalías genéticas, identificadas en el origen de DA.

De este modo, se han detectado DA en TV con ayuda de marcadores microsatélites desde 1994 (15). Estos marcadores se han propuesto como examen con intención de diagnóstico a partir de 1996 (16). Desde entonces, varios equipos han presentado resultados obtenidos del diagnóstico (17, 18; 19) o del seguimiento (20) de TV por medio de marcadores microsatélites.

En estos estudios, la sensibilidad se encontraban entre el 84 y el 91% y las especificidades entre el 85 y el 100% y esto, utilizando entre 10 y 20 marcadores microsatélites.

Sin embargo, la utilización de este tipo de marcadores con fines de detección de DA presenta dos inconvenientes principales.

Por un lado, desde el punto de vista técnico, es muy difícil e incluso imposible, co-amplificar en una misma reacción varias secuencias microsatélites de modo que cada una fuera representativa de un marcador dado. En efecto, como se ha indicado anteriormente, las secuencias microsatélites se repiten de forma idéntica una gran cantidad de veces y pueden ser comunes a diferentes marcadores. Esto hace técnicamente difícil o incluso imposible, la amplificación simultánea durante una misma reacción de PCR de varios de estos marcadores. En efecto, los cebadores no pueden en la práctica diseñarse para amplificar más que una copia de una secuencia microsatélite, sin que se amplifiquen simultáneamente otras copias repetidas en el mismo marcador, así como copias de esta misma secuencia que pertenecen a otros marcadores. Como consecuencia, cada marcador microsatélite debe amplificarse individualmente. En la medida en que, para un individuo dado, deben estudiarse al menos una decena de marcadores microsatélites, el recurso de estos ensayos que utilizan dichos marcadores no solamente es costoso en tiempo y en reactivos, sino que también consume grandes cantidades de ADN, lo que puede representar una limitación suplementaria que se opone a una realización rutinaria.

Por otro lado, el principio de estos ensayos se basa en la detección de una modificación de la proporción de superficie de las señales que corresponde a los productos de amplificación de dos alelos de un microsatélite (Figura 1A). En resumen, el ADN se amplifica y se mide la proporción de superficie de las señales, tratándose de la extracción biológica a analizar, por ejemplo de origen urinario cuando se trata de TV y una extracción de referencia, sanguínea por ejemplo. Para concluir en la existencia de un DA, conviene detectar una diferencia significativa entre las proporciones de superficie de señales relativas a las dos extracciones. Para conseguir esto, es preciso llegado el caso, que la diferencia observada pueda imputarse a fluctuaciones experimentales y, en todos los demás casos, que pueda interpretarse con toda la razón como un reflejo de la presencia o ausencia de DA. En esencia, tratándose de microsatélites, el investigador no puede controlar los sesgos de amplificación fuentes de interpretaciones erróneas, conduciendo la propia extracción de referencia a una proporción diferente de 1 (1/1) para un individuo heterocigoto. Además, las proporciones en cuestión varían de un individuo a otro, en la medida en que, como se ha indicado anteriormente, cada individuo posee dos alelos particulares de un microsatélite, entre un gran número posible. Asimismo los límites de significación, solamente pueden tener un sentido verdadero para un único individuo. Estos los selecciona particularmente de forma empírica el investigador, como demuestran las diferencias observadas en la bibliografía, según los autores.

Schneider *et al* (Cancer Research (2000) 60: 4617-4622) describen un procedimiento de detección de células tumorales contenidas en una extracción biológica mediante la detección de desequilibrios alélicos de marcadores microsatélites que comprenden la amplificación de los marcadores mediante PCR cuantitativa, el cálculo de la proporción R de altura de los picos que corresponden a los dos alelos de cada marcador, la comparación de la proporción R (Ub/Ua) con una proporción Rf (Bb/Ba) obtenida a partir de una muestra de referencia para determinar la intensidad del desequilibrio alélico y la comparación del valor de intensidad del desequilibrio alélico obtenido con un intervalo de normalidad.

Para obviar estos principales inconvenientes, al mismo tiempo en términos de viabilidad y de interpretación de los resultados, la presente invención utiliza, con fines de verificación de los DA, marcadores diferentes a los microsatélites habituales, que son marcadores polimorfos bialélicos de inserción-delección o SIDP para "Short Insertion Deletion Polymorphism".

Los SIDP se caracterizan por la presencia o ausencia de varios nucleótidos. Si se toma por ejemplo la siguiente secuencia: ...ATTTGCGCTAAGCTAGCTATTAT..., ésta corresponde a un SIDP si puede contener una o dos copias de la secuencia corta GCTA.

Los SIDP son, por definición bialélicos, ya que existen solamente dos alelos diferentes de un mismo marcador. Por consiguiente, el individuo puede ser homocigoto para uno de los dos alelos o heterocigoto, poseyendo entonces los dos alelos diferentes posibles (Figura 1B).

El índice de heterocigosis de los SIDP es más reducido que el de los microsatélites. En particular, este índice es del orden del 40% para los marcadores que han servido para el estudio de los TV (ejemplos a continuación).

Los SIDP se han identificado y clasificado por el equipo de Doctor Weber en el "Center for Medical Genetics" de Marshfield (Wisconsin). Las secuencias de los SIDP están disponibles en el sitio web: <http://research.marshfieldclinic.org>.

La invención consiste por lo tanto en un nuevo ensayo de detección de tumores, particularmente de tumores de vejiga, basándose dicho ensayo en la verificación de DA en células contenidas en una extracción biológica, urinaria, por ejemplo, con ayuda de marcadores bialélicos de tipo SIDP.

De este modo, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de células tumorales contenidas en una extracción biológica mediante la detección de desequilibrios alélicos de al menos quince y preferiblemente treinta marcadores cromosómicos bialélicos se inserción-delección, comprendiendo dicho procedimiento al menos las siguientes etapas:

a) amplificación cuantitativa múltiplex de dichos marcadores;

b) el cálculo de la proporción R de altura de los dos picos correspondientes a la señales de amplificación obtenidos para los dos alelos de cada marcador;

c) el cálculo de un valor estadístico global, relativo al conjunto de dichos marcadores, que se distribuye de acuerdo con la ley de chi-dos cuyo número de grados de libertad es igual al número de marcadores ensayados, calculándose dicho valor global de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Valor} = \sum d_i^2 = \sum \{ [\text{LnR}_i - m(\text{LnR}_f)] \div s(\text{LnR}_f) \}^2,$$

en la que:

d_i representa una distancia estadística, calculada para una marcador i ;

R_i representa, para cada marcador, la proporción de altura de los dos picos calculada a partir de la extracción biológica;

R_f representa, para cada marcador, la proporción de altura de los dos picos calculada a partir de una muestra de referencia;

$m(\text{LnR}_f)$ corresponde a la media de los valores de LnR_f ; y

$s(\text{LnR}_f)$ corresponde a la desviación típica de los valores de LnR_f ; y

d) la comparación de dicho valor con respecto al umbral de normalidad fijado, más allá del cual la extracción biológica se considera como patológica, correspondiendo dicho umbral de normalidad al valor de chi-dos para un valor seleccionado del riesgo de primera especie α y al número de marcadores ensayados.

De acuerdo con la invención los términos “procedimiento”, “método” y “ensayo” son equivalentes.

En la presente invención, la “detección” de las células se prefiere a partir de la verificación de dichas células. Dicha “detección” es útil para el diagnóstico no invasivo de tumores y/o para el pronóstico después de la identificación de tumores y/o en el seguimiento de un tratamiento anticanceroso.

Los términos “cáncer” y “tumor” son, de acuerdo con la utilización médica, equivalentes.

De acuerdo con la acepción habitual en el campo médico, una “extracción biológica” o una “muestra biológica” o también una “muestra” representa cualquier elemento extraído de un cuerpo vivo, en particular del cuerpo humano, tal como sangre, biopsias, orina, saliva, conteniendo dicho elemento células y siendo útil particularmente para fines de diagnóstico.

Se entiende por “marcador” una secuencia particular de ácido nucleico, que permite una detección y un seguimiento completamente específicos de los DA en una muestra que contiene células. Dicho marcador puede compararse con un “rastreador” de DA en las células. Para conseguir esto, es preciso también que el marcador sea informativo, es decir, que presente un índice de heterocigosis tan elevado como sea posible, esto para proporcionar un elemento de comparación que pueda explotarse, por ejemplo en términos de diferencia entre las señales que representan los productos de amplificación de dos alelos de dicho marcador (Figura 1B).

En referencia a la etapa a) del procedimiento de detección mencionado anteriormente, el término “amplificación” tiene un sentido genérico, ya que engloba cualquier técnica de biológica molecular cuyo principio consista en amplificar o multiplicar una secuencia de ácido nucleico diana. Pueden mencionarse como ejemplos no limitantes, PCR, amplificación mediada por transcripción (Transcription-Mediated Amplification; TMA), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (Nucleic Acid Sequence Based Amplification; NASBA), auto-replicación de secuencias (Self-Sustained Sequence Replication; 3SR), amplificación mediante desplazamiento de cadena (Strand Displacement Amplification; SDA) y la reacción en cadena de la ligasa (Ligase Chain Reaction; LCR).

Las reacciones de amplificación previstas de este modo pueden ser isotermas o pueden necesitar la exposición cíclica a diferentes temperaturas. De acuerdo con esta última configuración, se habla ventajosamente de la reacción de amplificación “termodependiente”, aunque este último término puede omitirse a veces, en cuyo caso directamente el especialista en la técnica lo deduce claramente y sin ambigüedad de contexto.

Según el vocabulario habitual en materia de PCR, la secuencia de ácido nucleico a amplificar se denominan “dianas” o “matrices”. En el contexto particular de la presente invención, dichas secuencias corresponden a marcadores tales como se han definido anteriormente y más particularmente marcadores cromosómicos.

El análisis realizado de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención es “cuantitativo”, ya que permite la cuantificación de los productos de amplificación que corresponden a dos alelos de un mismo marcador y proporcionan de la misma manera la base del cálculo de la proporción de altura de los picos relativos a dichos alelos [etapa b) del procedimiento], así como el elemento a comparar de acuerdo con la etapa c) de dicho procedimiento. Por ejemplo, uno de los cebadores de cada uno de los pares utilizados durante la etapa a) puede marcarse con ayuda de un fluorocromo.

La etapa a) del procedimiento objeto de la invención se refiere a reacciones de amplificación “múltiplex” en la medida en que se desarrolla no una reacción de amplificación con ayuda de un único par de cebadores, sino varias reacciones concomitantes de amplificación, preferiblemente 3, de varias secuencias diana diferentes, presentes en la misma muestra, empleando dichas reacciones varios pares de cebadores diferentes, de al menos diez y preferiblemente al menos quince pares de cebadores.

De este modo, de acuerdo con el procedimiento objeto de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico diana se amplifica con ayuda de pares de cebadores nucleotídicos específicos, representando la expresión “cebador específico” en esencia una secuencia de nucleótidos útil como cebador para la amplificación y capaz de hibridar en condiciones rigurosas con al menos el 80% de las secuencias de ácido nucleico diana. Las “condiciones rigurosas de hibridación” se ajustan a la definición convencional y las conoce el especialista en la técnica (21).

Los términos y expresiones “cebadores”, “cebadores para amplificación” y “cebadores nucleotídicos” son equivalentes en la invención. Se entiende que los cebadores son necesariamente específicos, incluso si esto no se especifica de forma explícita en el texto.

El cálculo de la proporción R, tal como aparece en la etapa b) del procedimiento, consiste en una proporción sencilla, accesible para el especialista en la técnica desde que se encuentra en posesión de un rastro, tal como se ilustra en las Figuras 1B y 3 y proporcionada por un secuenciador automático de ácidos nucleicos.

En este caso, un analizador de secuencias o secuenciador automático del tipo ABI PRISM® (Perkin-Elmer, Wellesley, MA), determina una curva indicando en abscisas la longitud en bases del producto de amplificación y en ordenadas la intensidad de la fluorescencia emitida por el fluorocromo. El tamaño de los productos por un lado y el tipo de fluorocromo asociado a dichos productos por el otro, permiten la identificación de las señales relativas a los diferentes marcadores coamplificados.

Como se ilustra en la Figura 3, las señales o curvas obtenidas de este modo se presentan en forma de picos más o menos altos.

En caso de homocigosis, se observa un único pico. Por el contrario, en caso de heterocigosis, dos picos correspondientes a dos alelos presentes se separan por una distancia proporcional al tamaño del polimorfismo (es decir, el tamaño de la secuencia que separa las dos copias repetidas).

De acuerdo con una realización ventajosa del procedimiento de detección objeto de la presente invención, para una extracción biológica a ensayar, la etapa a) de amplificación por PCR múltiplex se realiza por partida doble; y, durante la etapa b), no es la proporción R la que se calcula, sino la media de las dos proporciones, correspondiendo cada una de estas proporciones a una reacción de amplificación.

En la etapa c) del procedimiento de acuerdo con la invención, se hace referencia a un “valor estadístico global”. Dicho valor representa una entidad estadística normalizada, que permite establecer un umbral de significación (o umbral de normalidad o también umbral de confianza) no empírico, fijo y válido para todos los individuos estudiados. De este modo, es posible concluir la normalidad o anormalidad de una muestra en el conjunto de las proporciones R_i calculadas para cada individuo y esto basándose en criterios fijos, objetivos e independientes del individuo en cuestión. La “globalización” o suma de las proporciones R_i en todos los marcadores ensayados para el individuo dado, viene dictada por el hecho de que todos los individuos no poseen los mismos marcadores informativos, ni el mismo número. Ahora bien, en el marco de la invención, este inconveniente se encuentra precisamente atenuado por la cuantificación de un DA global, que corresponde al individuo y ya no a un marcador.

En esta etapa, la “proporción de referencia R_i ” de la que es cuestión para el cálculo del “valor estadístico global” corresponde a una media de proporciones de alturas de los picos relativos a los dos alelos de un marcador, obteniéndose dichas proporciones a partir de al menos veinte y preferiblemente al menos treinta muestras de referencia que contienen ADN sano. Estas muestras de referencia pueden proceder de diferentes individuos, la única condición que deben cumplir es que representen muestras sanas.

ES 2 299 697 T3

Las “muestras de referencia” o “extracciones de referencia”, son extracciones biológicas seleccionadas cuidadosamente como capaces de servir de control y que representan un fluido biológico o un tejido sano para las anomalías genéticas buscadas. De este modo, tratándose de la detección de TV, la “extracción biológica” a ensayar es de origen urinario, mientras que las “muestras de referencia” consisten, por ejemplo, en muestras de sangre.

Se distingue así la “extracción biológica” a analizar, que puede contener células tumorales de las “muestras de referencia”, que sirven como controles de normalidad, es decir, que comprenden células sanas, sin anomalías genéticas características de los tumores buscados.

El “valor estadístico global” se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Valor} = \sum d_i^2 = \sum \{ [\text{Ln}R_i - m(\text{Ln}R_f)] \div s(\text{Ln}R_f) \}^2,$$

en la que:

d_i representa una distancia estadística, calculada para un marcador i ;

R_i representa, para cada marcador, la proporción de altura de los dos picos calculada a partir de la extracción biológica;

R_f representa, para cada marcador, la proporción de altura de los dos picos calculada a partir de una muestra de referencia;

$m(\text{Ln}R_f)$ corresponde a la media de los valores de $\text{Ln}R_f$; y

$s(\text{Ln}R_f)$ corresponde a la desviación típica de los valores de $\text{Ln}R_f$.

De acuerdo con esta fórmula, la proporción R_i de altura de los dos picos correspondientes a los dos alelos del marcador i se calcula a partir del ácido nucleico contenido en la extracción biológica y se compara con la media de las proporciones de referencia R_f que corresponden a las muestras de referencia.

Se entiende que las etapas a) y b) del procedimiento de detección se realizan a la vez para la extracción biológica y las muestras de referencia, para poder establecer una comparación, de acuerdo con la etapa c) de dicho procedimiento.

Para hacer a la representación de las proporciones R_i y R_f simétrica con respecto a 1 (proporción ideal 1/1 para un individuo heterocigoto sano), en el sentido en el que es indiferente que la altura del primer pico se divida por la del segundo pico o a la inversa, en la medida en que la entidad representada en los dos casos corresponde a una misma desviación con respecto a 1 (por ejemplo, las proporciones 1/2 y 2/1 representan una misma desviación con respecto a 1/1), las variables estudiadas se han transformado en su logaritmo neperiano.

Esta transformación ha permitido verificar dichas variables que siguen una ley normal, bien conocida por los estadísticos.

Una curva que ilustra la ley normal, llamada curva “de Gauss” o curva “de campana” se proporciona en la Figura 2 a continuación.

Las medias y desviaciones típicas características de la ley normal verificada por la variable $\text{Ln}R_f$ pueden calcularse de este modo. Dichas medias y desviaciones típicas son valores estimados a partir de resultados experimentales. Asimismo estos valores se representan respectivamente por letras latinas m y s , y no por las letras μ y σ , unidas a los valores teóricos de estas mismas entidades estadísticas.

El principio del cálculo del valor global se basa en distancias individuales para cada marcador y en la suma de los cuadrados de éstas.

Una “distancia” d corresponde, de acuerdo con la fórmula anterior y de acuerdo con el lenguaje estadístico habitual, a una desviación de la media. En esencia, la distancia d_i representa la desviación entre $\text{Ln}R_i$ y $m(\text{Ln}R_f)$. Como diferencia de las leyes normales, ella misma obedece a una ley normal. Dicha distancia es mayor cuanto: (i) están presentes anomalías genéticas en la extracción biológica; y (ii) la proporción entre el número de células tumorales y células sanas es mayor. Para estandarizar la distancia obtenida de este modo, ésta se compara con la dispersión de las mediciones de referencia para cada marcador, es decir la desviación típica $s(\text{Ln}R_f)$.

El valor global $\sum d_i^2$, dado por la fórmula anterior, en que se representa la suma de los cuadrados de una ley normal, se distribuye de acuerdo con la ley de chi-dos con N grados de libertad, en la que N representa el número total de marcadores informativos independientemente ensayados. Con respecto a los usos en el campo estadístico, se considera que las denominaciones “chi-dos”, “chi-cuadrado” y “ χ^2 ” son equivalentes.

En definitiva, por medio de la ley chi-dos puede fijarse un límite o umbral no empírico de significación o de normalidad.

Con este fin, en un primer momento, se selecciona el riesgo de primera especie α para determinar la especificidad esperada del procedimiento de detección de acuerdo con la invención. En este documento se entiende por "especificidad", la probabilidad de que el ensayo sea negativo si los individuos están sanos siendo idealmente dicha probabilidad igual a 1.

Después, la distribución de chi-dos para este valor seleccionado entre α y N grados de libertad, proporciona un valor límite $\Sigma d_{\max}^2$, más allá del cual puede concluirse, con todo rigor y objetividad, que la extracción biológica estudiada es patológica, ya que contiene efectivamente células tumorales.

De acuerdo con otra realización, el procedimiento de detección objeto de la presente invención comprende al menos las siguientes etapas:

a) amplificación cuantitativa múltiplex de dichos marcadores;

b) cálculo de la proporción R de altura de los dos picos correspondientes a las señales de amplificación obtenidas para los dos alelos de cada marcador;

e) cálculo de una distancia individual d_i para cada marcador i de acuerdo con la fórmula:

$$d_i = [\text{Ln}R_i - m(\text{Ln}R_f)] \div s(\text{Ln}R_f),$$

en la que:

R_i representa, para cada marcador, la proporción de altura de los dos picos calculada a partir de la extracción biológica;

R_f representa, para cada marcador, la proporción de altura de los dos picos calculada a partir de una muestra de referencia;

$m(\text{Ln}R_f)$ corresponde a la media de los valores de $\text{Ln}R_f$; y

$s(\text{Ln}R_f)$ corresponde a la desviación típica de los valores de $\text{Ln}R_f$; y

f) comparación del valor de la distancia d_i con respecto al intervalo de confianza de nivel $(1-\alpha)$ correspondiente al error de primera especie α seleccionada.

Con el fin de realizar la comparación de acuerdo con la etapa f) del procedimiento anterior, se asigna un valor al riesgo de primera especie α , que permite definir un intervalo de normalidad o de confianza para el valor de $\text{Ln}R_i$, de aproximadamente α . En efecto, este intervalo corresponde a $(1-\alpha)$; y por lo tanto se define con un error de aproximadamente α . Por ejemplo, el intervalo de normalidad puede ser igual a:

$$m(\text{Ln}R_f) \pm [3 \times s(\text{Ln}R_f)],$$

en cuyo caso el valor de α es del 0,1%.

De acuerdo con este ejemplo, si se obtiene una distancia individual superior o igual a 3 en valor absoluto ($|d_i| \geq 3$), puede concluirse una anomalía genética del marcador i, con un riesgo de error inferior o igual al 0,1%.

De forma general, el procedimiento de detección de acuerdo con la invención es aplicable a la búsqueda de tumores, mediante la detección de DA en una extracción biológica dada y esto, siempre que se disponga de marcadores bialélicos de inserción-delección informativos y en número suficiente para detectar la mayor variedad posible de anomalías que pueden reencontrarse en las células tumorales cuya presencia se busca.

En particular, dicho procedimiento puede aplicarse a la detección de tumores de vejiga. En este caso, la extracción biológica está constituida por orina y la extracción de referencia por sangre.

En el ámbito de la detección de tumores de vejiga, se hace uso de al menos un marcador seleccionado entre los marcadores que se representan en la tabla III a continuación.

TABLA III

Localización	Marcador
2q	919, 1559
3p	17, 752
4p	1983
4q	642
5q	714, 739, 787
6q	402, 440, 471, 627
8p	12
9p	18, 116, 476, 558, 1410, 1570, 1998, 2065, 2086, 2102
9q	118, 289, 475, 516, 561, 682, 1370, 1384, 1583, 1584, 1654, 1921
10q	390, 671, 686, 1789
11p	1704
11q	1982
13q	22, 562, 894, 1363, 1698, 1792, 1979
14q	1319
16q	792, 1187
17p	273, 663, 1385, 1657, 1770
18q	1697, 1228

En esta tabla, y como se entiende a partir de la descripción detallada a continuación, se entiende por “localización”, el brazo cromosómico que porta el marcador en cuestión.

Los marcadores presentados en la tabla III se han seleccionado entre las secuencias de SIDP accesibles mediante el sitio web <http://research.marshfieldclinic.org/>, no solamente porque abarcan las regiones portadoras de genes de interés, es decir oncogenes y genes supresores de tumores, sino también porque se sitúan al nivel de regiones menos determinadas, y son por lo tanto representativos de la inestabilidad cromosómica global de los TV.

Tratándose de la amplificación de estos marcadores, el procedimiento objeto de la invención emplea preferiblemente al menos un par de cebadores constituido por cebadores específicos para amplificación, cuyas secuencias SEC ID N°: 1 a 134 se describen en la siguiente Tabla IV.

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

Marcador	Secuencia sentido	Sec. ID Nº	Secuencia antisentido	Sec. ID Nº	Tamaño del producto amplificado	Par de cebadores
116	AAGAGGTCTCTGGGCGCTCACACTT	1	AAGTACTGAGCATCAGGACTGTATGGGG	2	169/173	A1
118	CCACAGGTGTGCCCCATACAGACATT	3	CAGGTGAACCTGGGTACGCACACTCA	4	138/140	B1
17	TGTATCAGAGGCAATAATTTCCAAAGCAGA	5	CGATCCCAGACACTGAAGATGAAATAAGTC	6	136/140	C1
18	GGCTGTTGACTGCACTGGGATTTAGA	7	TCATTAACTCTCAGACTGACCTGGGAGC	8	141/144	D1
22	TATGTGTGGCAGTGAAGAGAACAGGCTTTT	9	GGGCTATCTTAAGAAAAATATGAATACTTTGGCT	10	186/192	E1
390	TAATGGTAAACAATAATTTTCAGCCACTTTTGA	11	CGGATGGGTGGGTATATTTTATTTTCCA	12	171/175	F1
402	AAGAGCCTCTGTTTATGTGGATTGTGGC	13	TCCTGGTAAATTGCCATTTTTCATAAAACAA	14	187/191	G1
471	GCTTGCTATCACGGTGATTGGGCAT	15	TGTCAGAAGGGGTTAGTGCTAGTGTTTGA	16	111/114	H1
516	AACTTGCCTGCATTGTACATCATTCCTA	17	GGGGATGTTATTATTCTTGAAGTTGGCG	18	97/100	I1
561	CATTGTGGTTACATTAGGGGAAGGCA	19	CCCCGACAGTTGTGATGTGTTCTGT	20	153/156	J1
562	TGTTTGAGTGCCCTTATAAGTTCTGGTTTCA	21	CAGATGTAGCTTTTAGGCCATTCTTTTTCTTGT	22	192/194	K1
663	ATATGTTCACTGGCTAAACTATGTGTATCCCA	23	CCTGTTTTGTAGAGCCCTCAAGTTAAGAA	24	126/130	L1
671	ACCATGGGAATATGTTAAGAAAATTGGCT	25	CAGAAAACATCTCATTTTTTGACCAGCTACA	26	220/222	M1
682	AAGGTATGAGGAGAGCAGATGCAAAAAAG	27	GCATGACAAAAATCACTGGGTGGTC	28	193/197	N1
686	AATGGAAAAGTATTTGGTGTTTTTTTGAATGTC	29	GCCTGACAAAAGGTGAAACTCAGTTGAAA	30	210/213	O1
714	GAAAAGCTACATCCCAAGTGCTGAAGG	31	ATTTAAGGCCACACAGATTGTGAGGAAAC	32	87/89	P1
752	ACTTTCATAACAAGCCCTTAAACCCGAAAA	33	TGCCCCATTGTACACCACAAAGAATGTTAATA	34	195/197	Q1

Marcador	Secuencia sentido	Sec. ID Nº	Secuencia antisentido	Sec. ID Nº	Tamaño del producto amplificado	Par de cebadores
894	ATTTCTTTTCAATTAAGGCTGGGAGGC	35	GGCCACCTCTGAGGATCTGAGCTTTA	36	136/138	R1
12	ACTTTTATTGGCACAGGCATTG	37	GAGTTGTTTTCTGACCCACTGATCTC	38	129/131	S1
22	TCAAATAAGAGTTGTGCATATCCTGCT	39	TGAATATGTGTGGCAGTGAAGA	40	128/134	T1
116	TGTATGGGGCTGGCTTTAG	41	GCCTCTGAAGAGGTCTCTGG	42	157/161	U1
273	TGTGATCAATTCCAACTGCTG	43	AAGGCTTAAAGGAAATCACGTC	44	143/147	V1
289	TTCTTGAGGCATGAAGCTA	45	CTCAACCCCTTCTCCATAG	46	152/155	W1
390	TTTTCGGATGGTGGGTAT	47	AACAATATTTTCAGCCACTTTTG	48	167/171	X1
402	AGACACCAAAGAGCCCTCTGTTTA	49	CTTCTCACTAAATTATGCTTGGTAAATTG	50	208/212	Y1
440	CAATACCCAGCAAAGGATATGG	51	GCATCTGTACATAGTAAGCCTACCG	52	105/107	Z1
471	CTTTTTCAAATGCTGCTTGC	53	CAGAAAGGGTTAGTGCTAGTGTT	54	122/125	A2
475	GTGCCATTTTGATTCCCAT	55	GGCATTCCAGAACCAAAAG	56	215/218	B2
476	GACCTAAAAATTGCGGTCAATTC	57	GAAAATGCAGGCCCTTTCATCA	58	131/134	C2
516	AGTTGGCGCCAGAAATGA	59	ATACAAGAGTCCAAGGTAGCCAGT	60	140/143	D2
558	GGTAGGCATGTAGAAATACGGTTC	61	CCAGGATAGCATTCAACAGTTTG	62	145/149	E2
561	CCACTCACCTTTCTTGCAATGG	63	CCCGACAGTTGTGATGTGTT	64	122/125	F2
627	TGTGTGTTGCTTTGCTCT	65	CATCCACCGTTAGCTGTT	66	182/187	G2
642	TTGTGCTGCTGCTGTAGTTCAATG	67	GTGATTAAACTTGATTTCTCTGAACA	68	114/116	H2

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

Marcador	Secuencia sentido	Sec. ID Nº	Secuencia antisentido	Sec. ID Nº	Tamaño del producto amplificado	Par de cebadores
714	TCTTAGGAAAAGCTACATCCCAGT	69	TTTAAGGCCACCAGATTGTGA	70	92/94	I2
739	GCTATGTTTCAGAAAATGCATCTCACTC	71	TGATGTGTGACAGCCAATGAA	72	212/216	J2
787	GCTAGATGGTCCTGTGTCATTG	73	GTGATTAATGTGAACCTCCAGTGC	74	137/141	K2
792	TTGCTGTGGCTCTAGGTTGC	75	TCGGCAGTTAATGACAGTGATG	76	176/180	L2
919	GGGGATGACAAATGAATATGATG	77	TGGCATAACACCTTAGCAAAGCA	78	197/200	M2
1187	TCAGAGACAAGGTCGCTGCT	79	TTTCTTCATAGCTACTCCACCCTG	80	141/152	N2
1228	AGCTTCGGAGAATCTATCAAATAGC	81	GAACGGGTAAATGGCAATG	82	204/206	O2
1319	AAACCAGCCAGTTTCCCTGA	83	GTAAGTGGTAGGTAATACGCTGAGA	84	86/99	P2
1363	GCCAAATTACTTTGCCTCTCC	85	ACGGGACAAGTCTGTTTGGT	86	154/158	Q2
1370	CAAAAGATGGAGGCTAATATGTTGA	87	AATAGTCCATTAGCAAATCCTTCA	88	127/129	R2
1384	GCAGCTTCCAACCTGGTTCTT	89	GGCTAACCCAGTGAGTCCAA	90	200/204	S2
1385	CTGCTGCAGATTGAACCAA	91	AACAGCATCGCTTTAGATACTAGG	92	98/116	T2
1410	GCCCTGAGCCTTTCAAATC	93	TGGAACCTCAGTCACACCTAAG	94	86/89	U2
1559	TGTTTCAGGACTGAGCACGA	95	CAGGAGGTGTGGCCAGTTT	96	158/161	V2
1570	ATCCTCCCCACTGAACCTC	97	GCCCCCTCTCTGCTGTTAT	98	219/224	W2
1583	CGGGCGGACAACTAATG	99	CAAACAGGACTGAATGAAAACAACA	100	185/190	X2
1584	AGCCACTTGAATTACCTGGAA	101	TCTTGGGAAATCGCCTCTC	102	104/106	Y2

Marcador	Secuencia sentido	Sec. ID Nº	Secuencia antisentido	Sec. ID Nº	Tamaño del producto amplificado	Par de cebadores
1654	CGTAAATGGAGGTTAAATGGCTTC	103	CTCCGCACTTATGCTGCAA	104	91/95	Z2
1657	CCCGTTTACACCTGCTGAGT	105	CCTGGGAGTCTAGGTAAGATG	106	214/218	A3
1697	AGTGAGCCAAAATGGACTAAGG	107	TAGGGCCTGTCTGACTCCAA	108	223/227	B3
1698	ATTTCCCTCCCAACCCTGT	109	GATCAAAATTGAAGGACATGAGAGA	110	186/188	C3
1704	CTTTCTCTCCCATCTTCACCTTG	111	GCATGCTTAAGGACTGTGAAA	112	221/225	D3
1770	AGAAGAGTGAACGTATTGACATGAG	113	GCTTACGGGTTTTCTCTCCA	114	113/115	E3
1789	GGAATACAGCATACTCAAATAAAGG	115	CCCTGTGCTTAATGTCTGCAA	116	188/191	F3
1792	ATGATGTGGTACCTCTGTCAACC	117	TACTCTTCCAGGCACTGATAGG	118	79/83	G3
1921	ATCACAGCGGTGAAGCAAAG	119	CTTTGGTCAGTAGGGATCCATTT	120	110/114	H3
1979	TGGGTGCTGAAATGTTAATTGAGC	121	GGTGAGTTCCAGCGTTTCT	122	173/177	I3
1982	GATATTAACAAAGTAGCATCAGACACAA	123	TAGTATGCAGTGGCTGTTGAGA	124	142/146	J3
1983	AGTGGCTCCCTGTGCTGA	125	AATGAGCTTCGTTCTTTGGAC	126	99/101	K3
1998	CTCAACATCTGGACGGAGCA	127	AATGGAGTGTGTACTTGTAGAGAGTGA	128	209/213	L3
2065	ACGCCCTGGCCTGAAAAGTATT	129	GTCTGACATCGCCCTCGTAG	130	164/167	M3
2086	AGAAGCAGAATGGGGATGAA	131	GGAGTAATAGATTCTGGCATGTG	132	194/210	N3
2102	TGAACTAAAGGTGGGCAGTG	133	CAATGAAGCATTTGACAACGTC	134	115/119	O3

ES 2 299 697 T3

Los cebadores para amplificación se han seleccionado aplicando el siguiente criterio, llamado de especificidad doble es decir una especificidad de secuencia y de tamaño.

Por un lado, la especificidad de secuencia es tal que: (i) dichos cebadores pueden utilizarse simultáneamente en el ámbito de la amplificación múltiplex de acuerdo con el procedimiento objeto de la invención y esto, sin riesgo de obtener productos de amplificación secundarios no deseados que pueden falsear el análisis; (ii) no son hibridables entre sí, lo que evita la obtención de resultados falsos negativos; (iii) son específicos de secuencias de nucleótidos que son propiamente específicas de marcadores dados.

Por otro lado, la especificidad de tamaño de los productos de amplificación generados permite atribuir sin ambigüedad, por medio de métodos analíticos convencionales conocidos por el especialista en la técnica, tales como electroforesis en gel, cada uno de estos productos al marcador del que se obtiene.

Este carácter de doble especificidad es esencial y viene impuesto por las condiciones de viabilidad técnica del procedimiento objeto de la invención. Razonablemente seleccionados, los cebadores para la amplificación son todos capaces de hibridar de forma específica y selectiva a temperaturas de hibridación cercanas y permiten la obtención de productos de amplificación cuyo tamaño varía dentro de un intervalo relativamente pequeño, por ejemplo entre 80 y 200 pares de bases (pb), esto para facilitar la realización de las siguientes etapas del procedimiento de detección.

De acuerdo con una realización particular, la etapa a) de amplificación cuantitativa múltiplex del procedimiento de detección, de los TV particularmente, comprende al menos las siguientes sub-etapas.

- a1) una etapa de desnaturalización previa a 95°C durante 7 minutos;
 - a2) una etapa de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos;
 - a3) una etapa de hibridación a 61°C durante 30 segundos;
 - a4) una etapa de elongación a 72°C durante 30 segundos;
- constituyendo las etapas a2) a a4) un ciclo, repitiéndose dicho ciclo 35 veces; y
- a5) una etapa de elongación final a 72°C durante 10 minutos.

Estas sub-etapas se realizan preferiblemente, pero no exclusivamente, cuando se utilizan los cebadores para amplificación descritos anteriormente. Dichas sub-etapas pueden aplicarse también durante la amplificación múltiplex de SIDP, por medio de cebadores diferentes de los mencionados en dicha Tabla, siempre que se respeten las exigencias mencionadas anteriormente, en cuanto a temperaturas de hibridación de dichos cebadores particularmente.

La presente invención se ilustra, aunque sin limitación, mediante las siguientes figuras:

- Figura 1: Ejemplo de configuración de los resultados de un ensayo de detección de anomalías genéticas en una muestra biológica de un individuo heterocigoto, después del tratamiento con un analizador de secuencia de ácidos nucleicos, estando dichos ácidos nucleicos marcados con ayuda de un fluorocromo. Las partes rayadas representan las superficies de las señales correspondientes a dos alelos de un marcador.

Figura 1A: caso de los microsatélites.

Figura 1B: caso de los SIDP.

- Figura 2: histograma que representa las variables $\text{Ln}R_f$ para el conjunto de los marcadores bialélicos de inserción-delección estudiados en el marco de la detección de los TV. Es en realidad la variable $\text{Ln}[R_f/m(R_f)]$ la que se representa en este caso, y esto para suprimir los sesgos vinculados a la amplificación por PCR. La distribución de los $\text{Ln}[R_f/m(R_f)]$ obedece a una ley normal.

- Figura 3: ejemplo de rastro proporcionado por el programa GeneScan® 2.1.1 (ABI PRISM®) utilizando el procedimiento de detección de acuerdo con la invención.

Figura 3A: rastro utilizando nueve marcadores SIDP, entre los que cuatro y cinco se han marcado respectivamente con ayuda de los fluorocromos HEX y FAM, así como un patrón de tamaño. El tamaño de los productos de amplificación se encuentra en abscisas y la intensidad de la fluorescencia en ordenadas. En este ejemplo, solamente dos marcadores son heterocigotos y han dado lugar a la detección de dos picos.

Figura 3B: la tabla indica, para cada pico, su duración de migración hasta el marco de lectura, su tamaño en el número de bases, su altura y su superficie.

ES 2 299 697 T3

La invención se entenderá mejor con ayuda de los siguientes ejemplos dados a título ilustrativo. Se entiende que la presente invención no se limita de ninguna manera a dichos ejemplos.

5 Ejemplos

El procedimiento de detección de las anomalías genéticas presentadas por las células tumorales de acuerdo con la invención se ha aplicado para la verificación de los TV.

10 Se ha preferido ensayar regiones cromosómicas frecuentemente descritas en la bibliografía que presentan DA en el origen de TV, esto para disponer de elementos de comparación. De este modo, se han estudiado los siguientes brazos cromosómicos: 9p, 9q, 17p, 10q, 13q, 6q, 3p y 5q.

15 I - Materiales y métodos

I-1 - Pacientes

20 El criterio de inclusión en el estudio era el descubrimiento de un TV en personas que no presentaban antecedentes de cáncer urogenital.

Los controles eran pacientes hospitalizados por diversos motivos de urología (cálculos, incontinencia urinaria, adenoma prostático, etc.).

25 En definitiva, solamente se han excluido pacientes y controles que tenían antecedentes de cáncer urogenital.

De este modo se han conservado 87 pacientes, distribuidos en 24 controles y 63 casos. Las características histológicas de estos casos se resumen en la siguiente Tabla V.

30 TABLA V

	pTA	pT1	pT2-4	Total
G1	9	2	0	11
G2	18	6	3	27
G3	1	16	8	25
Total	28	24	11	63

45 I-2 - Marcadores

Los marcadores eran SIDP cuyas secuencias están accesibles en el sitio web: <http://www.research.marshfieldclinic.org>.

I-2-1) Número de marcadores estudiados

55 El índice de heterocigosis y del mismo modo de informatividad, de los microsatélites era superior al de los SIPD, utilizándose un número mayor de marcadores SIDP para conseguir el mismo nivel de informatividad.

Esto se debe a que se han seleccionado varios marcadores en cada brazo cromosómico conservado. El brazo 9q, ya que es el sitio principal de anomalías en TV, se ha estudiado más particularmente con cuatro marcadores.

60 I-2-2) Elección de los loci

65 Idealmente, y como se ha precisado anteriormente, los marcadores no solamente debían abarcar las regiones portadoras de oncogenes y genes supresores de tumores, sino también zonas menos específicas, que podían presentar un DA debido a la inestabilidad cromosómica global de los TV.

La elección de las regiones abarcadas por los marcadores viene guiada por la bibliografía (Tabla III, anteriormente).

I-3 - Cuantificación de las soluciones de ADN

Para cada paciente, se ha extraído ADN urinario y leucocitario de las células contenidas en la extracción biológica y de referencia, respectivamente, mediante métodos convencionales conocidos por el especialista en la técnica.

Las soluciones de ADN, previamente diluidas a 1/100, se han marcado con el fluorocromo PicoGreen®, que se fija de forma selectiva al ADN de doble cadena. La lectura de la fluorescencia se realizaba a 520 nm por comparación con un intervalo de calibrado en un fluorímetro. Cada muestra se ha diluido para obtener una concentración de ADN de 100 ng/μl. Para algunas muestras de orina, la concentración era inferior a 100 ng/μl. Las soluciones finales se han conservado a -20°C.

I-4 - Amplificación por PCR

La primera etapa consistía en una amplificación de los diferentes marcadores gracias a tres reacciones de PCR múltiplex, amplificando cada una seis marcadores.

I-4-1) ADN

Se han utilizado 25 ng de ADN por PCR. Las reacciones se han puesto a punto con 25 ng de ADN para evitar cualquier limitación vinculada a la cantidad de ADN extraído del resto de orina.

I-4-2) Cebadores

Cada par de cebadores para amplificación enmarcaba un polimorfismo de inserción-delección y estaba marcado, en uno solo de los cebadores, con ayuda de un fluorocromo FAM o HEX.

I-4-3) Medio de reacción

Contenía una polimerasa (*Taq*Polymerase Gold de Perkin-Elmer a 5 U/μl), un tampón (Tampón 10X de Perkin-Elmer), MgCl₂ (Perkin-Elmer a 25 mM), desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dGTP y dCTP a 5 mM cada uno) y agua para obtener un volumen final de 25 μl.

Las Tablas VI, VII y VIII a continuación indican la composición de los medios de reacción en función de los pares de cebadores.

TABLA VI

COMPONENTE	TÍTULO	CANTIDAD (μl)
MgCl ₂	25 mM	2,5
Tampón	10 X	2
dNTP	5 mM x 4	1
Taq	5 U/μl	0,25
516	10 pmoles/μl	0,9
116	10 pmoles/μl	1,5
118	10 pmoles/μl	1,5
18	10 pmoles/μl	1
561	20 pmoles/μl	1,75
682	50 pmoles/μl	1
ADN	50 ng	véase [ADN]
H ₂ O	complemento para obtener 25 μl	

ES 2 299 697 T3

TABLA VII

COMPONENTE	TÍTULO	CANTIDAD (μl)
MgCl ₂	25 mM	4
Tampón	10 X	2,5
dNTP	5 mM x 4	1
Taq	5 U/μl	0,25
894	10 pmoles/μl	0,4
663	10 pmoles/μl	2
402	10 pmoles/μl	2
22	10 pmoles/μl	2
562	10 pmoles/μl	4
ADN	50 ng	véase [ADN]
H ₂ O	complemento para obtener 25 μl	

TABLA VIII

COMPONENTE	TÍTULO	CANTIDAD (μl)
MgCl ₂	25 mM	3
Tampón	10 X	2,5
dNTP	5 mM x 4	1
Taq	5 U/μl	0,25
714	10 pmoles/μl	0,3
471	10 pmoles/μl	0,4
17	10 pmoles/μl	0,8
390	10 pmoles/μl	1,6
752	10 pmoles/μl	1,8
686	20 pmoles/μl	2
671	20 pmoles/μl	2
ADN	50 ng	véase [ADN]
H ₂ O	Complemento para obtener 25 μl	

I-4-4) Programa de PCR

Igual para las tres reacciones, comprendía las siguientes etapas:

1. Una fase de desnaturalización y de activación de la polimerasa a 95°C durante 7 minutos.
2. Una fase de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos.
3. Una fase de hibridación a 61°C durante 30 segundos.

4. Una fase de elongación a 72°C durante 30 segundos. Las fases 2-3-4 se repetían 35 veces.

5. Una elongación final de 10 minutos a 72°C.

5 I-4-5) Puesta a punto de las PCR múltiplex

Cada par de cebadores se ha controlado en principio de forma individual para asegurarse de su reactividad. Los cebadores se han reunido a continuación en una misma mezcla de reacción.

10 A continuación se han realizado múltiples gamas jugando con los diversos parámetros que influyen en la reacción (temperatura de hibridación, concentración de $MgCl_2$, concentración de polimerasa, número de ciclos de amplificación), esto para determinar las condiciones óptimas de amplificación.

15 Además, una dificultad principal estaba ligada al hecho de que la amplificación de los diferentes productos debía realizarse de forma relativamente equivalente, para que las condiciones de lectura del analizador de secuencias siguieran siendo válidas cualquiera que fuera el producto (es decir que todos los productos de amplificación fueran detectados sin saturación alguna).

20 I-5 - Análisis de los fragmentos amplificados

Los productos de amplificación se han separado en función de su tamaño y después se han cuantificado en un analizador ABI PRISM® (modelo 310 con 1 capilar o 3100 con 16 capilares).

25 Este aparato funcionaba de siguiente manera. Los productos de amplificación, marcados con el cebador fluorescente, se han mezclado con un tampón de desnaturalización (formamida) y con un patrón de tamaño interno. Esta mezcla a continuación se ha desnaturalizado (calentamiento durante 3 minutos a 95°C) y después se ha colocado en el aparato. Este depósito se ha cargado con electricidad 5 segundos a 15 kV y después ha migrado en un capilar sometido a un campo eléctrico importante (15 kV). El capilar se iluminaba a nivel de una ventana mediante un rayo láser. El rayo luminoso emitido por la molécula fluorescente bajo el impacto del haz láser ha sido captado por una cámara digital
30 CDD y después se ha analizado mediante un programa informático GeneScan®. La cantidad de producto presente en el depósito era proporcional a la intensidad del rayo emitido. Su tamaño se ha calculado a partir de la duración de la migración del producto durante la electroforesis capilar hasta la ventana del rayo láser.

35 En la Figura 3 se proporciona un ejemplo de rastro.

I-6 - Determinación de un desequilibrio alélico

40 En teoría, un DA se traduce en la modificación de la proporción 1/1 de los dos alelos presentes inicialmente en la célula (desaparición o duplicación de un alelo).

Una dificultad la planteaba el hecho de que el resto de orina contenía células tumorales, pero también células normales procedentes de la descamación del urotelio sano. Las proporciones respectivas de estas dos poblaciones celulares eran variables. En estas condiciones, un DA se manifestaba mediante modificaciones relativamente poco sensibles de la proporción de altura de los picos relativos a los dos alelos. La importancia de estas modificaciones era
45 proporcional al porcentaje de células de origen tumoral en el resto de orina y dependía también del tipo de anomalías responsables del DA.

50 Era por lo tanto necesario definir criterios que permitieran decidir si una modificación de la proporción era significativa y correspondía efectivamente a un DA o bien si se trataba de una diferencia no significativa vinculada a variaciones experimentales.

Se han realizado cálculos estadísticos que se presentan en la parte "II-Resultados" siguiente. El conjunto de los resultados se ha gestionado y los cálculos se han realizado con ayuda del programa ACCESS® (Microsoft).

55 II - Resultados

II-1 - Modo de cálculo de los desequilibrios alélicos

60 Se han utilizado dos modelos de cálculo diferentes.

II-1-1) Definición de criterios apropiados para cada marcador

65 La determinación de un DA se basaba en la comparación de las proporciones R_f y R_i de altura de los dos picos correspondientes a los dos alelos del marcador en cuestión, respectivamente en la sangre y en la orina.

Las proporciones previstas en este caso, se han hecho simétricas con respecto a 1, pasándolas a logaritmo neperiano.

ES 2 299 697 T3

Para cada marcador, las variables LnR_f han demostrado obedecer a una ley normal. Como consecuencia, se han determinado una media y una desviación típica experimental de los LnR_f , denominadas respectivamente $m(\text{LnR}_f)$ y $s(\text{LnR}_f)$, para cada marcador.

De este modo, seleccionando un riesgo de error de primera especie α del 0,1%, se ha definido un intervalo de normalidad para el valor LnR_i , como: $\text{LnR}_i \pm [3 \times s(\text{LnR}_f)]$.

Siendo LnR_f una variable individual aleatoria medida experimentalmente, se ha preferido la media $m(\text{LnR}_f)$ para los cálculos, para limitar las fluctuaciones experimentales.

La definición del intervalo de normalidad al 99,9% era por lo tanto:

$$\text{LnR}_i \text{ comprendido entre } [m(\text{LnR}_f) \pm 3 \times s(\text{LnR}_f)]$$

La Tabla IX a continuación indica, para cada marcador, el número de ADN informativos (es decir, ADN heterocigotos) que han servido para determinar la distribución de los LnR_f , $m(\text{LnR}_f)$ y $s(\text{LnR}_f)$.

Marcador	Número de ADN informativos	$m(\text{LnR}_f)$	$s(\text{LnR}_f)$
17	34	0,0483	0,0193
18	38	0,0000	0,0521
22	55	0,0572	0,0351
116	39	0,1518	0,0347
118	39	-0,1009	0,0281
390	44	0,0668	0,0189
402	53	0,0742	0,0200
471	46	0,0418	0,0563
516	49	0,0460	0,0188
561	40	-0,0412	0,0257
562	42	0,0387	0,0355
663	43	0,0085	0,0212
671	36	0,0088	0,0130
682	22	0,0767	0,0220
686	30	-0,0289	0,0268
714	58	-0,0106	0,0172
752	41	0,0217	0,0150
894	35	-0,0093	0,0184

Como se aprecia a partir de la Tabla IX anterior, $m(\text{LnR}_f)$ no siempre era igual a 0 [correspondiente a $m(R_f) = 1]$, aunque no existiera ningún DA. Esto se debía a sesgos de amplificación, es decir a la amplificación preferencial de un alelo antes que el otro durante la reacción de PCR.

Este modo de determinación de los DA tenía como inconveniente el basarse en el cúmulo de riesgos de primera especie α . En efecto, aunque el riesgo α era fijo para un marcador informativo, aumentaba sin embargo con el número de marcadores informativos. Para paliar este inconveniente, era preciso determinar un riesgo α correlacionado con el número de marcadores informativos, esto para que el riesgo α acumulado fuera idéntico de un paciente a otro.

Desde este punto de vista, se ha puesto a punto el cálculo de un valor único que tiene en cuenta el conjunto de los marcadores ensayados para un paciente.

II-1-2) Cálculo de un valor global

El principio se basaba en el cálculo de la distancia de R_i a los valores medios de R_f para cada marcador, realizando la suma de sus cuadrados después de la transformación logarítmica y ensayando el valor obtenido de esta manera según una ley de chi-dos.

De nuevo en este caso, en razón de las fluctuaciones experimentales, las alturas de los picos a partir de las que se calculaban R_i y R_f podían considerarse como variables aleatorias cuyas mediciones experimentales a partir de una reacción de PCR eran estimaciones.

Para un resultado experimental R_i dado, se ha podido calcular el cuadrado de la distancia de $\text{Ln}R_i$ a la media $m(\text{Ln}R_f)$ con respecto a la desviación típica $s(\text{Ln}R_f)$:

$$d_i^2 = \{[\text{Ln}R_i - m(\text{Ln}R_f)]/s(\text{Ln}R_f)\}^2$$

Para N marcadores informativos, se ha establecido la suma de los cuadrados de las distancias denominada valor global Σd_i^2 . Dicho valor se distribuía de acuerdo con una ley chi-dos con N grados de libertad. La probabilidad de que el Σd_i^2 fuera superior a un valor dado podía determinarse por tanto fácilmente con ayuda de ábacos.

Se ha fijado un límite superior de Σd_i^2 , correspondiente a un riesgo α dado, que determina la especificidad del ensayo, para N marcadores informativos. Seleccionando por ejemplo α igual al 5%, la distribución de chi-dos para N grados de libertad permitía fijar un $\Sigma d_{\max}^2$ tal que cuando para una muestra de orina, se obtenía un Σd_i^2 superior a $\Sigma d_{\max}^2$, podía concluirse objetivamente que la orina considerada era patológica, con un riesgo de error del 5%.

II-2 - Resultados del ensayo

II-2-1) Resultados globales

Para caracterizar los “rendimientos” del procedimiento de detección de acuerdo con la invención y tal como se emplea en el caso de los TV, se definen los parámetros de “sensibilidad” y “especificidad” de la siguiente manera.

La “sensibilidad” corresponde a la probabilidad de que el ensayo sea positivo en caso de anomalía. Idealmente, esta probabilidad vale 1.

La “especificidad” ya definida anteriormente, representa la probabilidad de que el ensayo sea negativo en ausencia de anomalías. En este caso también, idealmente, esta probabilidad es igual a 1.

Tratándose del cálculo por marcador, se ha definido un intervalo de confianza del 0,1%. En caso de DA en uno o varios marcadores, el ensayo se consideraba positivo. Este modo de cálculo ha proporcionado los siguientes resultados. Una sensibilidad del 76,19% (48 pacientes de 63 presentaban al menos un DA) para una especificidad del 95% (1 control de 17 presentaba al menos un DA).

La determinación de DA mediante el valor ha revelado una sensibilidad del 68,25% (43 pacientes de 63 presentaban al menos un DA) para una especificidad del 95% (1 control de 17 presentaba al menos un DA).

II-2-2) Resultados relacionados con el estadio y el grado tumoral

La tabla X a continuación presenta las sensibilidades en función del modelo de cálculo de estadio y del grado histológico.

TABLA X

		% de sensibilidad n (cálculo por valor)	% de sensibilidad (cálculo por marcador)
Global	63	68,25	76,19
pTa	28	57,14	67,86
pT1	24	81,82	86,37
pT2-4	11	72,73	81,82
G1	11	54,55	63,64
G2	27	66,67	74,07
G3	25	78,26	86,96

Este análisis ha demostrado una sensibilidad menor para las lesiones pTa con respecto a pT1 ($p = 0,02$). La muestra de tumores pT2-4 era muy pequeña para permitir una comparación con los pT1 mediante el ensayo de chi-dos.

De la misma manera, el ensayo era menos sensible para las lesiones G1 que para las lesiones G2 ($p = 0,001$). No existía diferencia significativa en términos de sensibilidad entre tumores G2 y G3 ($p > 0,05$).

II-3 - Interés de los diferentes brazos cromosómicos

II-3-1) Sensibilidad global de los brazos cromosómicos

En la siguiente tabla XI figura, para cada brazo cromosómico, la sensibilidad observada.

TABLA XI

Brazo	10q	13q	3p	5q	6q	9p	9q	17p
Sensibilidad	45%	40%	34%	37%	41%	42%	58%	33%

II-3-2) Sensibilidad en función de los brazos y de los criterios histológicos

La tabla XII a continuación da las sensibilidades de cada brazo en función del estadio y del grado tumoral.

TABLA XII

	n	10q	13q	3p	17p	5q	6q	9p	9q
pTa	28	33%	19%	18%	8%	16%	19%	47%	48%
pT1	24	53%	61%	38%	44%	47%	58%	50%	75%
pT2-4	11	50%	56%	29%	50%	100%	40%	0%	50%
G1	11	20%	9%	0%	0%	29%	38%	38%	50%
G2	27	41%	39%	25%	15%	12%	25%	50%	59%
G3	25	57%	58%	42%	50%	71%	52%	38%	60%

II-4 - *Interés de los diferentes marcadores*

Se ha calculado la sensibilidad para cada marcador. Los resultados se presentan en la siguiente tabla XIII.

TABLA XIII

Marcador	Sensibilidad (%)
17	10,53
18	29,63
22	25
116	44
118	44,44
390	40
402	51,61
471	20
516	54,29
561	65,52
562	19,23
663	27,59
671	41,67
682	31,25
686	36,36
714	39,02
752	37,04
894	48,15

III - **Conclusiones**III-1 - *Especificidad del ensayo*

La especificidad del ensayo puede seleccionarse en función del valor atribuido al riesgo α (95% para el cálculo mediante el valor en los experimentos inventariados en este documento, es decir 1 falso positivo de 17 controles).

La especificidad puede aumentar mediante la mejora de la reproductibilidad de las reacciones de amplificación por PCR. A este respecto, es ventajoso realizar cada PCR por duplicado. En caso de discordancia de los resultados, puede realizarse una tercera PCR discriminatoria.

III-2 - *Sensibilidad del ensayo*

De acuerdo con el modo de determinación de los DA, la sensibilidad del ensayo era del 68,25% (valor global) o del 76,19% (criterios individuales de DA).

Uno de los límites de la sensibilidad se basa en el número de marcadores informativos.

Inicialmente, este ensayo se había pensado para 30 marcadores cuyo índice informativo medio era del 42,62%. Dichos marcadores se distribuían en nueve brazos cromosómicos. Siete de estos eran explorados mediante tres marcadores cada uno, lo que representaba una pluralidad media de tener al menos un marcador informativo en el brazo del 81%. Los dos brazos restantes eran explorados respectivamente con siete marcadores (brazo 9p) y dos marcadores (brazo 11p), con probabilidades de tener al menos un marcador informativo respectivamente del 99,98% y del 68%.

Durante la primera puesta a punto del ensayo, solamente se conservaban 18 marcadores distribuidos en ocho brazos cromosómicos y que presentaban un índice de informatividad medio del 43%.

La probabilidad de que al menos un marcador sea informativo en cada brazo cromosómico estudiado, era de media del 69,5%.

Al finalizar la puesta a punto del ensayo se han conservado cincuenta y nueve marcadores, distribuidos en diecisiete brazos cromosómicos.

La sensibilidad ha mejorado mediante la utilización de marcadores suplementarios.

III-3 - Ventajas del ensayo de acuerdo con la invención

Debido ala naturaleza bialélica de los marcadores utilizados, los productos de amplificación tienen siempre el mismo tamaño (tamaño dado $\pm$ tamaño del polimorfismo) y el mismo aspecto, a diferencia de los microsatélites, los cuales dan lugar a la formación del productos de amplificación múltiples y que difieren unos de otros en el número de repeticiones (Figura 1A y B). De ello resulta, en el caso del ensayo de acuerdo con la invención, una gran facilidad de lectura y de interpretación, lo que no es el caso con los microsatélites.

Por estas mismas razones, se ha hecho posible utilizar protocolos de reacciones de amplificación múltiple, los cuales no funcionan con los microsatélites por encima de dos, incluso tres marcadores como máximo. Esta realización múltiple ha permitido compensar el índice de informatividad de los SIPD, más reducido que el de los microsatélites, aumentando el número de marcadores sin hacer a la realización muy costosa en términos de tiempo, reactivos y muestras.

Finalmente, la observación de un mismo perfil en todos los individuos heterocigotos sanos ha permitido calcular, para cada marcador por un lado y de forma global por otro, las normas con fines de la determinación estadísticamente rigurosa y objetiva de la presencia o no de DA.

III-4 - Conclusiones

Los DA presentan la ventaja de ser una anomalía específica de las células tumorales, en comparación con otros marcadores conocidos (telomerasas, factores de degradación de fibrinógeno, proteína del factor H, etc.).

La utilización de marcadores de tipo SIDP permite, después de la optimización del ensayo, en particular el aumento del número de marcadores, prever un especificidad de aproximadamente el 95% y una sensibilidad de aproximadamente el 80 al 90%.

En conclusión, el ensayo de detección de tumores y en particular de TV, de acuerdo con la invención, debido a que es sencillo, técnicamente fácil y poco costoso, puede integrarse fácilmente en la actividad rutinaria de un laboratorio de biología molecular.

Este ensayo no invasivo podría encontrar particularmente una indicación de elección en la detección de tumores uroteliales del aparato de urinario superior, más difíciles de verificar que los TV.

Referencias bibliográficas

(1) **Greenlee R.T., Murray T., Bolden S., et al:** Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J. clin.*; 50: 7-33.

(2) **Boring C., Squires T., Tong T.:** *Cancer J. clin.*; 1995; 45: 8.

(3) **Pfister P., Asselain B., Blanchon B., et al:** Evolution de l'incidence des cancers déclarés à l'assurance maladie en Ile-de-France entre 1980 et 1994, *BEH* N° 3, 2000.

(4) **Grossman H.B.:** New methods for detection of bladder cancer. *Semin. Urol. Oncol.*; 1998; 16: 17-22.

(5) **Ramakumar S., Bhuiyan J., Besse J.A., et al.:** Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer. *J. urol.*; 1999; 161: 388-394.

(6) **Brown F.M.:** Urine cytology, is it still the gold standart for screening? *Urol. Clin. of North Am.*; Feb. 2000; 27 (1): 25-37.

(7) **Groccla J. A., McDougal W.S.:** Utility of nuclear matrix protein in the detection of bladder reccurent cancer. *Urol. Clin. of north Am.*; febrero del 2000; 27: 47-51.

(8) **Lokeshwar V.B., Soloway M.S.:** Current bladder tumor tests: does their projected utility fulfill clinical necessity? *J. of urology*; abril del 2001; 165: 1067-1077.

(9) **Malkowicz S.B.**: The application of human complement factor H related protein (BTA TRAK) in monitoring patients with bladder cancer. *Urol. Clin. of north Am.*; 27 de febrero del 2000; 27: 63-73.

(10) **Lokeshwar V.B., Block N.L.**: HA-Haase urine test: a sensitive and specific method for detecting bladder cancer and evaluating its grade. *Urol. Clin. of north Am.*; febrero del 2000; 27: 53-61.

(11) **Fradet Y., Lockhart C. et al.** Performance characteristics of a new monoclonal antibody test for bladder cancer: Immunocyt. *The Canadian Journal of Urology*; septiembre de 1997; 4(3); 400-405.

(12) **Bernues M., Casadevall C., Caballin M.R. et al.**: Study of allelic losses on 3p, 6q, and 17p in human urothelial cancer. *Cancer Genet Cytogenet*; 1 de julio de 1999; 112(1): 42-5.

(13) **Le Duc A., Cussenot O., Desgrandchamps F.**: Les tumeurs de vessie, ed. *Sanofi-Winthrop*, 1994.

(14) **Uchida T., Wang C., Wada C. et al.**: Microsatellite instability in transitionnal cell carcinoma of the urinary tract and its relationship to clinicopathological variables and smoking. *Int J Cancer* 69: 142-145, 1996.

(15) **Mao L., Lee D.J., Tockman M.S. et al.** Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; 1994; 91: 9871-9875.

(16) **Mao L., Schoenberg M.P., Scicchitano M. et al.**: Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science*; 2 de febrero de 1996; 271(5249): 659-62.

(17) **Baron A., Mastroeni F., Moore P.S. et al.**: Detection of bladder cancer by semi automated microsatellite analysis of urine sediment. *Adv. Clin. Path.*; enero del 2000; 4(1): 19-24.

(18) **Christensen M., Wolf H., Orntoft T.**: Microsatellite alterations in urinary sediments from patients with cystitis and bladder cancer. *Int. J. Cancer*; 2000; 85: 614-617.

(19) **Schneider A., Borgnat S., Lang H. et al.**: Evaluation of microsatellite analysis in urine sediment for diagnosis of bladder cancer. *Cancer Res.*; 15 de agosto del 2000; 60(16): 4617-22.

(20) **Steiner G., Schoenberg M.P., Linn J.-F. et al.** Detection of bladder recurrence by microsatellite analysis of urine. *Nat. Med.*; junio de 1997; 3(6): 621-4.

(21) **Sambrook y Russel.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente Europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- FR 0300609
- FR 0202380

Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- **SCHNEIDER et al.** *Cancer Research*, 2000, vol. 60, 4617-4622.
- **GREENLEE R.T.; MURRIA T.; BOLDEN S et al.** Cancer statistics. *CA Cancer J. clin.*, 2000, vol. 50, 7-33.
- **BORING C; SQUIRES T; TONG T.** *Cancer J. clin.*, 1995, vol. 45, 8.
- **PFISTER P; ASSELAIN B; BLANCHON B et al** Evolution de l'incidence des cancers déclarés à l'assurance maladie en Ile-de-France entre 1980 et 1994, *BEH*, 2000.
- **GROSSMAN H.B.** New methods for detection of bladder cancer. *Semin. Urol. Oncol.*, 1998, vol. 16, 17-22.
- **RAMAKUMAR S; BHUIYAN J; BESSE J.A.** Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer. *J. urol*, 1999, vol. 161, 388-394.
- **BROWN F.M.** Urine cytology, is it still the gold standart for screening? *Urol. Clin. of North Am.*; febrero del. 2000; vol. 27(1): 25-37

- **GROCELA J. A., MCDOUGAL W.S.:** Utility of nuclear matrix protein in the detection of bladder reccurent cancer. *Urol. Clin. of north Am.*; febrero del 2000; vol. 27:47-51.
- **LOKESHWAR V.B., SOLOWAY M.S.:** Current bladder tumor tests: does their projected utility fulfill clinical necessity? *J. of urology*; abril del 2001; vol. 165:1067-1077.
- **MALKOWICZ S.B.:** The application of huma complement factor H related protein (BTA TRAK) in minitoring patients with bladder cancer. *Urol. Clin. of north Am.*; febrero del 2000; vol. 27: 63-73.
- **LOKESHWAR V.B., BLOCK N.L.:** HA-Haase urine test: a sensitive and specific method for detecting bladder cancer and evaluating its grade. *Urol. Clin. of north Am.*; febrero del 2000, vol. 27: 53-61.
- **FRADET Y., LOCKHART C.** Performance characteristics of a new monoclonal antibody test for bladder cancer: Immunocyt. *The Canadian Journal of Urology*; septiembre de 1997; vol. 4(3); 400-405.
- **BERNUES M; CASADEVALL C; CABALLIN M.R.** Study of allelic losses on 3p, 3q and 17p in human urothelial cancer. *Cancer Genet Cytogonet*, 01 de Julio de 1999, vol. 112 (1), 42-5.
- **LE DUC A., CUSSENOT O., DESGRANDCHAMPS F.:** Les tumeurs de vessie, ed. *Sanofi-Winthrop*, 1994.
- **UCHIDA T., WANG C., WADA C.** Microsatellite instability in transitionnal cell carcinoma of the urinary tract and its relationship to clinicopathological variables and smoking. *Int J Cancer* 1996, vol. 69: 142-145.
- **MAO L., LEE D.J., TOCKMAN M.S.** Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; 1994; vol. 91: 9871-9875.
- **MAO L., SCHOENBERG M.P., SCICCHITANO M.** Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science*; 2 de febrero de 1996; vol. 271(5249):659-62.
- **BARON A., MASTROENI F., MOORE P.S.** Detection of bladder cancer by semi automated microsatellite analysis of urine sediment. *Adv. Clin. Path.*; enero del 2000; vol. 4(1): 19-24.
- **CHRISTENSEN M., WOLF H., ORNTOFT T.:** Microsatellite alterations in urinary sediments from patients with cystitis and bladder cancer. *Int. J. Cancer*; 2000; vol. 85: 614-617.
- **SCHNEIDER A., BORGNAT S., LANG H.** Evaluation of microsatellite analysis in urine sediment for diagnosis of bladder cancer. *Cancer Res.*; 2000 15 de agosto del 2000, vol. 60(16): 4617-22.
- **STEINER G., SCHOENBERG M.P.; LINN J.-F.** Detection of bladder reccurence by microsatellite analysis of urine. *Nat. Med.*; junio de 1997; vol. 3(6): 621-4.
- **SAMBROOK; RUSSEL.** Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2001.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de células tumorales contenidas en una extracción biológica mediante verificación de desequilibrios alélicos de al menos quince y preferiblemente al menos treinta marcadores cromosómicos bialélicos de inserción-delección, comprendiendo dicho procedimiento al menos las siguientes etapas:

a) amplificación cuantitativa múltiplex de dichos marcadores;

b) cálculo de la proporción R de altura de los dos picos correspondientes a las señales de amplificación obtenidas para los dos alelos de cada marcador;

c) cálculo de un valor estadístico global, relativo al conjunto de dichos marcadores, que se distribuye de acuerdo con una ley de chi-dos cuyo número de grados de libertad es igual al número de marcadores ensayados, calculándose dicho valor global de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Valor} = \sum d_i^2 = \sum \{ [\text{LnR}_i - m(\text{LnR}_f)] \div s(\text{LnR}_f) \}^2,$$

en la que:

d_i representa una distancia estadística, calculada para un marcador i ;

R_i representa, para cada marcador, la proporción de altura de los dos picos calculada a partir de la extracción biológica;

R_f representa, para cada marcador, la proporción de altura de los dos picos calculada a partir de una muestra de referencia;

$m(\text{LnR}_f)$ corresponde a la media de los valores de LnR_f ; y

$s(\text{LnR}_f)$ corresponde a la desviación típica de los valores de LnR_f ; y

d) comparación de dicho valor con respecto al umbral de normalidad fijado, más allá del cual la extracción biológica se considera como patológica, correspondiendo dicho umbral de normalidad al valor de chi-dos para un valor seleccionado del riesgo de primera especie α y el número de marcadores ensayados.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proporción de referencia R_f es una media de proporciones de altura de los picos con respecto a los dos alelos de un marcador, obteniéndose dichas proporciones a partir de al menos treinta muestras de referencia sanas.

3. Procedimiento de detección de células tumorales contenidas en una extracción biológica mediante verificación de desequilibrios alélicos de al menos quince y preferiblemente al menos treinta marcadores cromosómicos bialélicos de inserción-delección, comprendiendo dicho procedimiento al menos las siguientes etapas:

a) amplificación cuantitativa múltiplex de dichos marcadores;

b) cálculo de la proporción R de altura de los dos picos correspondientes a las señales de amplificación obtenidas para los dos alelos de cada marcador;

e) cálculo de una distancia individual d_i para cada marcador i de acuerdo con la fórmula:

$$d_i = [\text{LnR}_i - m(\text{LnR}_f)] \div s(\text{LnR}_f),$$

en la que:

R_i representa, para cada marcador, la proporción de altura de los dos picos calculada a partir de la extracción biológica;

R_f representa, para cada marcador, la proporción de altura de los dos picos calculada a partir de una muestra de referencia;

$m(\text{LnR}_f)$ corresponde a la media de los valores de LnR_f ; y

$s(\text{LnR}_f)$ corresponde a la desviación típica de los valores de LnR_f ; y

f) comparación del valor de la distancia d_i con respecto al intervalo de confianza de nivel $(1-\alpha)$ correspondiente al error de primera especie α seleccionado.

ES 2 299 697 T3

4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado** porque el intervalo de confianza se define mediante la fórmula:

$$m(\text{LnR}_f) \pm [3 \times s(\text{LnR}_f)].$$

en la que:

R_f representa, para cada marcador, la proporción de altura de los dos picos calculada a partir de una muestra de referencia;

m(LnR_f) corresponde a la media de los valores de LnR_f; y

s(LnR_f) corresponde a la desviación típica de los valores de LnR_f.

5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la etapa de amplificación a) se realiza por duplicado.

6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la etapa b) comprende el cálculo de la media de las dos proporciones R, correspondiendo cada una de dichas proporciones a una reacción de amplificación realizada de acuerdo con la etapa a).

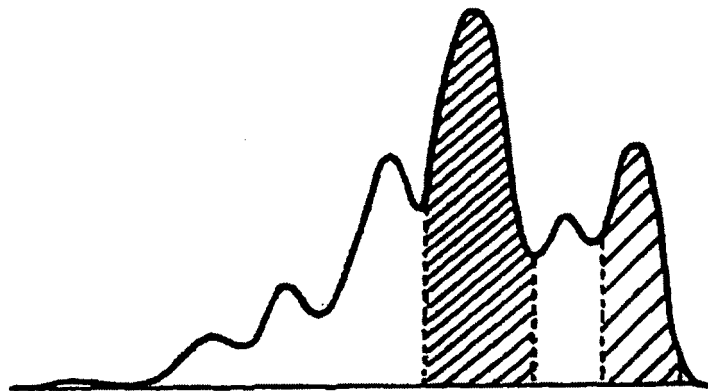
7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque la especificidad de detección de las células tumorales se determina mediante el valor de α seleccionado.

8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, aplicable a la detección de tumores de vejiga, en el que la extracción biológica es de origen urinario y las muestras de referencia son de origen sanguíneo.

9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque al menos un par de cebadores para amplificación específica utilizado en la etapa a) está constituido por cebadores seleccionados dos a dos entre las secuencias SEC ID N° 1 a 134, de tal manera que cada par esté constituido por un cebador de SEC ID N° n y por un cebador de SEC ID N° n + 1, donde n es un número entero impar seleccionado entre 1 y 133.

10. Utilización de los cebadores de amplificación específicos de marcadores cromosómicos de inserción-delección seleccionados entre el grupo constituido por las secuencias SEC ID N° 1 a 134, para la realización de un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

A



B

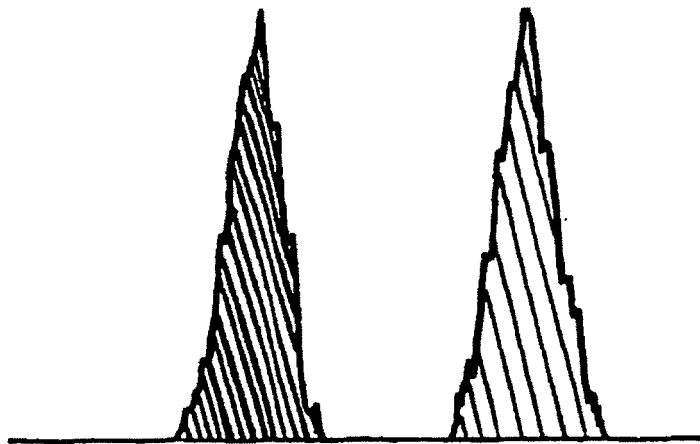


Fig. 1

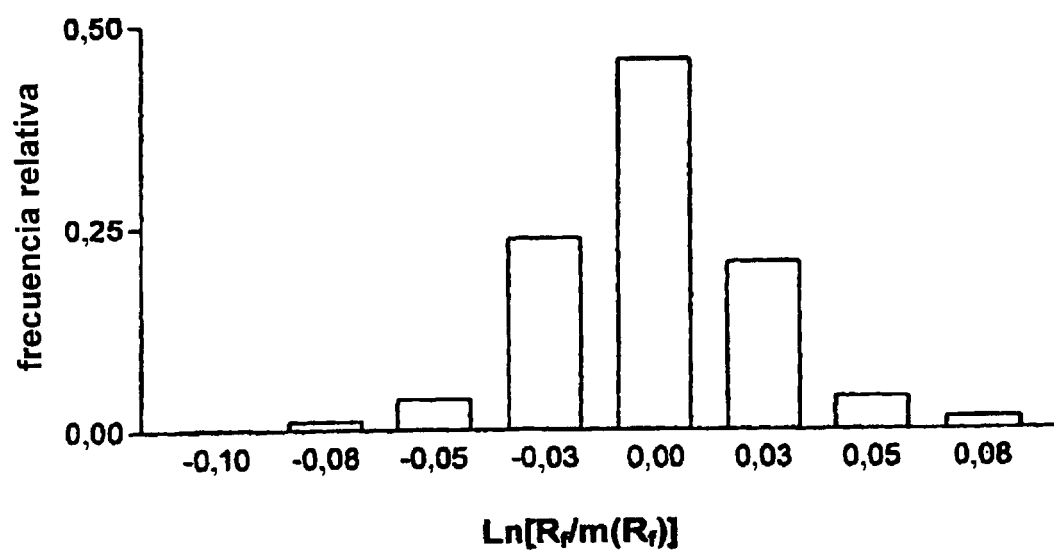
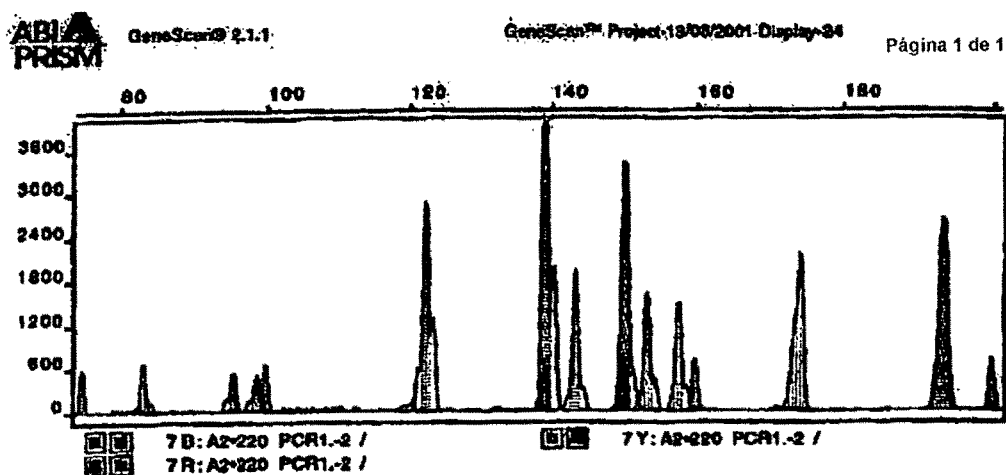


Fig. 2

A**B**

Pico tinte/muestra	Minutos	Tamaño	Altura del pico	Área del pico	Punto de los datos
7B, 23	18,14	93,94	710	6837	4948
7B, 38	20,67	122,33	2902	34460	6037
7B, 41	22,01	143,37	1844	22466	6002
7B, 43	22,61	153,38	1848	23266	6164
7B, 46	22,87	157,76	1487	20695	6238
7B, 47	23,93	174,44	2183	48773	6520
7Y, 26	18,91	95,61	559	7348	6157
7Y, 28	19,11	98,88	516	7372	6212
7Y, 31	21,76	139,12	4258	58938	6028
7Y, 33	22,42	150,31	3408	49908	6118
7Y, 36	25,20	193,62	2663	52672	6071
7R, 3	17,61	75,00	588	6864	4802
7R, 4	19,19	100,00	672	8408	5232
7R, 6	21,78	139,00	722	7439	6031
7R, 6	22,40	160,00	726	7827	6109
7R, 7	23,00	169,00	717	7748	6273
7R, 8	25,63	200,00	732	8651	6068

Fig. 3

ES 2 299 697 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> ASSISTANCE PUBLIQUE / HOPITAUX DE PARIS	
5	<120> PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE CÁNCERES MEDIANTE LA VERIFICACIÓN DE DESEQUILIBRIOS ALÉLICOS DE MARCADORES DE INSERCIÓN-DELECIÓN	
	<130> B5162A _AD/DBE/CAL	
	<140> PCT/FR 03/00609	
10	<141> 25-02-2003	
	<150> FR 0202380	
	<151> 25-02-2002	
15	<160> 134	
	<170> PatentIn Ver. 2.1	
	<210> 1	
	<211> 25	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 1	
	aagaggtctc tgggcgtca cactt	25
30	<210> 2	
	<211> 28	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
40	<400> 2	
	aagtactgag catcaggact gtatgggg	28
45	<210> 3	
	<211> 25	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
55	<400> 3	
	ccacaggtgt gccatacag acatt	25
60	<210> 4	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	

ES 2 299 697 T3

	<400> 4	
	caggtgaact gggtacgcac actca	25
5	<210> 5	
	<211> 30	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<400> 5	
	tgtatcagag gcaataattt ccaaagcaga	30
20	<210> 6	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<400> 6	
	cgatcccaga cactgaagat gaaataagtc	30
35	<210> 7	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
45	<400> 7	
	ggctgttgac tgcactggga tttaga	26
50	<210> 8	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 8	
60	tcattaactc tcagactgac ctgggagc	28
	<210> 9	
	<211> 30	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 299 697 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
5	<400> 9	
	tatgtgtggc agtgaagaga acaggtcttt	30
10	<210> 10	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 10	
20	gggctatctt aagaaatag aatactttgg ct	32
	<210> 11	
25	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 11	
35	taatggtaaa caatatttc agccacttgg ga	32
	<210> 12	
40	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 12	
50	cggatgggtg ggtatatttt attttcca	28
	<210> 13	
	<211> 28	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 13	
65	aagagcctct gtttatgtgg attgtggc	28
	<210> 14	
	<211> 31	

ES 2 299 697 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 14	
10	tcttggtaaa ttgccatttt tcataaaaca a	31
	<210> 15	
	<211> 26	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 15	
25	gcttgctatc acggtgtatt gggcat	26
	<210> 16	
	<211> 29	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
35	<400> 16	
40	tgtcagaagg ggtagtgct agtgtttga	29
	<210> 17	
	<211> 28	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
50	<400> 17	
	aactgcctg cattgtacat cattccta	28
55	<210> 18	
	<211> 28	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
65	<400> 18	
	ggggatgta ttatttctga agttggcg	28

ES 2 299 697 T3

	<210> 19	
	<211> 26	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
10	<400> 19	
	cattgtggtt acattagggg aaggca	26
15	<210> 20	
	<211> 24	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
25	<400> 20	
	ccccgacagt tgtgatgtgt tcgt	24
30	<210> 21	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
40	<400> 21	
	tgtttgagtg ccttataagt tctggttttc a	31
45	<210> 22	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
55	<400> 22	
	cagatgtagc ttaggcatt ctttttctt gt	32
60	<210> 23	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	

ES 2 299 697 T3

	<400> 23	
	atatgttcac tggctaaact atgtgtatcc ca	32
5	<210> 24	
	<211> 30	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<400> 24	
	cctgtttttg tagagccctc aagttaagaa	30
20	<210> 25	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<400> 25	
	accattggga atatgttaaa gaaattggct	30
35	<210> 26	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
45	<400> 26	
	cagaaaacat ctcatttttg accagctaca	30
50	<210> 27	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
60	<400> 27	
	aaggtatgag gagagcagat gcaaaaag	28
65	<210> 28	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 299 697 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
5	<400> 28	
	gcatgacaaa aatcactggg tggtc	25
10	<210> 29	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 29	
20	aatggaaaag tatttggtgt ttttgaatg tc	32
	<210> 30	
25	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 30	
35	gcctgacaaa ggtgaaactc agttgaaa	28
	<210> 31	
40	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 31	
50	gaaaagctac atcccagtc tgaagg	26
	<210> 32	
	<211> 28	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 32	
65	atttaaggcc accagattgt gaggaaac	28
	<210> 33	
	<211> 30	

ES 2 299 697 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 33	
10	actttcacta acaagccctt aaaccgaaaa	30
	<210> 34	
	<211> 30	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 34	
25	tgccccattg tacaccaaag aatgtaata	30
	<210> 35	
	<211> 26	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
35	<400> 35	
40	atttctttca ttaaggctgg ggaggc	26
	<210> 36	
	<211> 26	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
50	<400> 36	
	ggccacctct gaggatctga gcttta	26
55	<210> 37	
	<211> 22	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
65	<400> 37	
	acttttattg gcacaggcat tc	22

ES 2 299 697 T3

	<210> 38	
	<211> 25	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
10	<400> 38	
	gagttgtttc tgaccactg atctc	25
15	<210> 39	
	<211> 26	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
25	<400> 39	
	tcaaataaga gttgcatat cctgct	26
30	<210> 40	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 40	
40	tgaatatgtg tggcagtga ga	22
	<210> 41	
45	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 41	
55	tgtatggggc tggcttag	19
	<210> 42	
	<211> 20	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	

ES 2 299 697 T3

	<400> 42	
	gcctctgaag aggtctctgg	20
5	<210> 43	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<400> 43	
	tgtgatcaat tccaactgct g	21
20	<210> 44	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<400> 44	
	aaggcttaaa ggaaatcacg tc	22
35	<210> 45	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
45	<400> 45	
	ttcttgccagg catgaagcta	20
50	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
60	<400> 46	
	ctcaaccccc ttctccatag	20
65	<210> 47	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 299 697 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
5	<400> 47	
	ttttcggatg ggtgggtat	19
10	<210> 48	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 48	
20	aacaatattt tcagccactt tgg	23
	<210> 49	
25	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 49	
35	agacaccaaa ggcctctgt tta	23
	<210> 50	
40	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 50	
50	cttctcacta aattatgtct tggtaaattg	30
	<210> 51	
	<211> 22	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
60	<400> 51	
	caataccag caaaggatat gg	22
65	<210> 52	
	<211> 25	

ES 2 299 697 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 52	
10	gcatctgtac atagtaagcc taccg	25
	<210> 53	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 53	
25	ctttttcaaa tgctgcttgc	20
	<210> 54	
	<211> 23	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
35	<400> 54	
40	cagaaggggt tagtgctagt gtt	23
	<210> 55	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
50	<400> 55	
	gtgccatttt gattccatt	20
55	<210> 56	
	<211> 19	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
65	<400> 56	
	ggcattccag aaccaaaag	19

ES 2 299 697 T3

	<210> 57	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
10	<400> 57	
	gacctaaaat tgcggtcatt tc	22
15	<210> 58	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
25	<400> 58	
	gaaaatgcag gccttcatc a	21
30	<210> 59	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
40	<400> 59	
	agttggcgcc agaatga	18
45	<210> 60	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 60	
55	atacaagagt ccaaggtagc cagt	24
	<210> 61	
60	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	

ES 2 299 697 T3

	<400> 61	
	ggtaggcatg tagaaatacg gttc	24
5	<210> 62	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<400> 62	
	ccaggatagc attcaacagt ttg	23
20	<210> 63	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<400> 63	
	ccactcactt tcttgcattg	20
35	<210> 64	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
45	<400> 64	
	cccgcacagt gtgatgtgtt	20
50	<210> 65	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
60	<400> 65	
	tgtgtgttg cttgcctct	20
65	<210> 66	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 299 697 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
5	<400> 66	
	cattccacg gtagctgtt	20
10	<210> 67	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 67	
20	ttgtgtctgc ctgtagtca atg	23
	<210> 68	
25	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 68	
35	gtgattaaac ttgtatttcc tgaaca	26
	<210> 69	
40	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 69	
50	tcttaggaaa agctacatcc cagt	24
	<210> 70	
	<211> 21	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
60	<400> 70	
	tttaaggcca ccagattgtg a	21
65	<210> 71	
	<211> 27	

ES 2 299 697 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 71	
10	gctatgttca gaaaatgcat ctctac	27
	<210> 72	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 72	
25	tgatgtgtga cagccaatga a	21
	<210> 73	
	<211> 22	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
35	<400> 73	
40	gctagatggc cctgtgtcat tg	22
	<210> 74	
	<211> 24	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
50	<400> 74	
	gtgattaatg tgaactcca gtgc	24
55	<210> 75	
	<211> 20	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
65	<400> 75	
	ttgctgtggc tctaggttgc	20

ES 2 299 697 T3

	<210> 76	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
10	<400> 76	
	tcggcagtta atgacagtga tg	22
15	<210> 77	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
25	<400> 77	
	ggggatgaca atgaatatga tg	22
30	<210> 78	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
40	<400> 78	
	tggcataaca cttagcaagc a	21
45	<210> 79	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 79	
55	tcagagacaa ggtcgctgct	20
	<210> 80	
60	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	

ES 2 299 697 T3

	<400> 80	
	tttctcata gctactccac cactg	25
5	<210> 81	
	<211> 25	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<400> 81	
	agcttcggag aatctatcaa atagc	25
20	<210> 82	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<400> 82	
	gaacgggtaa aatggcaatg	20
	<210> 83	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 83	
45	aaaccagcca gtttctctga	20
	<210> 84	
50	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 84	
60	gtactgggta ggtaatacgc tgaga	25
	<210> 85	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 299 697 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
5	<400> 85	
	gccaattact ttgcctctcc	20
10	<210> 86	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 86	
20	acgggacaag tctgtttggt	20
	<210> 87	
25	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 87	
35	caaaagatgg aggctaatat gttga	25
	<210> 88	
40	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 88	
50	aatagtccat tagcaaatcc ttea	24
	<210> 89	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
60	<400> 89	
	gcagcttcca actggttctt	20
65	<210> 90	
	<211> 20	

ES 2 299 697 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 90	
10	ggctaaccga gtgagtccaa	20
	<210> 91	
	<211> 19	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 91	
25	ctgctgcaga ttgaaccaa	19
	<210> 92	
	<211> 24	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
35	<400> 92	
40	aacagcatcg ctttagatac tag	24
	<210> 93	
	<211> 19	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
50	<400> 93	
	gccctgagcc tttaaatac	19
55	<210> 94	
	<211> 22	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
65	<400> 94	
	tggaacctca gtcacaccta ag	22

ES 2 299 697 T3

	<210> 95	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
10	<400> 95	
	tgtttcagga ctgagcacga	20
15	<210> 96	
	<211> 19	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
25	<400> 96	
	caggaggtgt ggccagttt	19
30	<210> 97	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
40	<400> 97	
	atcctcccca ctgaacctc	19
45	<210> 98	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 98	
55	gccctcttc tgctggttat	20
	<210> 99	
60	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	

ES 2 299 697 T3

	<400> 99	
	cggggcggac aactaatg	18
5	<210> 100	
	<211> 25	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<400> 100	
	caaacaggac tgaatgaaaa caaca	25
20	<210> 101	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<400> 101	
	agccactga attacctgga a	21
	<210> 102	
35	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 102	
45	tcttgggaaa tcgccttc	19
	<210> 103	
50	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 103	
60	cgtaaatgga gggttaaatgg cttc	24
	<210> 104	
	<211> 19	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 299 697 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
5	<400> 104	
	ctccgcactt atgctgcaa	19
10	<210> 105	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 105	
20	cccgtttaca cctgctgagt	20
	<210> 106	
25	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 106	
35	cctggggagt ctaggtaaga tg	22
	<210> 107	
40	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 107	
50	agtgagccaa aatggactaa gg	22
	<210> 108	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 108	
65	tagggcctgt ctgactccaa	20
	<210> 109	
	<211> 19	

ES 2 299 697 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 109	
10	atttcctcc caaccctgt	19
	<210> 110	
	<211> 24	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 110	
25	gatcaaattg aaggacatga gaga	24
	<210> 111	
	<211> 23	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
35	<400> 111	
40	ctttctcttc ccatcttcac ttg	23
	<210> 112	
	<211> 21	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
50	<400> 112	
	gcatgcttaa ggactgtgaa a	21
55	<210> 113	
	<211> 25	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
65	<400> 113	
	agaagagtga acgtattgac atgag	25

ES 2 299 697 T3

	<210> 114	
	<211> 19	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
10	<400> 114	
	gcttacgggt ttctctcca	19
15	<210> 115	
	<211> 25	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
25	<400> 115	
	ggaatacagc atactcaaat aaagg	25
30	<210> 116	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
40	<400> 116	
	ccctgtgctt aatgtctgca a	21
45	<210> 117	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
55	<400> 117	
	atgatgtggt acctctgtca cc	22
60	<210> 118	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	

ES 2 299 697 T3

	<400> 118	
	tactcttcca ggcactgata gg	22
5	<210> 119	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<400> 119	
	atcacagcgg tgaagcaaag	20
20	<210> 120	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<400> 120	
	ctttggtcag tagggatcca ttt	23
35	<210> 121	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
45	<400> 121	
	tgggtgtctg aaatgtaat tgagc	25
50	<210> 122	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
60	<400> 122	
	gggtgagttc cagcgtttct	20
65	<210> 123	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 299 697 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
5	<400> 123	
	gatattaaac aagtagcatc agacacaa	28
10	<210> 124	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 124	
20	tagtatgcag tggctgttga ga	22
	<210> 125	
25	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 125	
35	agtggctccc tgtgtctga	19
	<210> 126	
40	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 126	
50	aatgagcttc gttctttgga c	21
	<210> 127	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 127	
65	ctcaacatct ggacggagca	20
	<210> 128	
	<211> 27	

ES 2 299 697 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 128	
10	aatggagtgt gtactgttag agagtga	27
	<210> 129	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 129	
25	acgcctggcc tgaaagtatt	20
	<210> 130	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
35	<400> 130	
40	gtctgacatc gccctcgtag	20
	<210> 131	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
50	<400> 131	
	agaagcagaa tggggatgaa	20
55	<210> 132	
	<211> 23	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
65	<400> 132	
	ggagtaatag attctggcat gtg	23

ES 2 299 697 T3

	<210> 133	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
10	<400> 133	
	tgaactaaag gtgggcagtg	20
15	<210> 134	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
25	<400> 134	
	caatgaagca ttgacaacg tc	22
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		