



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 543**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00968342 .6**

96 Fecha de presentación : **08.09.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1212468**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.06.2002**

54 Título: **Procedimientos para la detección de enfermedades.**

30 Prioridad: **08.09.1999 US 152847 P**  
**07.12.1999 US 455950**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.11.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.11.2009**

73 Titular/es: **Genzyme Corporation**  
**500 Kendall Street**  
**Cambridge, Massachusetts 02142, US**

72 Inventor/es: **Shuber, Anthony, P.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

**ES 2 329 543 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos para la detección de enfermedades.

5 **Antecedentes de la invención**

Muchas enfermedades se asocian con inestabilidad genómica. Es decir, una alteración de la estabilidad genómica, tal como una mutación, se ha vinculado con el inicio o la progresión de ciertas enfermedades. En consecuencia se han propuestos varios aspectos de inestabilidad genómica como marcadores fiables de enfermedad. Por ejemplo, se han propuesto mutaciones en los genes BRCA como marcadores de cáncer de mama y mutaciones en el gen regulador del ciclo celular p53 se han asociado con numerosos cánceres, especialmente con el cáncer colorrectal. Se ha sugerido que mutaciones específicas podrían ser una base de los ensayos de detección selectiva molecular para las etapas tempranas de ciertos tipos de cáncer. Véase, por ejemplo, Sidransky y col., *Science*, 256: 102-105 (1992).

La búsqueda de marcadores genómicos de enfermedad ha sido especialmente intensa en el área de la detección del cáncer. El cáncer se caracteriza por un crecimiento celular incontrolado, que se puede asociar con una o más mutaciones genéticas. Dichas mutaciones pueden hacer que las células afectadas eviten la muerte celular. Por ejemplo, una mutación en un gen supresor tumoral puede hacer que las células eviten la apoptosis, un tipo de muerte celular que se piensa que está bajo control genético directo. Durante la apoptosis, las células pierden sus membranas, el citoplasma se condensa y la cromatina nuclear se divide en fragmentos de oligonucleótidos de una longitud característicamente corta. De hecho, dichos patrones características de escisión de ADN se han propuesto como ensayo para apoptosis.

Se han realizado intentos para identificar y usar marcadores de ácido nucleico que son indicativos de cáncer. No obstante, incluso cuando se encuentran dichos marcadores, se ha probado que su uso para la detección en muestras de pacientes, especialmente muestras heterogéneas, no tiene éxito debido a una incapacidad para obtener suficiente material de muestra o debido a la baja sensibilidad resultado de medir sólo un único marcador. Se ha probado que obtener simplemente una cantidad adecuada de ADN humano de un tipo de muestra heterogénea, heces, es difícil Véase Villa, y col., *Gastroenterol.*, 110: 1346-1353 (1996) (en el que se notifica que solo el 44,7% de todas las muestras de heces y solo el 32,6% de las heces de individuos sanos produce suficiente ADN para el análisis de mutaciones). Otros informes en los que se ha obtenido ADN adecuado han comunicado una sensibilidad baja en la identificación del estado patológico de un paciente sobre la base de una única mutación asociada con el cáncer. Véase Eguchi, *et al.*, *Cancer*, 77: 1707-1710 (1996) (usando una mutación en p53 como mercado para el cáncer).

Los investigadores han intentado analizar mutaciones en el ADN de células tumorales en áreas lumbales, tales como el colon, conductos biliares, vasos sanguíneos y similares. Estos intentos sólo han tenido éxito cuando hay una mutación conocida y se ha encontrado una concentración relativamente alta de material celular. Véase, p. ej., Mulcahy, y col., *Ann. Oncol.* 10 Suppl 4: 114-117 (1999). No se han realizado intentos para correlacionar el estado de la enfermedad con la integridad del ADN en el material celular desprendido.

Giacona Mary Beth y col. (1998), *Páncreas*, vol 17(1), páginas 89 a 97 desvelan el análisis de AND sin célula en plasma sanguíneo humano.

El documento US 3.413.464 desvela procedimientos para medir ácido nucleico en muestras biológicas tras potenciación en una solución ácida.

El documento WO 99/07895 desvela procedimientos para cuantificar moléculas de ácido nucleico.

El documento WO 96/23895 desvela la detección y cuantificación del daño de ADN en animales y en cultivos celulares.

Allen R. Todd y col. (1997), *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol 37(4), páginas 215-228 desvela la caracterización morfológica y bioquímica y el análisis de la apoptosis.

Schmitt Estelle y col. (1998), *Cell Death and Differentiation*, vol. 5 (6), Junio 1998, páginas 506-516 desvela que Bax- $\alpha$  estimula la apoptosis inducida por quimioterapia para el cáncer y acelera la activación de cisteína proteasas similares a la caspasa 3 en células Namalwa de linfoma B con mutación doble en p53.

**Resumen de la invención**

La presente invención proporciona que la integridad de los ácidos nucleicos en muestras biológicas que comprenden material celular desprendido es un indicador del estado de enfermedad del paciente del que se obtuvo la muestra. De acuerdo con la invención, ciertas muestras de tejido o de líquido corporal, especialmente las que se describen más adelante, contienen residuos de células que se han desprendido de órganos o tejidos adyacentes. En pacientes sanos, tales residuos son el resultado de la apoptosis como parte del ciclo celular normal. La apoptosis reduce la integridad del ácido nucleico, de modo que en residuos celulares de individuos sanos sólo existen ácidos nucleicos de fragmento pequeño. Por el contrario, en enfermedades como el cáncer en las que los mecanismos del ciclo celular se han destruido o alterado, el residuo celular comprende ácidos nucleicos de alta integridad (es decir, ácidos nucleicos que no han sido degradados mediante apoptosis). Por tanto, los procedimientos de la invención comprende el uso de la integridad

## ES 2 329 543 T3

del ácido nucleico como medida del estado de enfermedad del paciente. La integridad se puede medir por cualquier medio conveniente. Entre los medios preferidos se incluyen la cantidad de ácido nucleico en una muestra, la longitud de los ácidos nucleicos en una muestra, o el peso molecular de los ácidos nucleicos en una muestra.

5 La invención proporciona procedimientos para detectar cáncer o pre-cáncer en un paciente sobre la base de la integridad de los ácidos nucleicos del paciente presentes en un espécimen o muestra obtenidos del paciente. De acuerdo con los procedimientos de la invención, un espécimen de tejido o de fluido corporal que contiene residuo celular desprendido obtenido de un paciente con una enfermedad contiene una cantidad de ácido nucleico intacto que es mayor a lo que cabría esperar en tal espécimen obtenido de un paciente sano. Por tanto, una medida de ácido nucleico  
10 intacto en una muestra de paciente es indicativa del estado de enfermedad global del paciente. Como se usa en la presente memoria descriptiva, "intacto" se refiere a ácidos nucleicos que son más largos que los que cabría esperar que estuvieran presentes como resultado de la apoptosis. La invención es igualmente aplicable para usos humanos y veterinarios. De acuerdo con esto, "paciente", como se define en la presente memoria descriptiva, significa seres humanos u otros animales.

15 Un paciente sano generalmente produce residuos celulares mediante degradación apoptótica normal, lo que tiene como resultado fragmentos relativamente cortos de ácido nucleico en muestras derivadas de tejido y fluidos luminales. Pacientes que tienen una enfermedad generalmente producen células y residuos celulares, una proporción de las cuales ha evitado una regulación normal del ciclo celular, lo que tiene como resultado fragmentos de ácido nucleico intactos y relativamente largos. Sin pretender ligado a la teoría, la presente invención aprovecha esta y otras ideas concernientes al modo en que las células responden a enfermedades, especialmente enfermedades asociadas con anomalías genéticas (inducidas o heredadas). Como resultado, se ha descubierto que el estado de enfermedad de un paciente se determina mediante análisis de los ácidos nucleicos del paciente producidos en especímenes obtenidos del paciente. Más preferentemente, dichos especímenes son aquéllos que con mayor probabilidad contienen residuos celulares desprendidos.  
20 Tales especímenes incluyen, entre otros, heces, suero sanguíneo o plasma, esputo, pus, calostro y otros. En enfermedades como el cáncer, en el que las inestabilidades o anomalías genómicas han interferido con la regulación normal del ciclo celular, los especímenes tales como los identificados en lo que antecede contienen fragmentos de ácido nucleico relativamente intactos. La presencia de dichos fragmentos es una detección selectiva diagnóstica general de la enfermedad.

30 De acuerdo con esto, los procedimientos de la invención comprenden la detección selectiva de un paciente para cáncer o pre-cáncer mediante análisis de la integridad de los ácidos nucleicos en un espécimen de tejido o de fluido corporal obtenido del paciente. Entre los especímenes preferidos se incluyen los que comprenden células desprendidas o residuos celulares. Por tanto, especímenes altamente preferidos son aquéllos que no contienen abundancia de células intactas (no exfoliadas). Dichos especímenes preferidos comprenden heces, esputo, orina, bilis, jugo pancreático y suero sanguíneo o plasma, todas ellas contienen células desprendidas o residuos celulares. Los procedimientos de la invención son especialmente útiles como detecciones selectivas de cáncer. El cáncer es una enfermedad que se piensa que está asociada con inestabilidades genómicas y, específicamente, con la pérdida de control sobre el ciclo celular normal. Por tanto, las células tumorales normalmente están intactas y generalmente se desprenden en, por ejemplo,  
40 heces, esputo, orina, bilis, jugo pancreático y sangre. Tales células desprendidas y residuo celular contienen ácidos nucleicos de mayor integridad en comparación con las que se encuentran en especímenes obtenidos de un paciente sano. Hay numerosos modos por los que la integridad de los ácidos nucleicos en un espécimen de un paciente se mide como detección selectiva de cáncer o pre-cáncer.

45 En una forma de realización preferida, la integridad del ácido nucleico se mide por la capacidad de amplificar los ácidos nucleicos en una muestra. Por tanto, un procedimiento preferido comprende realizar en una muestra de tejido o de fluido corporal una reacción de amplificación usando como molde un locus de ácido nucleico que se sospecha que está en la muestra. Si la cantidad del producto de la amplificación (amplicón) es mayor a la cantidad de amplicón que se prevé que esté presente en una muestra normal (p. ej., una que no tiene la enfermedad que se está buscando), se determina que la muestra es positiva. En algunos casos, la presencia de algún producto de amplificación es suficiente para justificar una detección positiva de la enfermedad. Es preferible que, en el caso del ADN, la reacción de amplificación sea una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o, en el caso del ARN, que la reacción de amplificación sea una PCR con transcriptasa inversa. Se han diseñado cebadores para amplificar el locus o los loci escogidos para el análisis. Para los fines de la invención, un "locus genómico" es cualquier elemento genético, incluidos, entre otros,  
55 una región de codificación de un gen, una región de ácido nucleico no codificadora, un elemento regulador de un gen, un intrón o ARN. No es necesario que los loci genómicos diana estén asociados con ningún cáncer o pre-cáncer específico porque un incremento en el ácido nucleico amplificable es, en sí mismo, diagnóstico.

60 En una forma de realización preferida, la presencia de un único amplicón de alto peso molecular es una detección positiva. Preferentemente, un fragmento de aproximadamente 1,3 Kb o mayor se mide como indicador de ácidos nucleicos de alta integridad en la muestra del paciente.

En una forma de realización altamente preferida, se produce un perfil de productos de amplificación a través de una gama de fragmentos de ácido nucleico de diferentes longitudes. En una forma de realización preferida, se realiza una serie de reacción de amplificación en un único locus genómico, estando cada reacción diseñada para amplificar  
65 un fragmento de longitud única. Si se produce un amplicón detectable en cada reacción, o en una serie de reacciones, superior al previsto en una muestra obtenida de un paciente sano, se determina que la muestra es positiva. Por ejemplo, se han realizado intentos para amplificar fragmentos de 200 pb, 400 pb, 800 pb, 1,3 Kb, 1,8 Kb y 2,4 Kb en el mismo

## ES 2 329 543 T3

locus genómico. En una muestra obtenida de un individuo sano (una muestra "normal"), cabría esperar que se observa poco o ningún producto de amplificación, especialmente cuando como molde se usan las porciones más largas del locus. Por el contrario, al menos alguna proporción de células y residuo celular en una muestra obtenida de un paciente enfermo contendrá fragmentos intactos.

5 En otra forma de realización se produce un perfil de productos de amplificación a través de una gama de fragmentos de ácido nucleico de diferentes longitudes mediante una serie de reacciones de amplificación realizadas en una serie de loci genómicos diferentes, estando cada reacción diseñada para amplificar un fragmento de longitud única. Si se produce un amplicón detectable en cada reacción, o en una serie de reacciones, superior al previsto en una muestra obtenida de un paciente que no tiene la enfermedad que se busca, se determina que la muestra es positiva.

10 De acuerdo con los procedimientos de la invención, las muestras normales no producen cantidades significativas de amplicón detectable a ninguna longitud significativamente mayor que el fragmento apoptótico típico (aproximadamente 175 pb). De acuerdo con esto, si los cebadores están espaciados para amplificar fragmentos de sólo una longitud en un locus genómico dado o si se realiza una serie de amplificaciones en el locus, fácilmente se pueden observar diferencias entre las muestras normales y de enfermos.

15 Como se detalla más adelante, los procedimientos de la invención son útiles para detectar cáncer o pre-cáncer en muestras biológicas, que comprende células desprendidas o residuo celular. Por ejemplo, la presencia en una muestra de heces de un paciente de cantidades de ácido nucleico, preferentemente ADN, por encima de un umbral pre-determinado para pacientes sanos es indicativa de que el paciente tiene cáncer. El análisis de seguimiento se usa para determinar si está la enfermedad. No obstante, la detección selectiva de la enfermedad general es eficaz con independencia del locus de la enfermedad y del espécimen tomado para analizar. Por tanto, mientras que el análisis de ácidos nucleicos en heces generalmente es predictivo de la enfermedad, no necesariamente indica que la enfermedad es de origen gastrointestinal. No obstante, la detección selectiva de seguimiento basada en, por ejemplo, análisis mutacional, es adecuada para identificar el locus de la enfermedad. En la técnica se conocen numerosos análisis mutacionales e incluyen, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.670.325.

20 En una forma de realización alternativa, la detección selectiva de muestras de pacientes mediante la detección de cantidades de ácido nucleico en la muestra se combina con un ensayo de actividad celular apoptótica. Tales ensayos se pueden combinar con la detección de cantidades de ácido nucleico en una muestra de paciente como detección selectiva de un estado de enfermedad. Una detección selectiva positiva es una que produce: (1) una cantidad de ácido nucleico que es superior a la cantidad que se prevé que esté presente en una muestra normal (p. ej., una que no tiene la enfermedad que se está buscando) y (2) una cantidad de actividad celular apoptótica que es inferior a la que se prevé que esté presente en una muestra normal. En una forma de realización altamente preferida, los procedimientos de la invención comprenden analizar una pluralidad de loci genómico para determinar una cantidad de ácido nucleico amplificable presente en cada locus. El análisis de múltiples loci usando procedimientos de la invención puede incrementar la sensibilidad del ensayo de detección selectiva.

25 Como se pone como ejemplo con detalle más adelante, los procedimientos de la invención comprenden la detección selectiva de una muestra biológica para una anomalía en un ácido nucleico mediante la realización de una reacción de amplificación usando como molde un ácido nucleico que se sospecha, o se prevé, que esté en la muestra; la determinación de una cantidad del producto de amplificación obtenido; la comparación de la cantidad de amplicón obtenido con una cantidad estándar de producto de amplificación; y la identificación de una muestra que tiene una anomalía en un ácido nucleico si la cantidad de producto de amplificación difiere de la cantidad estándar. En una forma de realización preferida, una cantidad estándar de producto de amplificación se determina mediante la amplificación de un locus, una porción del mismo, que se está buscando (p. ej., un ácido nucleico salvaje intacto) en una muestra normal conocida (una obtenida de un individuo del que se sabe que no tiene la enfermedad que se está buscando). También en formas de realización preferidas, una cantidad estándar se determina por referencia a la técnica. En ciertas formas de realización de la invención, la cantidad estándar es esencialmente amplicón no detectable debido a la ausencia en la muestra de ácidos nucleicos de alta integridad. En consecuencia, cualquier amplicón en la muestra de un paciente es indicativo de una detección selectiva positiva. Especialmente este es el caso cuando se está buscando un fragmento largo (p. ej. de 1,8 Kb o 2,4 Kb). Por último, la cantidad estándar puede ser un marcador de peso molecular en, por ejemplo, un gel electroforético.

30 En una forma de realización preferida de la invención, la muestra se prepara a partir de un espécimen seleccionado del grupo constituido por heces, esputo, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido seminal, saliva, aspirado de pezón de mama y tejido de biopsia. No obstante se puede usar cualquier espécimen de tejido o fluido corporal de acuerdo con los procedimientos de la invención. Especialmente preferidas son las muestras de fluido luminal porque dichas muestras están, generalmente, libre de células sanas intactas. Dichas muestras incluyen sangre, orina bilis, jugo pancreático, heces, esputo, pus y similares.

35 También en una forma de realización preferida, el ácido nucleico o ácidos nucleicos que se está buscando es ADN. En una forma de realización más concreta, el ácido nucleico que se está analizando se selecciona a partir de una región codificadora de un gen, o una porción de la misma, una región de ácido nucleico no codificadora, o una porción de la misma, un elemento regulador de un gen o una porción del mismo, y un fragmento no identificado de ADN genómico. También en una forma de realización preferida, el ácido nucleico que se está buscando es ARN. Como el experto en la técnica aprecia, cualquier locus genómico es susceptible de someterse a detección selectiva de acuerdo

## ES 2 329 543 T3

con la invención. El locus o loci concretos escogidos para el análisis depende, en parte, de la enfermedad que se esté buscando y de la comodidad del investigador. No es necesario que el locus o loci escogidos para el análisis se correlacione con alguna enfermedad específica porque los procedimientos de la invención contemplan medir el ácido nucleico total en una muestra o ácido nucleico amplificable en una muestra como indicador del estado de enfermedad global o de la presencia y/o extensión de la apoptosis en la muestra. No obstante, se pueden usar loci asociados con enfermedad (aquellos en los que una mutación es indicativa, causal o, de otro modo, evidencia de enfermedad). Entre los loci asociados con enfermedad preferidos se incluyen p53, apc, MSH-2, dcc, scr, c-myc, B-catenina, mlh-1, pms-1, pms-2, pol-delta y bax.

La cantidad de producto de amplificación se puede determinar mediante cualquier medio adecuado o cómodo. Preferentemente, la cantidad de producto de amplificación se determina mediante electroforesis en gel. Se pueden usar indicadores, tales como indicadores fluorescentes o radiactivos. Las cantidades de producto de amplificación producido se pueden comparar con cantidades estándar mediante cualquier medio adecuado o cómodo, incluidos, entre otros, comparación visual, comparación óptica con máquina, densitometría, espectroscopia de masas, captura de híbridos y otros medios conocidos. La reacción de amplificación, en sí misma, puede ser cualquier medio para amplificar ácido nucleico, incluidos, entre otros, PCR, RT-PCR, OLA, círculo rodante, extensión de una base, y otros conocidos en la técnica. El producto de amplificación también se puede medir mediante técnicas de amplificación de señal, tales como amplificación de cadena ramificada (Chiron). Los procedimientos de la invención son útiles con cualquier plataforma para la identificación, amplificación, secuenciación u otro tipo de manipulación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, se pueden aplicar procedimientos de la invención a la reacción en cadena de la ligasa, el desplazamiento de hebra (Becton-Dickinson) y otros.

También en una forma de realización preferida de la invención se lleva a cabo una serie de reacciones de amplificación en un locus genómico sencillo. Cada reacción de amplificación en la serie se diseña para amplificar un fragmento de una longitud diferente. En una forma de realización preferida, las longitudes diana del fragmento son 200 pb, 400 pb, 800 pb, 1,3 Kb, 1,8 Kb y 2,4 Kb. Los cebadores para la amplificación se han diseñado de acuerdo con los conocimientos de la técnica con el fin de amplificar el molde, si está presente, de la longitud deseada en el locus deseado. Una detección positiva selectiva es una que produce amplicón en al menos una, y preferentemente al menos dos de las 4 series de reacciones de amplificación. Como se ha indicado antes, una muestra normal que ha sufrido o que está sufriendo apoptosis, normalmente contiene pocos o ningún fragmento de longitud significativa. Por tanto, una serie de reacciones de amplificación dirigida a fragmentos de aproximadamente 200 pb a aproximadamente 2,4 Kb y más largos revela muestras que pueden contener ácidos nucleicos que han evitado la apoptosis, como pone de manifiesto la amplificación de fragmentos largos.

Procedimientos preferidos de la invención también comprenden realizar reacciones de amplificación con una serie de diferentes loci genómicos. Preferentemente se usan de aproximadamente 2 a aproximadamente 7 loci. No obstante, el investigador individual determina el número preciso de loci analizados sobre la base de la enfermedad que se ha de detectar o sobre la base de la comodidad. De acuerdo con los procedimientos de la invención, se diseñan cebadores para amplificar el ácido nucleico (preferentemente ADN) en cada uno de los loci escogidos. Una muestra en la que al menos un locus, preferentemente al menos dos loci, y más preferentemente al menos tres loci, producen un producto de amplificación detectable se considera una muestra positiva. Las longitudes de los fragmentos que se han de amplificar en este ensayo se pueden variar, pero tienen una longitud de, preferentemente, al menos aproximadamente 180 pb cada uno. No es necesario que se amplifiquen en cada uno de los loci escogidos los fragmentos de la misma longitud.

Los procedimientos de la invención también comprenden realizar una serie de reacciones de amplificación en una serie de loci genómicos diferentes. Cada reacción de amplificación en la serie se diseña para amplificar un fragmento de una longitud diferente. Preferentemente se usan de aproximadamente 2 a aproximadamente 7 reacciones de amplificación con aproximadamente 2 a aproximadamente 7 loci. No obstante, el investigador individual determina el número preciso de loci analizados sobre la base de la enfermedad que se ha de detectar o sobre la base de la comodidad. En una forma de realización preferida, las longitudes diana del fragmento son 200 pb, 400 pb, 800 pb, 1,3 Kb, 1,8 Kb y 2,4 Kb. Los cebadores para amplificación se diseñan de acuerdo con los conocimientos de la técnica con el fin de amplificar el molde, si hay. Se prefiere, aunque no es necesario, que se amplifiquen en cada uno de los loci escogidos los fragmentos de la misma longitud. Una detección selectiva positiva es una que produce amplicón en al menos una, y preferentemente al menos dos, de las series de reacciones de amplificación y en la que al menos un locus, preferentemente al menos dos loci, y más preferentemente al menos tres loci, producen producto de amplificación detectable. Como se ha indicado antes, una muestra normal que ha sufrido o que está sufriendo apoptosis, normalmente contiene pocos o ningún fragmento de longitud significativa. Por tanto, una serie de reacciones de amplificación dirigida a fragmentos de aproximadamente 200 pb a aproximadamente 2,4 Kb y más largos revela muestras que pueden contener ácidos nucleicos que han evitado la apoptosis, como pone de manifiesto la amplificación de fragmentos largos.

Los procedimientos de la invención también pueden usarse para valorar la integridad de ADN en una muestra biológica. Dichos procedimientos comprenden realizar una reacción de amplificación usando como molde al menos dos loci de los que se sospecha que están en la muestra;

determinar qué loci producen amplicón detectable; y valorar la integridad del ADN en la muestra como función del número de loci que producen amplicón. La integridad del ADN en la muestra es elevada cuando el amplicón se produce en una o más de las reacciones de amplificación. Este procedimiento es especialmente útil para determinar si una muestra heterogénea tiene suficiente ácido nucleico para medir. De acuerdo con esto, dichos procedimientos se

usan para la detección selectiva o “cualificar” muestras para su posterior análisis (p. ej., análisis genético, bioquímico, citológico o de otro tipo).

Los procedimientos de la invención también se pueden usar para valorar las anomalías fetales realizando reacciones de amplificación con ácidos nucleicos en la sangre materna. Exactamente como se ha descrito en lo que antecede, la capacidad para amplificar cantidades significativas de ácido nucleico es un indicador de inestabilidad genómica. Un valor basal para la comparación de la extensión de la amplificación del ácido nucleico puede ser las cantidades de ácidos nucleicos de muestras normales conocidas. La cantidad de amplificación obtenida de muestras fetales se introduce en un continuo y el investigador debe analizar cualquier muestra dada en términos de la cantidad de ácido nucleico fetal producido en varios estados de enfermedad y en muestras normales.

Los procedimientos de la invención son útiles como procedimientos de detección selectiva diagnósticos. A menudo es deseable realizar pruebas de seguimiento en un paciente con el fin de confirmar un estado de enfermedad que se sospecha. Dichos procedimientos de seguimiento se determinan sobre la base del estado de enfermedad que se está analizando. Por ejemplo, se puede sugerir la realización de una colonoscopia en un caso en el que una muestra de heces sea positiva en la detección selectiva de acuerdo con los procedimientos de la invención. Dichos procedimientos de seguimiento se contemplan en la presente memoria descriptiva como parte de la invención.

Los procedimientos de la invención son útiles como detección selectiva de una amplia gama de cánceres o pre-cánceres. Además de los cánceres y adenomas de colon, los procedimientos de la invención son útiles para la detección selectiva de otras enfermedades, por ejemplo para la detección selectiva de linfomas, o cánceres o adenomas de estómago, pulmón, hígado, páncreas, próstata, riñón, testículos, vejiga urinaria, útero u ovario. Los procedimientos de la invención son especialmente útiles para la detección selectiva de cualquier enfermedad que altere la función adecuada del sistema gastrointestinal; más especialmente enfermedades del colon. Los procedimientos de la invención también son útiles para la detección selectiva de apoptosis en una muestra celular. El perfil de ADN amplificable en una muestra se correlaciona con proteínas que se han asociado con enfermedad. Por ejemplo, la regulación por aumento de la proteína de la apoptosis, survivina, se correlaciona con mayores cantidades de ADN amplificable, como el del oncogen Ras, además de otros oncogenes y sus productos génicos.

Los procedimientos de la invención son también útiles como ensayos de apoptosis. La presencia de fragmentos de alta integridad o de grandes cantidades de ácidos nucleicos en una muestra indica que la muestra derivaba de células que no habían pasado por la apoptosis. La ausencia de dichos fragmentos o cantidades indica que las células que contribuyeron a la muestra sí habían sufrido apoptosis. De acuerdo con esto, un ensayo de actividad apoptótica de la invención, bien solo o en combinación con otros ensayos de la inestabilidad genómica, es útil como detección selectiva de enfermedad.

Por último, los procedimientos de la invención se pueden llevar a cabo mediante captura híbrida. Por ejemplo, se puede usar la captura híbrida y el posterior análisis de los fragmentos capturados para determinar la integridad del ácido nucleico de una muestra.

La invención también proporciona un perfil de fragmentos de ácido nucleico indicativo de enfermedad. Un perfil preferido se obtiene mediante los procedimientos descritos en lo que antecede. Los perfiles preferidos comprenden ácidos nucleicos que tienen entre aproximadamente 200 pb y aproximadamente 2m6 Kb obtenidos en una muestra de pacientes, que comprende residuo celular de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva. Un perfil altamente preferido contiene al menos un ácido nucleico de al menos 1,3 Kb.

Otros objetos y ventajas de la invención son evidentes tras la consideración de las figuras siguientes y descripción detallada de las mismas.

## 50 Descripción de las figuras

La figura 1 es una fotografía de gel, que muestra los resultados de la amplificación del ADN de K-ras (exón 1) aislado de heces usando cebadores directos e inversos separados por aproximadamente 200 pb. La intensidad de la banda se refiere a la cantidad de producto de 200 pb o más en la muestra. Las calles 1-4 son los resultados de pacientes con cáncer o adenoma, la calle 5 es un control positivo, las calles 6-10 son de pacientes que no tenían cáncer o adenoma, las calles 11-12 son controles negativos y las calles 13-18 son patrones en el peso molecular aproximado indicado en la figura. Las amplificaciones se graduaron de A a C, siendo A la banda más intensa y c la menos intensa.

Las figuras 2-4 son fotografías de geles, que muestra los resultados de la amplificación del ADN de apc (exón 15) aislado de heces usando cebadores directos e inversos separados por aproximadamente 200 pb. La intensidad de la banda se refiere a la cantidad de producto de 200 pb o más en la muestra. Las calles 1-4 son los resultados de pacientes con cáncer o adenoma, la calle 5 es un control positivo, las calles 6-10 son de pacientes que no tenían cáncer o adenoma, las calles 11-12 son controles negativos y las calles 13-18 son patrones en el peso molecular aproximado indicado en la figura. Las amplificaciones se graduaron de A a C, siendo A la banda más intensa y c la menos intensa.

La figura 5 es una fotografía de gel, que muestra los resultados de la amplificación del ADN de p53 (exón 5) aislado de heces usando cebadores directos e inversos separados por aproximadamente 200 pb. La intensidad de la banda se refiere a la cantidad de producto de 200 pb o más en la muestra. Las calles 1-4 son los resultados de pacientes con

cáncer o adenoma, la calle 5 es un control positivo, las calles 6-10 son de pacientes que no tenían cáncer o adenoma, las calles 11-12 son controles negativos y las calles 13-18 son patrones en el peso molecular aproximado indicado en la figura. Las amplificaciones se graduaron de A a C, siendo A la banda más intensa y c la menos intensa.

5 La figura 6 es una fotografía de gel, que muestra los resultados de la amplificación del ADN de p53 (exón 7) aislado de heces usando cebadores directos e inversos separados por aproximadamente 200 pb. La intensidad de la banda se refiere a la cantidad de producto de 200 pb o más en la muestra. Las calles 1-4 son los resultados de pacientes con cáncer o adenoma, la calle 5 es un control positivo, las calles 6-10 son de pacientes que no tenían cáncer o adenoma, las calles 11-12 son controles negativos y las calles 13-18 son patrones en el peso molecular aproximado indicado en la figura. Las amplificaciones se graduaron de A a C, siendo A la banda más intensa y c la menos intensa.

15 La figura 7 es una fotografía de gel, que muestra los resultados de la amplificación del ADN de p53 (exón 8) aislado de heces usando cebadores directos e inversos separados por aproximadamente 200 pb. La intensidad de la banda se refiere a la cantidad de producto de 200 pb o más en la muestra. Las calles 1-4 son los resultados de pacientes con cáncer o adenoma, la calle 5 es un control positivo, las calles 6-10 son de pacientes que no tenían cáncer o adenoma, las calles 11-12 son controles negativos y las calles 13-18 son patrones en el peso molecular aproximado indicado en la figura. Las amplificaciones se graduaron de A a C, siendo A la banda más intensa y c la menos intensa.

20 La figura 9-10 son fotografías de geles de los resultados de la amplificación del ADN de muestras de heces usando cebadores directos e inversos separados por aproximadamente 1,8 Kb. La intensidad de la banda muestra la cantidad de producto de 1,8 Kb o mayor. Las calles 1, 8 y 9 son controles negativos, las calles 2, 3 y 5 son los resultados de pacientes con cáncer o adenoma, las calles 4, 6 y 7 son los resultados de pacientes que no tenían cáncer o adenoma y las calles 10-14 son los patrones del peso molecular.

25 Las Figuras 11A y B son fotografías de geles de los resultados de la amplificación de ADN en heces de un total de 30 pacientes y controles. La intensidad de la banda se refiere a la cantidad de ADN amplificable en la muestra. Las calles N son controles negativos, las calles 1, 3, 11 y 18 son los resultados de pacientes que son indicativos de la presencia de cáncer o adenoma, las calles 2, 4, 5-10, 12-17 y 19-30 son los resultados de pacientes que son indicativos de la ausencia de cáncer o adenoma. Las calles restantes son marcadores o patrones.

30 La Figura 12 muestra una representación esquemática de la colocación de los cebadores para amplificar en un procedimiento de la presente invención. En este procedimiento, un único dejador directo,  $F_1$ , se usa junto con una serie de dejadores inversos,  $R_1$  a  $R_6$ , escogidos para amplificar porciones de la diana progresivamente más largos.

35 La Figura 13 muestra una representación esquemática de la colocación de los cebadores para amplificar en un procedimiento de la presente invención. En este procedimiento se escoge una serie de pares de dejadores directos e inversos ( $F_1, R_1$ ) a ( $F_3, R_3$ ), para amplificar porciones de la diana separadas por intervalos a lo largo de la diana.

### Descripción detallada de la invención

40 La invención proporciona procedimientos para el análisis de muestras biológicas. Los procedimientos de la invención proporcionan información diagnósticamente relevante para la integridad de los ácidos nucleicos en una muestra biológica. Las muestras biológicas normales (aquellas que no presentan indicios del cáncer o pre-cáncer que se está buscando), especialmente aquellas que comprenden tejido y/o fluido luminal, normalmente comprenden una mayoría de ácidos nucleicos (especialmente ADN) de fragmento corto y baja integridad, que son el resultado de la degradación mediante apoptosis. Cuando una mutación ha producido inestabilidad genómica se puede alterar el ciclo celular normal y puede que no se produzca la degradación apoptótica a la velocidad esperada en una muestra normal. Los procedimientos de la invención buscan dichas alteraciones.

50 Como consecuencia, los procedimientos preferidos de la invención comprenden determinar una cantidad de ácido nucleico amplificable en una muestra biológica y determinar si la cantidad es consistente con una cantidad esperada en una muestra normal.

55 En muchas muestras biológicas, especialmente muestras heterogéneas, puede no haber producto de amplificación detectable. Esto es especialmente cierto cuando se usan fragmentos más largos como moldes para amplificación. Generalmente, la probabilidad de que cualquier conjunto dado de cebadores para PCR amplifique un fragmento de ADN que tenga una longitud superior a la distancia del cebador se expresa como

$$60 \quad \% \text{ de Fragmentos amplificados} = (LF-DC)/(LF+DC)$$

en la que LF es la longitud del fragmento (en pares de bases) y DC es la distancia al cebador (en pares de bases). Esta ecuación supone que las longitudes del fragmento de ADN de la muestra se distribuyen de forma uniforme (es decir, no hay un locus preferido en el que se produce la rotura).

65 En una forma de realización preferida, los procedimientos de la invención comprenden amplificar secuencias de diferente longitud en una muestra, si están presentes, con el fin de generar un perfil de productos de amplificación indicativo de enfermedad o de la propensión sufrir la enfermedad. En un procedimiento preferido, una muestra se

## ES 2 329 543 T3

5 expone a un conjunto de cebadores para PCR que comprende un único cebador directo, que puede ser una sonda de captura usada para capturar fragmentos diana, y una pluralidad de cebadores inversos en 3' que hibridan con porciones de una secuencia contigua (si está presente) en la muestra. Las amplificaciones que usan estos cebadores tendrán como resultado una serie de productos de amplificación, cada uno con una longitud diferente, su la secuencia diana contigua está presente en la muestra. La longitud de los productos de amplificación se determina mediante los espacios entre el cebador directo y cada uno de los cebadores inversos en 3'. Un ejemplo se muestra en la Figura 12, que es una representación esquemática que muestra la colocación de los cebadores para amplificación.

10 Si la secuencia diana, o una porción de ella, está presente en la muestra, la amplificación tendrá como resultado una serie de fragmentos cuya longitud viene dictada por la espaciación de los cebadores. De acuerdo con los principios aducidos en lo que antecede, una muestra de un paciente enfermo producirá un perfil de productos de amplificación en el ensayo descrito en lo que antecede que difiere del perfil obtenido de una muestra que contiene los fragmentos más pequeños que se espera que se produzcan como resultado de la apoptosis normal. En una forma de realización preferida, el cebador directo está diseñado para hibridar aproximadamente 200 pb en 5' del primer cebador inverso y aproximadamente 2,3 Kb en 5' del último cebador inverso. Otros cebadores inversos están diseñados para hibridar en varias localizaciones entre el primer y último cebadores inversos. Intervalos preferidos entre el cebador directo y los diversos cebadores inversos son 200 pb (F<sub>1</sub>-R<sub>1</sub>), 400 pb (F<sub>1</sub>-R<sub>2</sub>), 800 pb (F<sub>1</sub>-R<sub>3</sub>), 1,3 Kb, (F<sub>1</sub>-R<sub>4</sub>), 1,8 Kb (F<sub>1</sub>-R<sub>5</sub>) y 2,3 Kb (F<sub>1</sub>-R<sub>6</sub>). El número y espaciación de los cebadores inversos se escoge a la conveniencia del experto en la técnica.

20 También en una forma de realización preferida se usa una sonda de captura de híbridos para anclar una secuencia diana, preferentemente sobre un soporte sólido (p. ej., esferas). Después, una pluralidad de sondas se colocan a varias distancias en 3' de la sonda de captura. Dichas sondas pueden ser pares de cebadores directos e inversos como se ha tratado en lo que antecede, o pueden ser sondas de amplificación de señal, como las usadas en la reacción en cadena de la ligasa (LCR), y otras usadas en la identificación de secuencias. La pluralidad de sondas hibridan a lo largo de la longitud de un fragmento diana si la diana está presente en la muestra. Por tanto, analizando las muestras la presencia de las sondas, se puede determinar la integridad de las secuencias presentes en la muestra. Esto se puede realizar de numerosas formas, incluidas, entre otras, captura de híbridos, PCR, LCR, desplazamiento de hebras, cadena ramificada u otros ensayos conocidos en la técnica que incorporan sondas o cebadores híbridos con el fin de identificar o cuantificar la secuencia. Una muestra que contiene ácidos nucleicos intactos (de integridad elevada) representa una detección selectiva positiva de acuerdo con la invención. En una forma de realización, la muestra se introduce en pocillos (p. ej., en una placa de 96 pocillos) que contiene sonda de captura unida al soporte. La sonda de captura inmoviliza una secuencia diana, si está presente en la muestra. Las sondas que hibridan con la secuencia en 3' de la sonda de captura (sondas en 3') se colocan en cada pocillo, de modo que cada sonda en 3' se espacia una distancia única de la sonda de captura común y cada pocillo sólo contiene un tipo de sonda en 3'. A continuación se genera una señal mediante, por ejemplo, amplificación, o mediante procedimiento ELISA estándar, seguido por amplificación, o por LCR, y otros procedimientos mencionados en lo que antecede. La presencia de señal en cada pocillo indica la presencia de secuencia de al menos la longitud entre la sonda de captura y la sonda en 3'. En una forma de realización alternativa, cada pocillo recibe múltiples sondas en 3' diferentes, que pueden estar marcadas claramente, y la presencia del indicador(es) se correlaciona con la longitud de la secuencia presente en la muestra.

45 Una muestra de un paciente que tiene, por ejemplo, cáncer producirá amplicón entre la mayoría o todos los pares de cebadores (en función de, entre otras cosas, la longitud de los fragmentos diana, de la espaciación de los cebadores y de donde en la diana se espacian los cebadores). Tal perfil representa una detección selectiva positiva de la enfermedad o de la propensión a sufrir la enfermedad. Una muestra de un paciente que no tiene indicios de enfermedad tiene como resultado poco o ningún producto de amplificación en el ensayo descrito en lo que antecede. En una detección selectiva negativa, puede haber amplificación de fragmentos pequeños (p. ej., 200 pb), pero no debería haber amplificación de fragmentos más grandes (es decir, fragmentos resultantes de amplificación entre el cebador directo y los cebadores inversos separados). En los diagnósticos de cáncer, el fragmento diana puede ser, opcionalmente, un oncogen, un supresor tumoral o cualquier otro marcador asociado con cáncer. No obstante, no es necesario usar marcadores asociados con cáncer en los procedimientos de la invención, dado que dichos procedimientos se basan en el reconocimiento general de que las muestras indicativas de enfermedad contienen una mayor cantidad de ácidos nucleicos intactos y una mayor cantidad de ácidos nucleicos de fragmento largo. De acuerdo con esto, en los procedimientos de la invención se puede usar cualquier locus de ácido nucleico diana conveniente.

55 Las reacciones de amplificación descritas en lo que antecede se pueden realizar de acuerdo con cualquier protocolo adecuado o conveniente y el tamaño de fragmento de los productos de amplificación resultantes (si existen) puede determinarse mediante cualquier medio adecuado o conveniente.

60 En una forma de realización alternativa, los procedimientos de la invención comprenden realizar una serie de reacciones de amplificación con un fragmento diana de ácido nucleico contiguo, en el que cada reacción de aplicación comprende un cebador directo y un cebador inverso, de modo que los cebadores directos e inversos están separados a intervalos en un fragmento contiguo que se sospecha que está en la muestra. Un ejemplo de esta disposición se muestra en la figura 13. Preferentemente, los espacios entre cada par de cebadores directo e inverso son equivalentes. En una detección selectiva positiva, el ensayo descrito en lo que antecede tendrá como resultado una serie de fragmentos del mismo tamaño para la mayoría, si no todos, los pares de cebadores. Tal disposición de los productos de amplificación pone de manifiesto una secuencia diana contigua indicativa de enfermedad (véase en lo que antecede). Una muestra de un paciente libre de enfermedad debería producir pocos o ningún producto de amplificación, pero en ningún caso

producirá la disposición contigua de los productos de amplificación que se espera de una muestra que contiene una secuencia diana diagnóstica relativamente intacta,

5 Cada uno de los procedimientos descritos en lo que antecede se basa en el principio de que un ácido nucleico intacto, o un segmento de un ácido nucleico intacto, en una muestra es diagnóstico. Por tanto se contemplan variaciones de los procedimientos descritos en lo que antecede.

10 Dichas variaciones incluyen la introducción de cebadores, el número de cebadores usado, la secuencia diana, el procedimiento para identificar secuencias, y otras. Por ejemplo, en el procedimiento representado en la figura 13 y descrito en lo que antecede, no es necesario que el número de cebadores directos e inversos sea igual. Por ejemplo, un cebador directo puede usarse para amplificar fragmentos entre dos cebadores inversos. Otras variaciones en la introducción del par de cebadores se encuentran dentro de la técnica, como también los detalles de las reacciones de amplificación que se van a realizar. Por último, como se representa en las Figuras 12 y 13, en los procedimientos de la invención se pueden usar sondas de captura con el fin de aislar una secuencia diana escogida.

15 Los ejemplos siguientes proporcionan detalles adicionales de los procedimientos de acuerdo con la invención. Con el fin de proporcionar ejemplos, los siguientes ejemplos proporcionan detalles del uso del procedimiento de la presente invención en la detección del cáncer de colon. De acuerdo con esto, aunque se proporcionan ejemplos de la siguiente manera, la invención no está tan limitada y el experto en la técnica apreciará su amplia gama de aplicación tras consideración de la misma.

#### *Procedimiento de ejemplo para la detección del cáncer de colon*

25 El ejemplo siguiente se refiere a la detección selectiva del cáncer de colon en muestras de heces expulsadas. Sobre la base de los principios sobre los que se basa la invención (véase lo que antecede), se puede realizar el mismo análisis con otras muestras, como las mencionadas en lo que antecede, con los mismos resultados que se muestran en la presente memoria descriptiva.

30 Para el análisis de las muestras de heces, los procedimientos preferidos de la invención comprenden obtener al menos una porción transversal o circunferencial de heces expulsadas como se indica en la patente de EE.UU. n° 5.741.650, y de la solicitud de patente pendiente de tramitación y de co-propiedad de EE.UU. número 09/059.718. Aunque es deseable una porción transversal o circunferencial de heces, los procedimientos que se proporciona en la presente memoria descriptiva se realizan con muestras aleatorias obtenidas de heces expulsadas, que incluye frotis o raspados. Una vez obtenida, el espécimen de heces se homogeneiza. Un tampón preferible para homogeneización es uno que contiene al menos ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 16 mM. No obstante, como se instruye en la solicitud de patente pendiente de tramitación, co-propiedad de EE.UU. n° de serie 60/122.177, se ha descubierto que el uso de EDTA de al menos 150 mM mejora considerablemente el rendimiento de ácido nucleico en las heces. Por tanto, un tampón preferido para la homogeneización de heces comprende solución salina tamponada con fosfato, NaCl o KCl 20-100 mM, EDTA al menos 150 mM, y, opcionalmente, un detergente (tal como SDS) y una proteinasa (p. ej., proteinasa K).

40 Tras la homogeneización, preferentemente el ácido nucleico se aísla de la muestra de heces. El aislamiento o extracción de ácido nucleico no se requiere en todos los procedimientos de la invención, ya que ciertas técnicas de detección pueden realizarse de forma adecuada en heces homogeneizadas sin aislamiento de ácidos nucleicos. No obstante, en una forma de realización preferida, las heces homogeneizadas se agitan para crear un sobrenadante que contiene ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y otros residuos celulares. El sobrenadante se trata con un detergente y con proteinasa para degradar las proteínas y el ácido nucleico se extrae con fenol-cloroformo. Los ácidos nucleicos extraídos se precipitan después con alcohol. Otras técnicas se pueden usar para aislar ácido nucleico de la muestra. Dichas técnicas incluyen captura de híbridos y amplificación directamente desde las heces homogeneizadas. Los ácidos nucleicos se pueden purificar y/o aislar en la medida requerida por el ensayo de detección selectiva que se va a emplear. El ADN total se aísla usando técnicas conocidas en la ciencia.

#### *Protocolo de ensayo de detección selectiva*

55 El tamaño de los fragmentos de ADN humano obtenidos en lo que antecede se puede determinar por numerosos medios. Por ejemplo, el ADN humano se puede separar usando electroforesis en gel. Se prepara un gel de agarosa al 3% usando técnicas conocidas en la ciencia. Véase Ausubel *et. al.*, Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1195, pág. 2-23-2-24. El tamaño de los fragmentos de ADN humano se determina después mediante comparación con patrones conocidos. Los fragmentos superiores a aproximadamente 200 pb proporcionan una detección selectiva positiva. Aunque se puede establecer un diagnóstico sobre la base de la detección selectiva sola, a los pacientes que presentan una detección selectiva positiva se les aconseja que busquen pruebas de seguimiento para obtener un diagnóstico confirmado.

65 Un medio preferido para determinar la longitud de los fragmentos de ADN humano usa la PCR. Los procedimientos para implementar la PCR son bien conocidos. En la presente invención, los fragmentos de ADN humano se amplifican usando cebadores específicos humanos. El amplicón superior a aproximadamente 200 pb producido mediante PCR representa una detección selectiva positiva. Otras reacciones y modificaciones de amplificación de la PCR, tales como la reacción en cadena de la ligasa, PCR de fase inversa, Q-PCR y otras, se pueden usar para producir niveles detectables de amplicón. El amplicón puede detectarse mediante acoplamiento con un indicador (p. ej., fluorescencia,

## ES 2 329 543 T3

radioisótopos, y similares), mediante secuenciación, mediante electroforesis en gel, mediante espectrometría de masas o mediante cualquier otro medio conocido en la técnica, con la condición de que la longitud, peso u otra característica de los amplicones se identifique por tamaño.

### 5 Ejemplos

Se realizaron experimentos para determinar si las características de ADN amplificable en heces eran predictivas de cáncer o pre-cáncer en pacientes de los que se obtuvieron las muestras de heces. En el primer experimento, la cantidad de ADN amplificable se midió en cada una de las diversas muestras de heces usando amplificación por PCR para detectar fragmentos de ADN en la muestra de una longitud de al menos 200 pares de bases. El segundo experimento determinó la cantidad de fragmentos largos (superiores a 200 pares de bases) en las mismas muestras y después determinó las proporciones entre producto largo y producto corto. El tercer experimento determinó un perfil de productos de amplificación con longitudes de fragmento de ácido nucleico de 200 pb, 400 pb, 800 pb, 1,3 Kb, 1,8 Kb y 2,4 Kb. Los experimentos cuarto y quinto fueron estudios clínicos que correlacionaron la integridad de los ácidos nucleicos en muestras de heces de pacientes con el estado de enfermedad global del paciente.

#### Ejemplo 1

Se recogieron muestras de heces de 9 pacientes que presentaron síntomas o una historia clínica que indicaba que se debía realizar una colonoscopia. Cada muestra de heces se congeló. Inmediatamente después de proporcionar una muestra de heces, a cada paciente se le realizó una colonoscopia con el fin de determinar el estado de enfermedad del paciente. Sobre la base de los resultados de la colonoscopia, y los posteriores análisis histológicos de muestras de biopsia tomadas durante la colonoscopia, los individuos fueron asignados a uno de dos grupos: normal o anormal. EL grupo anormal constaba de pacientes con cáncer o con un adenoma de al menos 1 cm de diámetro. Sobre la base de estos resultados, 4 de los 9 pacientes se asignaron al grupo anormal.

Las muestras se sometieron a detección selectiva mediante captura híbrida de ADN humano y determinación de la cantidad de ADN amplificable que tiene al menos 200 pares de bases. Cada espécimen de heces congeladas, de un peso de 7-33 gramos, se descongeló y homogeneizó en Tris 500 mM, EFTA 16 mM y NaCl 10 mM a pH 9,0 a una proporción volumen-masa de 3:1. Después, las muestras se volvieron a homogeneizar en el mismo tampón hasta una proporción volumen final-masa de 20:1 y se agitaron en macroesferas de cristal a 2356 g. El sobrenadante se recogió y trató con SDS y proteinasa K. Después, el ADN se extrajo con fenol-cloroformo y se precipitó con alcohol. El precipitado se suspendió en Tris 10 mM y EDTA 1 mM (1 x TE) a pH 7,4. Por último, el ADN se trató con ARNasa.

El ADN humano se aisló en el precipitado mediante captura de híbridos específica de secuencia. Se usaron sondas biotiniladas frente a porciones de los genes p53, K-ras, y apc.

La sonda de K-ras fue

5'GTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACCTTATGTGTGAC 3' (SEC ID N°: 1).

Existían dos sondas de apc: apc-1309 fue

5'TTCCAGCTGTCACAGCACCCCTAGAACCAAATCCAG3' (SEC ID N° 2) y apc-1378 fue 5'CAGATAGCCCT GGACAAACAATGCCACGAAGCAGAAG3' (SEC ID N° 3).

Existían cuatro sondas contra p53, la primera (hibrida con una porción del exón 5) fue

5'TACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGG3' (SEC ID N° 4), la segunda (que hibrida con una porción del exón 7) fue 5'ATTTCTTCCATACTACTACCCATCGACCTCTCATC3' (SEC ID N° 5), la tercera, que también hibrida con una porción del exón 7, fue 5'ATGAGGCCAGTGCGCCCTTGGGGAGACCTGTGGCAAGC3' (SEC ID N° 6); y, por último, una sonda frente al exón 8 tenía la secuencia 5'GAAAGGACAAGGGTGGTTGGGA GTAGATGGAGCCTGG3' (SEC ID N° 7).

A una suspensión que contiene 300  $\mu$ l de ADN se añadió una alícuota de 10  $\mu$ l de cada sonda (20 pmol/captura) en presencia de 310  $\mu$ l de tampón GITC 6M durante 2 horas a temperatura ambiente. Los complejos de híbrido se aislaron usando esferas de estreptavidina (Dynal). Después de lavar, los complejos sonda-esfera se suspendieron a 25°C durante 1 hora en 0,1 x tampón TE a pH 7,4. La suspensión se calentó después durante 4 minutos a 85°C y se retiraron las esferas.

A continuación, el ADN capturado se amplificó usando PCR, esencialmente como se ha descrito en la patente de EE.UU. N° 4.683.202. Cada muestra se amplificó usando cebadores directos e inversos a través de 7 loci (Kras, exón 1, APC exón 15 (3 loci distintos), p53, exón 5, p53, exón 7 y p53, exón 8) por duplicado (para un total de 14 amplificaciones para cada locus). Se realizaron siete PCR distintas (40 ciclos cada una) por duplicado usando cebadores dirigidos a detectar fragmentos en la muestra que tienen 200 pares de bases o más. En ADN amplificado se introdujo en un gel al 40% Nusieve (FMC Biochemical) (3% Nusieve, 1% afarosa) y se tiñó con bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/ml). En ADN amplificado resultante se graduó sobre la base de la intensidad relativa de los geles teñidos. Los resultados se muestran en las Figuras 1-7. Cada figura representa los resultados para los 9 pacientes (incluidos

## ES 2 329 543 T3

los patrones) para los siete loci diferentes que se amplificaron. Como se muestra en las Figuras, cada muestra de un paciente con cáncer o adenoma se detectó en forma de una banda que tiene una intensidad significativamente mayor que las bandas asociadas con las muestras de pacientes que no tenían cáncer ni pre-cáncer. Los cuatro pacientes con cáncer/adenoma identificados usando colonoscopia se identificaron correctamente mediante la determinación de la cantidad de ADN amplificable de 200 pares de bases o de mayor longitud. Como se muestra en las figuras 1-7, los resultados fueron los mismos con independencia de qué locus se amplificó. De acuerdo con esto, la cantidad de ADN de 200 pb o más en una muestra fue predictiva del estado de enfermedad del paciente.

### Ejemplo 2

Se realizó un experimento que fue esencialmente idéntico al descrito en lo que antecede en el Ejemplo 1, pero se introdujeron cebadores directos e inversos de modo que se amplificaran los fragmentos de aproximadamente 1,8 Kb y mayores.

El ADN se preparó como se ha descrito en lo que antecede. Los cebadores directos e indirectos se espaciaron de modo que hibridaran con una separación de aproximadamente 1,8 Kb en tres loci diferentes (Kras, exón 1, APC, exón 15, and p53 exón 5). Se realizaron treinta y tres rondas de amplificación y el ADN resultante se colocó en un gel de agarosa al 3%. Los resultados se muestran en las figuras 8-10. Como se muestra en las figuras (que muestran los resultados de tres experimentos distintos para amplificar y detectar producto "largo"), las muestras de individuos que tienen cáncer o pre-cáncer produjeron grandes cantidades de ADN de peso molecular alto (en este caso 1,8 Kb y mayores); mientras que las muestras de pacientes que no tenían cáncer o pre-cáncer no produjeron ADN en el intervalo de aproximadamente 1,8 Kb y mayores. Por tanto, la presencia de ADN de alto peso molecular era indicativo del estado de enfermedad del paciente.

### Ejemplo 3

Se realizó un experimento para determinar el perfil de peso molecular de ADN de muestras recogidas y preparadas como parte de un estudio ciego con 30 pacientes que acudieron a la Clínica Mayo con sospecha de trastornos gastrointestinales. Se obtuvieron muestras de heces y el ADN se aisló como se ha descrito en lo que antecede.

Antes de la amplificación, el ADN se aisló de las muestras mediante captura híbrida. Se usaron sondas biotiniladas frente a porciones de los genes BRCA1, BRCA2, p53, APC.

La sonda BRCA1 fue

5'GATTCTGAAGAACCAACTTTGTCCCTTAAGTAGCTCTT3' (SEQ ID NO: 8).

La sonda BRCA2 fue

5'CTAAGTTTGAATCCATGCTTTGCTCTTCTTGATTATT3' (SEC ID N° 9).

La sonda APC1 fue

5'CAGATAGCCCTGGACAAACCATGCCACCAAGCAGAAG3' (SEC ID N° 10).

La sonda p53, que hibrida con una porción del exón 5, fue

5'TACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGG3' (SEC ID N° 4).

La sonda APC2 fue

5'GAAGTTCCTGGATTTTCTGTTGCTGGATGGTAGTTGC3' (SEC ID N° 11).

Una alícuota de 300  $\mu$ l de la muestra se introdujo en 300  $\mu$ l de tampón isotiocianato de guanidina 6M con 10  $\mu$ l de cada sonda de captura y se incubó durante la noche a 25°C. El ADN capturado se aisló usando 100  $\mu$ l de esferas de captura durante una hora a temperatura ambiente.

El ADN eluyó de las esferas y se amplificó mediante PCR en las condiciones convencionales de PCR.

De acuerdo con los procedimientos de la invención, se realizaron reacciones de amplificación usando cebadores directos e inversos a través de los 5 loci para cada muestra. Los cebadores directos e inversos se espaciaron para amplificar fragmentos de 200 pb, 400 pb, 800 pb, 1,3 Kb, 1,8 Kb y 2,4 Kb. Cada una de 30 reacciones de PCR se realizó durante 36 ciclos. El amplicón se pasó a un gel de Seakeam al 3% y se tiñó con bromuro de etidio. Los resultados se muestran en las figuras 11A y 11B. Cada figura representa los resultados para 15 de los 30 pacientes.

Como se muestra en dichas figuras, los pacientes con cáncer o adenoma tienen un mayor rendimiento de ADN amplificable. Esto es especialmente cierto al nivel de 1,8 Kb y mayores. Por tanto, los pacientes con cáncer o adenoma no sólo producen más ADN amplificable en sus heces, sino que también producen fragmentos de ADN más grandes

## ES 2 329 543 T3

que los producidos en las heces de pacientes que no tienen cáncer. Por tanto, un mayor rendimiento de ADN amplifiable y la presencia de ADN de alto peso molecular, especialmente de 1,8 Kb y mayor, fueron indicativos del estado de enfermedad del paciente.

### 5 Ejemplo 4

En este ejemplo, los procedimientos de la invención se correlacionaron con el desenlace clínico en numerosos pacientes que tenían un adenoma colorrectal o cáncer colorrectal diagnosticado usando colonoscopia, y 79 pacientes a los que no se les diagnosticó cáncer o adenoma colorrectal. Se obtuvo una muestra de heces de cada uno de estos  
 10 pacientes y se preparó tal como se ha descrito en lo que antecede. Los fragmentos de los 5 loci diferentes a los que se hace referencia en lo que antecede se amplificaron usando cebadores separados por 200, 400, 800, 1300, 1800, y 2400 pares de bases usando el protocolo descrito en lo que antecede en el Ejemplo 2. Cada amplificación se puntuó de modo que la amplificación con éxito de un fragmento recibía una puntuación de 1 y la falta de amplificación recibía una puntuación de 0. El corte para una detección selectiva positiva se estableció en 21. Los resultados se muestran a  
 15 continuación.

TABLA 1

Normales		
Nº de pacientes	Edad	Puntuación
P-178	64	19
P-185	50	18
P-033	56	16
P-177	67	14
P-055	75	13
P-029	70	12
P-079	63	12
P-066	72	11
P-027	65	10
P-054	72	9
P-158	59	9
P-043	56	8
P-009	73	7
P-030	86	2
P-032	51	1
P-068	58	1
P-187	63	1
P-018	68	0
P-186	61	17
P-135	67	14
P-120	75	13
P-179	76	9
P-057	56	7
P-143	65	6
P-136	58	1
P-012	75	0

# ES 2 329 543 T3

TABLA 2

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

Adenomas		
Nº de pacientes	Edad	Puntuación
P-003		29
P-001		23
P-045		22
P-162		21
P-163		16
P-088		15
P-050		13
P-060		11
P-061		11
P1058		10
P-075		10
P-077		8
P-024		7
P-056		7
P-067		7
P-025		6
P-080		4
P-123		4
P-048		3
P-040		2
P-006		1
P-004		0
P-015		0
P-083		0
P-047		
P-129		

# ES 2 329 543 T3

TABLA 3

Carcinomas		
Nº de pacientes	Edad	Puntuación
P-064		30
P-103		30
P-104		30
P-108		30
P-101		29
P-102		29
P-099		28
P-107		28
P-110		26
P-098		25
P-134		24
P-062		23
P-090		23
P-095		23
P-093		22
P-100		21
P-122		18
P-084		15
P-109		15
P-118		10
P-138		10
P-091		8
P-096		8
P-053		7
P-119		6
P-117		5
P-105		0
P-097		

Como se muestra en lo que antecede, los procedimientos de la invención son eficaces en la detección selectiva de la presencia de cáncer y adenoma colorrectal.

### Ejemplo 5

En este ejemplo, los procedimientos de la invención se usaron para detectar cánceres no colónicos en 28 pacientes.

Se obtuvo una muestra de heces de cada uno de los 28 pacientes. La muestra se preparó como se ha descrito en lo que antecede. Los fragmentos de los 5 loci diferentes a los que se ha hecho referencia en lo que antecede se

## ES 2 329 543 T3

amplificaron usando cebadores separados por 200, 400, 800, 1300, 1800 y 2400 pares de bases usando el protocolo descrito en lo que antecede en el Ejemplo 3. Cada amplificación se puntuó de modo que la amplificación con éxito de un fragmento recibía una puntuación de 1 y la falta de amplificación recibía una puntuación de 0.

- 5 Dado que cinco loci se analizaron usando 6 pares de cebadores cada uno, la puntuación máxima obtenible fue 30 (amplificación con éxito de los 6 fragmentos en los cinco loci). Como corte entre pacientes enfermos y no enfermos se usó una puntuación de 21. Los resultados se muestran a continuación.

10

TABLA 4

Cánceres supercolónicos			
Nº de paciente	Cáncer supercolónico	Edad	Puntuación
P-145	Páncreas	68	30
P-164	CA de pulmón	68	30
P-166	Conducto biliar	52	30
P-189	Conducto biliar	43	30
P-190	CA de pulmón	50	30
P-019	Hallazgos atípicos en el estómago	71	29
P-152	CA de pulmón	77	28
P-167	Páncreas	72	28
P-011	CA de pulmón	73	27
P-153	Páncreas	65	27
P-165	CA de pulmón	85	27
P-170	Duodeno	65	27
P-182	Esófago de Barrett	58	27
P-146	Conducto biliar	63	26
P-081	Esófago de Barrett	74	26
P-151	Páncreas	49	25
P-155	CA de pulmón	60	25
P-156	CA de pulmón	57	25
P-150	Páncreas	78	23
P-149	Esófago	59	19
P-154	Esófago	80	19
P-169	Páncreas	71	19
P-168	CA de pulmón	63	18
P-180	Páncreas	67	13
P-144	Esófago	59	9
P-147	Estómago	57	7
P-148	Estómago	69	6
P-171	Esófago	76	0

65

## ES 2 329 543 T3

Como se ha mostrado en lo que antecede, los procedimientos de la invención detectaron con éxito 18 de 27 pacientes que en realidad tenían cáncer no colónico. Sólo en un paciente se produjo un diagnóstico erróneo como que tenía cáncer cuando no tenía. Por tanto, los procedimientos de la invención son útiles para diagnóstico no invasivo de un estado de enfermedad cancerosa no especificada en un paciente.

5

El umbral de 21 para una detección positiva selectiva se puede modificar para adecuarse a las sensibilidades y especificidades deseadas. Por ejemplo, si 18 fueran los falsos negativos, se evitarían los resultados que se muestran en la tabla 4. El experto en la técnica sabe cómo establecer los umbrales en función del paciente (p. ej., un umbral menor para pacientes con síntomas que para pacientes que no presentan síntomas), la enfermedad que se está diagnosticando y el nivel deseado de sensibilidad y especificidad. Con independencia del mural, el principio de la invención sigue siendo que la integridad del ácido nucleico es un marcador viable de enfermedad, y especialmente de cáncer.

10

Además, la propensión a sufrir enfermedad puede medirse usando procedimientos de la invención. Por ejemplo, se puede usar el perfil periódico del peso molecular de acuerdo con los procedimientos de la invención para monitorizar el estado de enfermedad de un paciente que presenta síntomas mínimos o ninguno. Tal monitorización longitudinal determinará si un paciente está progresando con cantidades crecientes de ácidos nucleicos de integridad elevada, lo que indica que es deseable una exploración de seguimiento.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para la detección selectiva en un paciente de cáncer o pre-cáncer, en el que el procedimiento comprende:

determinar la integridad de los ácidos nucleicos en una muestra de heces de un paciente, que comprende células desprendidas o residuo celular; e identificar una detección selectiva positiva como una muestra en la que la integridad de los ácidos nucleicos supera un umbral pre-determinado, o identificar en dicho paciente como que tiene cáncer o pre-cáncer si están presentes ácidos nucleicos en dicha muestra en una cantidad superior a un umbral pre-determinado.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la integridad de los ácidos nucleicos se detecta mediante la determinación de una cantidad de ácido nucleico del paciente en una muestra de heces del paciente;

15 comparación de dicha cantidad con una cantidad estándar de ácido nucleico que se prevé que esté presente en una muestra negativa para la enfermedad; y detección de la enfermedad en dicho paciente como una cantidad de ácido nucleico del paciente superior a dicha cantidad convencional.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la integridad de los ácidos nucleicos se detecta mediante:

20 (a) amplificación del ácido nucleico de un paciente en una muestra de heces obtenida de un paciente;

(b) determinación de una cantidad de ácido nucleico amplificado obtenido en la etapa (a); y

25 (c) identificación de una detección selectiva positiva cuando dicha cantidad de ácido nucleico amplificado es superior a una cantidad de ácido nucleico amplificado que se espera en una muestra negativa para la enfermedad.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo constituido por cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer hepático y linfoma.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho ácido nucleico se selecciona del grupo constituido por los genes K-ras, p53, apc, dcc, de supresión tumoral y oncogenes.

35 6. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho ácido nucleico tiene una longitud de al menos 200 pares de bases.

7. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho ácido nucleico tiene una longitud de al menos 400 pares de bases.

40 8. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho ácido nucleico tiene una longitud de al menos 800 pares de bases.

9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho ácido nucleico tiene una longitud de al menos 1,3 Kb.

45 10. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho ácido nucleico tiene una longitud de al menos 1,8 Kb.

50 11. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho ácido nucleico tiene una longitud de al menos 2,4 Kb.

12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho cáncer es cáncer de colon.

55 13. Un procedimiento para la detección selectiva de cáncer o pre-cáncer mediante determinación de la integridad de ácidos nucleicos en una muestra de heces de un paciente, en el que el procedimiento comprende las etapas tal y como se indican en una cualquiera de las formas de realización (A) o (B):

60 (A) seleccionar una pluralidad de loci genómico;

realizar una reacción de amplificación de cada uno de dichos loci;

identificar una detección selectiva positiva como una muestra en la que el número de loci

65 producir un producto de amplificación que supera un umbral pre-determinado;

## ES 2 329 543 T3

(B) seleccionar una pluralidad de loci genómico;

realizar una reacción de amplificación de cada uno de dichos loci;

5 asignar una primera puntuación numérica a cada locus en el que tenga lugar amplificación; asignar una segunda puntuación numérica a cada locus en el que no tenga lugar amplificación;

10 determinar si un total de dicha primera puntuación numérica supera un total de dicha segunda puntuación numérica en una cantidad umbral, de modo que se realiza la detección selectiva de dicha muestra de cáncer o pre-cáncer.

14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo constituido por cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer hepático y linfoma.

15. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho cáncer es cáncer de colon.

20

25

30

35

40

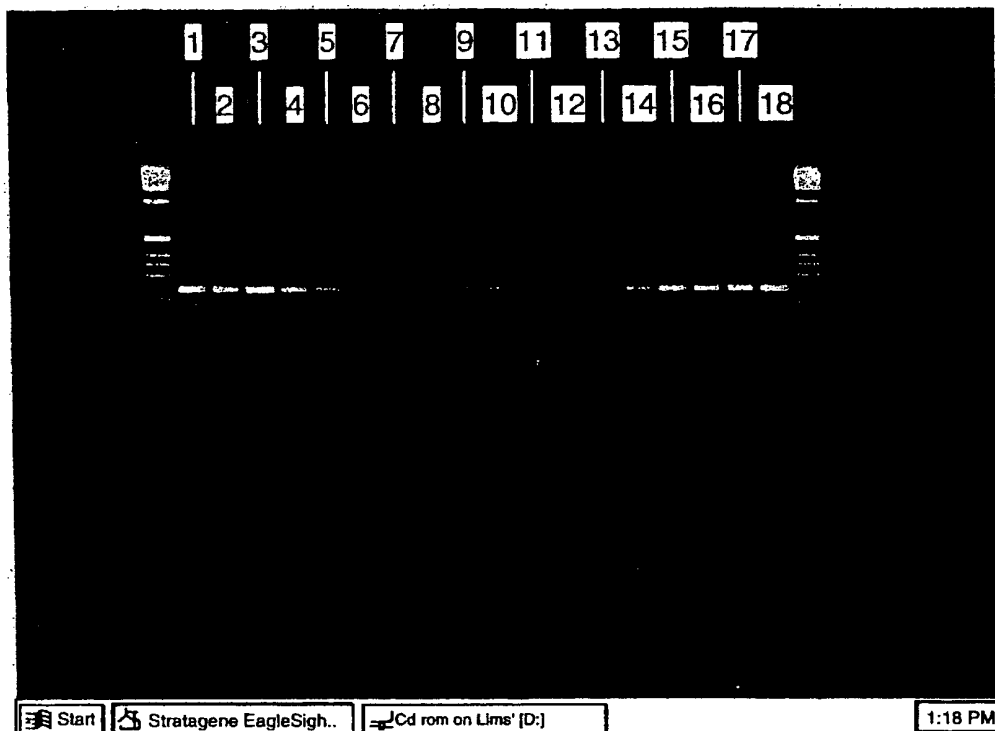
45

50

55

60

65



33 CICLOS DE AMPLIFICACIONES DE 200 pb CALLE	Q Nº	TIPO DE MUESTRA	NÚMERO DE MUESTRA	GRADO
1	7903,8	ANORMAL	1	A
2	5627,4	ANORMAL	2	A
3	8809,11	ANORMAL	3	A
4	5421,94	ANORMAL	4	A
5	1838,07	CONTROL POSITIVO		B
6	-549,23	NORMAL	5	C
7	-715	NORMAL	6	C
8	-1605,13	NORMAL	7	C
9	-824,73	NORMAL	8	C
10	259,77	NORMAL	9	C
11		CONTROL NEGATIVO	-	
12		CONTROL NEGATIVO	-	
13	400	400	PATRÓN	
14	2000	2000	PATRÓN	
15	4000	4000	PATRÓN	
16	6000	6000	PATRÓN	
17	8000	8000	PATRÓN	
18	10000	10000	PATRÓN	

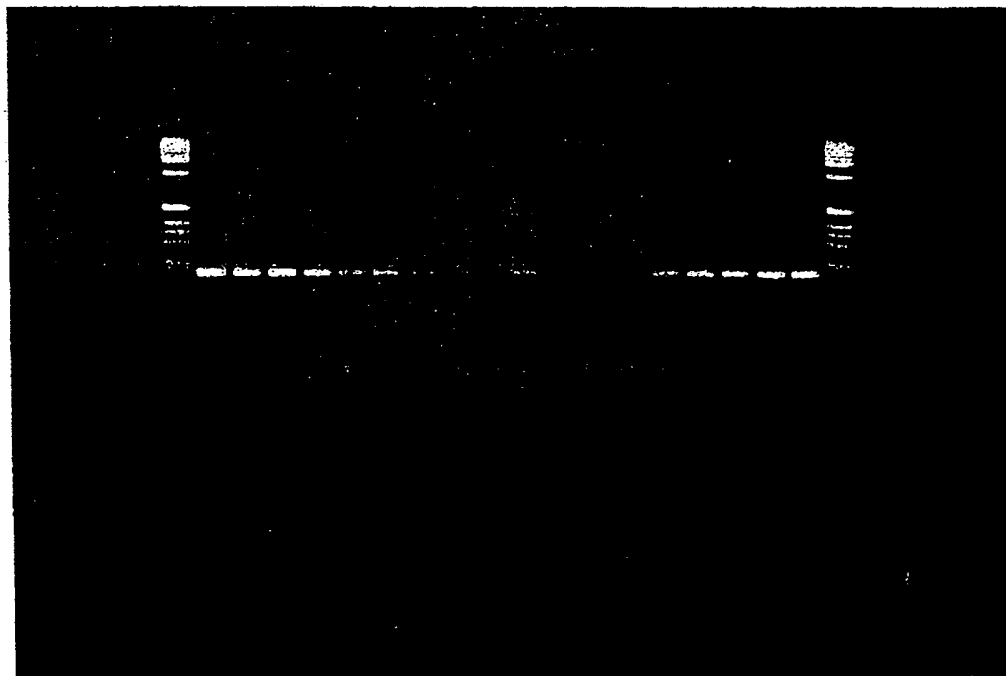
A= > 2000

B= 500-2000

C= < 500

FIG. 1

2 4 6 8 10 12 14 16 18  
 1 | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 | 13 | 15 | 17 |



Start Stratagene EagleSigh.. Cd rom on Lims' [D:] 1:19 PM

35 CICLOS DE AMPLIFICACIONES DE 200 pb CALLE	Q N°	TIPO DE MUESTRA	NÚMERO DE MUESTRA	GRADO
1	10851,04	ANORMAL	1	A
2	8862,34	ANORMAL	2	A
3	9777,85	ANORMAL	3	A
4	6874,28	ANORMAL	4	A
5	2392,07	CONTROL POSITIVO		B
6	3080,62	NORMAL	5	B
7	813,45	NORMAL	6	C
8	-720,04	NORMAL	7	C
9	-442,2	NORMAL	8	C
10	1353,86	NORMAL	9	B
11		CONTROL NEG.	-	
12		CONTROL NEG.	-	
13	400	400	PATRÓN	
14	2000	2000	PATRÓN	
15	4000	4000	PATRÓN	
16	6000	6000	PATRÓN	
17	8000	8000	PATRÓN	
18	10000	10000	PATRÓN	

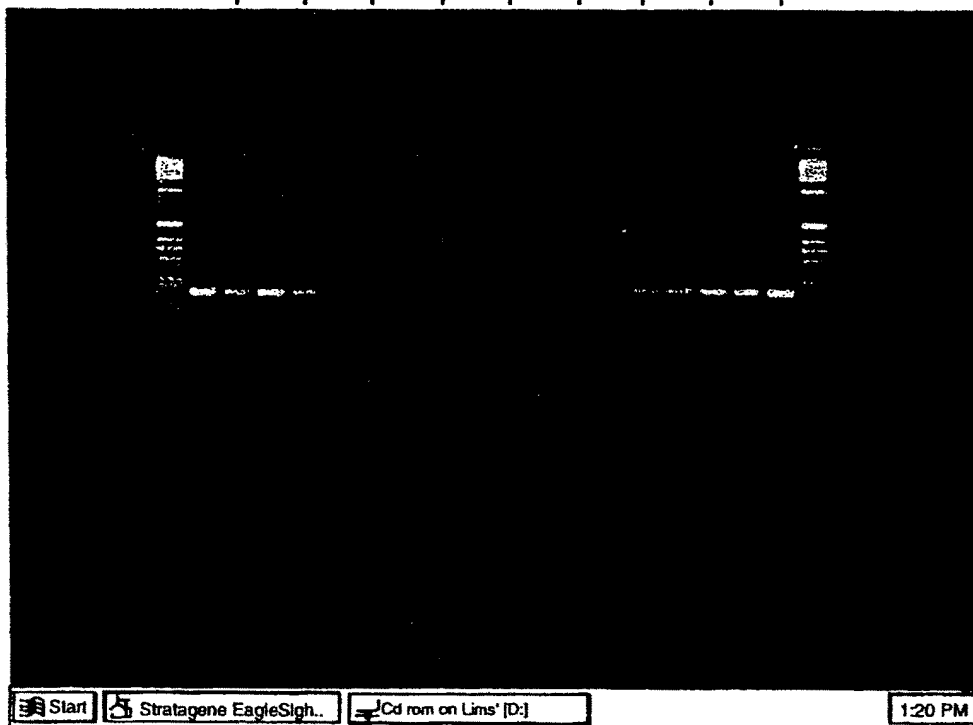
A= > 5000

B= 1000-5000

C= < 1000

FIG. 2

2 4 6 8 10 12 14 16 18  
 1 | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 | 13 | 15 | 17 |

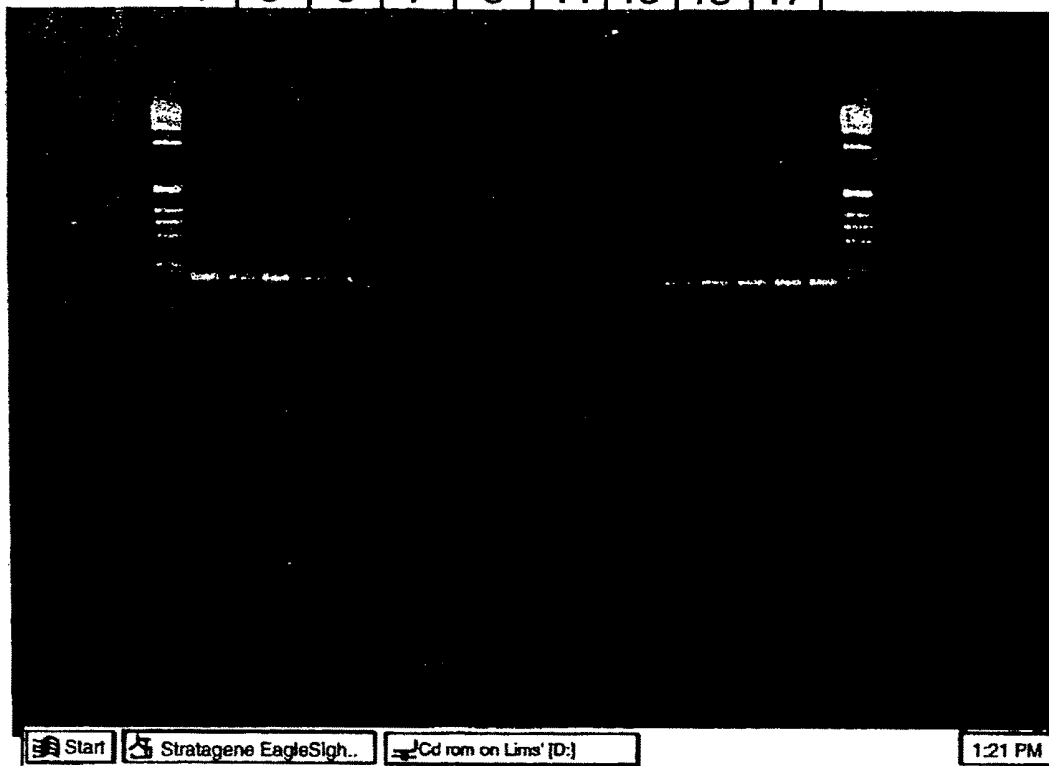


34 CICLOS DE AMPLIFICACIONES DE 200 pb CALLE	Q Nº	TIPO DE MUESTRA	NÚMERO DE MUESTRA	GRADO
1	8428,34	ANORMAL	1	A
2	4917,31	ANORMAL	2	A
3	7742,22	ANORMAL	3	A
4	3049,85	ANORMAL	4	A
5	409,5	CONTROL POS.		B
6	-682,75	NORMAL	5	C
7	-781,09	NORMAL	6	C
8	-1099,28	NORMAL	7	C
9	-1015,39	NORMAL	8	C
10	359,74	NORMAL	9	B
11		CONTROL NEG.	-	
12		CONTROL NEG.	-	
13	400	400	PATRÓN	
14	2000	2000	PATRÓN	
15	4000	4000	PATRÓN	
16	6000	6000	PATRÓN	
17	8000	8000	PATRÓN	
18	10000	10000	PATRÓN	

A= > 750  
 B= 250-750  
 C= < 250

FIG. 3

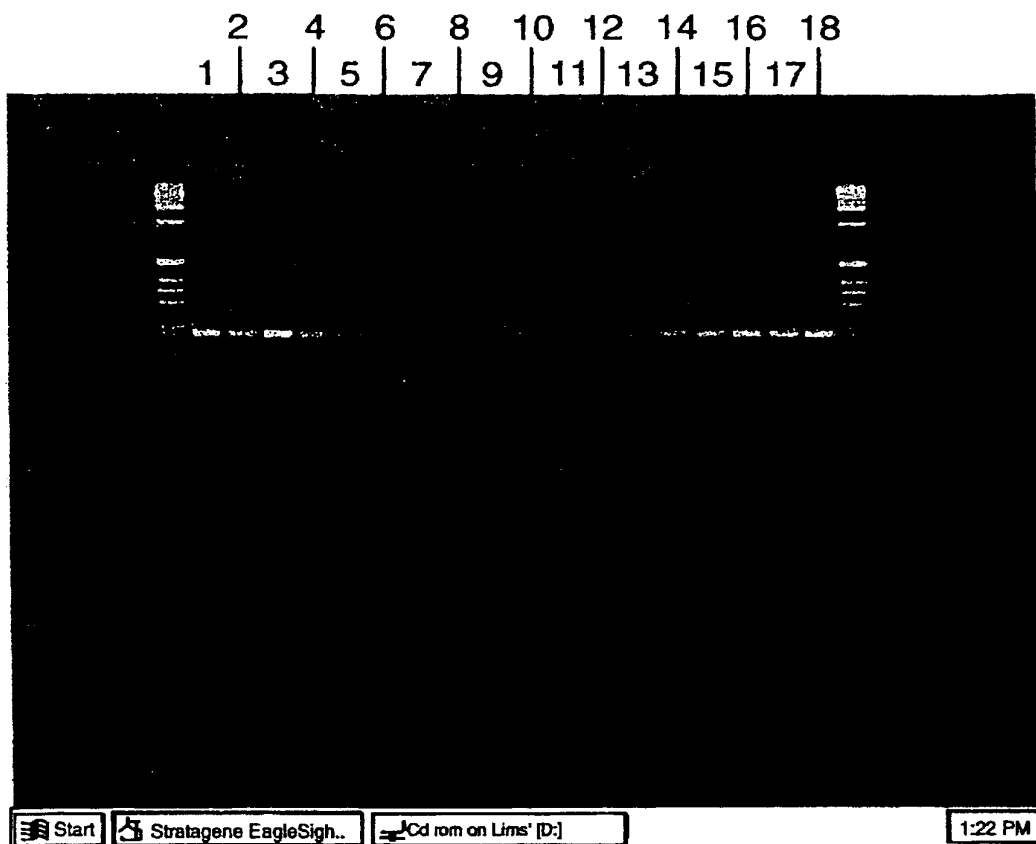
2 4 6 8 10 12 14 16 18  
 1 | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 | 13 | 15 | 17 |



33 CICLOS DE AMPLIFICACIONES DE 200 pb CALLE	Q N°	TIPO DE MUESTRA	NÚMERO DE MUESTRA	GRADO
1	7879,15	ANORMAL	1	A
2	4079,09	ANORMAL	2	A
3	7995,95	ANORMAL	3	A
4	2600,3	ANORMAL	4	A
5	1698,19	CONTROL POSITIVO		B
6	-405,32	NORMAL	5	C
7	-466,15	NORMAL	6	C
8	-1046,15	NORMAL	7	C
9	-764,86	NORMAL	8	C
10	105,05	NORMAL	9	C
11		CONTROL NEG.	-	
12		CONTROL NEG.	-	
13	400	400	PATRÓN	
14	2000	2000	PATRÓN	
15	4000	4000	PATRÓN	
16	6000	6000	PATRÓN	
17	8000	8000	PATRÓN	
18	10000	10000	PATRÓN	

A= > 2000 B= 500-2000 C= < 500

FIG. 4



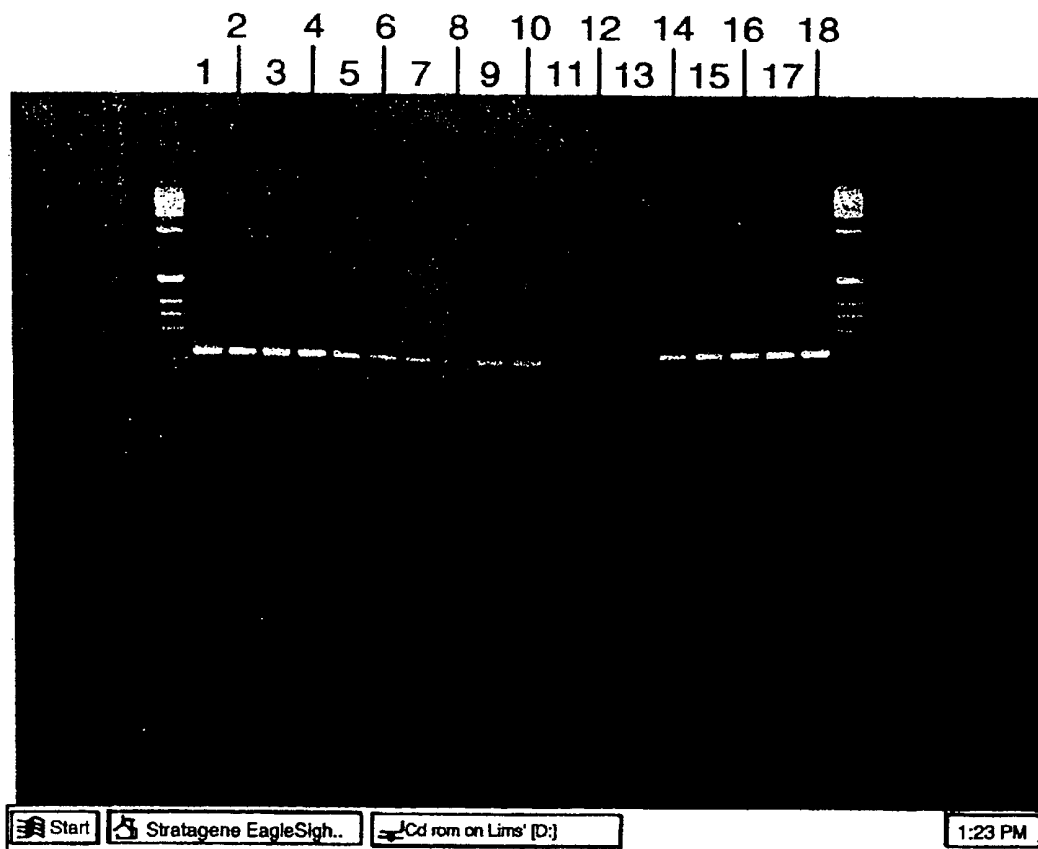
34 CICLOS DE AMPLIFICACIONES DE 200 pb CALLE	Q N°	TIPO DE MUESTRA	NÚMERO DE MUESTRA	GRADO
1	7852,95	ANORMAL	1	A
2	4797,07	ANORMAL	2	A
3	8543,47	ANORMAL	3	A
4	3597,23	ANORMAL	4	A
5	943,84	CONTROL POSITIVO		B
6	-296,7	NORMAL	5	C
7	-5,48	NORMAL	6	C
8	-896,94	NORMAL	7	C
9	-196,87	NORMAL	8	C
10	414,81	NORMAL	9	C
11		CONTROL NEG.	-	
12		CONTROL NEG.	-	
13	400	400	PATRÓN	
14	2000	2000	PATRÓN	
15	4000	4000	PATRÓN	
16	6000	6000	PATRÓN	
17	8000	8000	PATRÓN	
18	10000	10000	PATRÓN	

A = > 2000

B = 500-2000

C = < 500

FIG. 5



34 CICLOS DE AMPLIFICACIONES DE 200 pb CALLE	Q N°	TIPO DE MUESTRA	NÚMERO DE MUESTRA	GRADO
1	7660,6	ANORMAL	1	A
2	7032,89	ANORMAL	2	A
3	8364,31	ANORMAL	3	A
4	6892,04	ANORMAL	4	A
5	4883,47	CONTROL POSITIVO		A
6	1934,67	NORMAL	5	B
7	1380,84	NORMAL	6	B
8	-964,17	NORMAL	7	C
9	1729,51	NORMAL	8	B
10	2221,69	NORMAL	9	B
11		CONTROL NEG.	-	
12		CONTROL NEG.	-	
13	400	400	PATRÓN	
14	2000	2000	PATRÓN	
15	4000	4000	PATRÓN	
16	6000	6000	PATRÓN	
17	8000	8000	PATRÓN	
18	10000	10000	PATRÓN	

A= > 5000

B= 1000-5000

C= < 1000

FIG. 6



33 CICLOS DE AMPLIFICACIONES DE 200 pb CALLE	Q N°	TIPO DE MUESTRA	NÚMERO DE MUESTRA	GRADO
1	8519,13	ANORMAL	1	A
2	5745,19	ANORMAL	2	A
3	9765,65	ANORMAL	3	A
4	4153,79	ANORMAL	4	A
5	1869,33	CONTROL POSITIVO		B
6	418,37	NORMAL	5	C
7	405,91	NORMAL	6	C
8	-258,08	NORMAL	7	C
9	141,64	NORMAL	8	B
10	450,78	NORMAL	9	B
11		CONTROL NEG.	-	
12		CONTROL NEG.	-	
13	400	400	PATRÓN	
14	2000	2000	PATRÓN	
15	4000	4000	PATRÓN	
16	6000	6000	PATRÓN	
17	8000	8000	PATRÓN	
18	10000	10000	PATRÓN	

A= > 2000

B= 500-2000

C= < 500

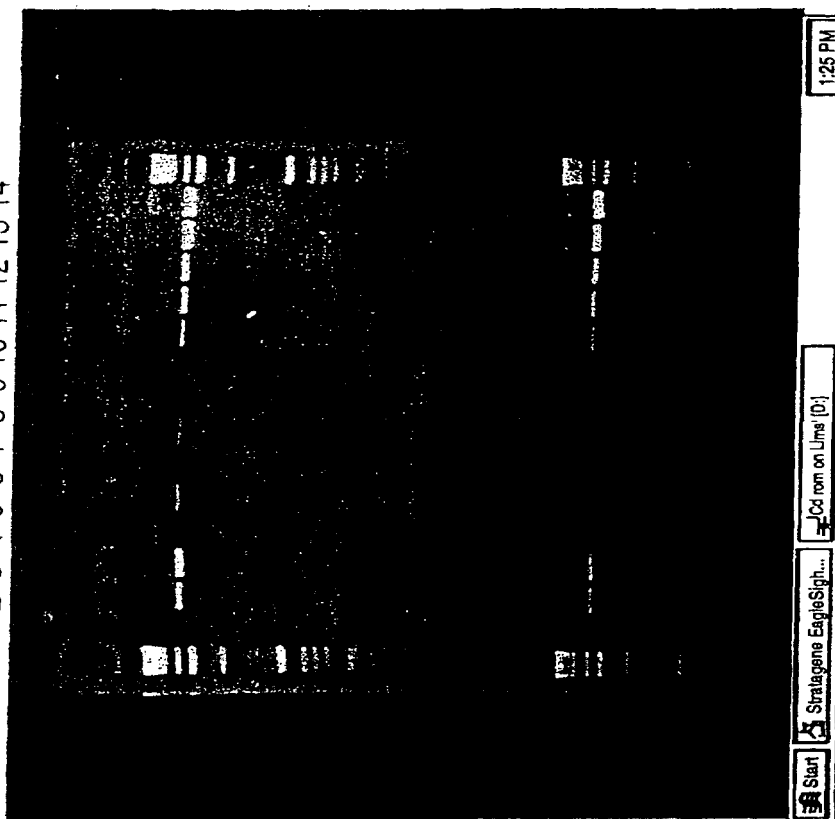
FIG. 7

36 CICLOS DE AMPLIFICACIONES DE 1,8 Kb CALLE	Q N°	MUESTRA
1		CONTROL NEG
2	102,935	ANORMAL
3	260,845	ANORMAL
4	0,075	NORMAL
5	48,305	ANORMAL
6	0,045	NORMAL
7	18,575	NORMAL
8		CONTROL NEG
9		CONTROL NEG
10	75	75
11	125	125
12	250	250
13	500	500
14	1000	1000

CORTE NORMAL/ANORMAL 40

FIG. 8

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



36 CICLOS DE AMPLIFICACIONES DE 1.8 Kb CALLE	Q.Nº	MUESTRA
1		CONTROL
2	81,84	NEG
3	91,575	ANORMAL
4	0,04	ANORMAL
5	24,86	NORMAL
6	0,88	NORMAL
7	17,25	NORMAL
8		CONTROL
9		NEG
10	75	CONTROL
11	125	NEG
12	250	75
13	500	125
14	1000	250
		500
		1000

CORTE NORMAL/ANORMAL 20

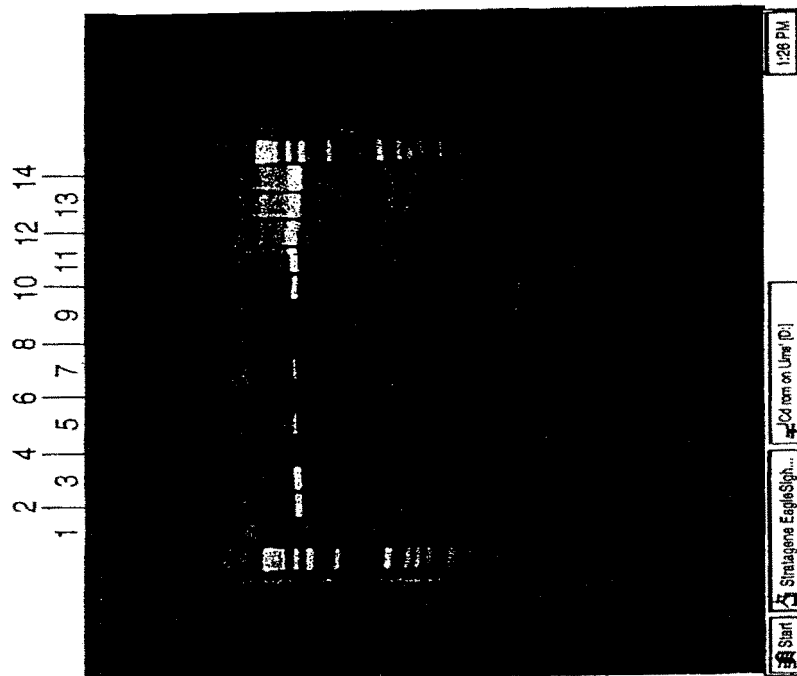


FIG. 9

40 CICLOS DE AMPLIFICACIONES DE 1,8 Kb CALLE	Q.Nº	MUESTRA
1		CONTROL NEG
2	70,72	ANORMAL
3	92,78	ANORMAL
4	95,76	ANORMAL
5	0,00	NORMAL
6	23,85	ANORMAL
7	0,00	NORMAL
8	2,00	NORMAL
9		CONTROL NEG
10		CONTROL NEG
11	75	75
12	125	125
13	250	250
14	500	500
15	1000	1000
16	2000	2000

CORTE NORMAL/ANORMAL 10

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

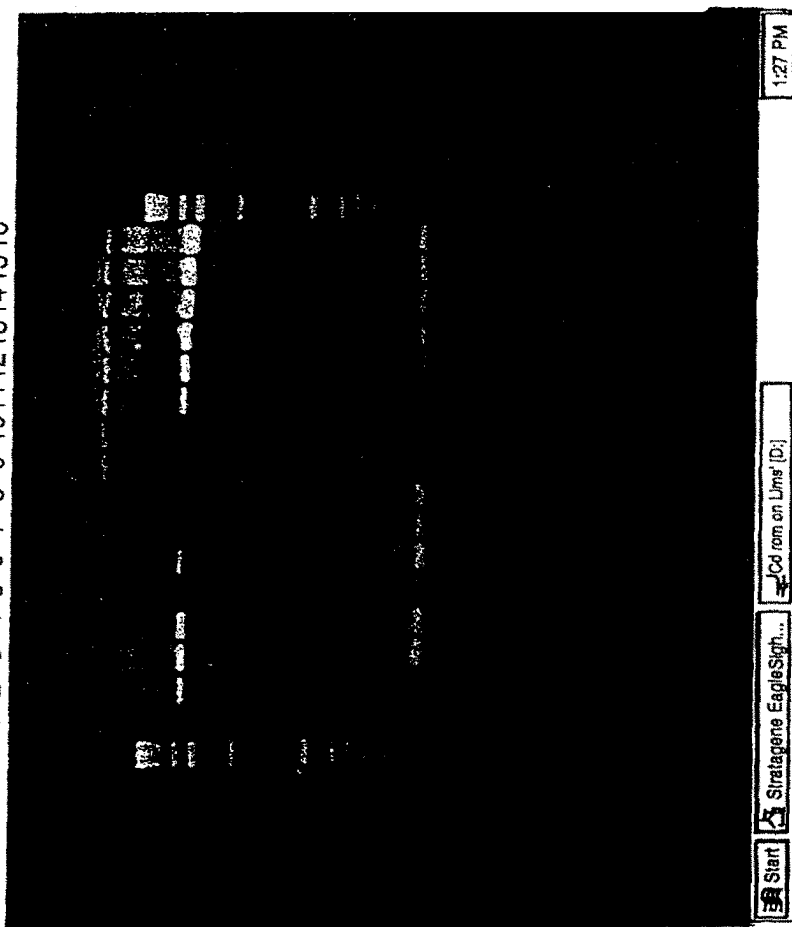


FIG. 10

RESULTADOS

GEL Nº 1

Nº CALLE	ESTADOCINICO
A	CALLE MARCAJOL
N	CONTROL NEGATIVO
N	CONTROL NEGATIVO
1	CANCER
2	NORMAL
3	CANCER
4	NORMAL
5	NORMAL
6	NORMAL
7	NORMAL
8	NORMAL
9	NORMAL
10	NORMAL
11	CANCER
12	NORMAL
13	NORMAL
14	NORMAL
15	NORMAL
N	CONTROL NEGATIVO
NA	CURVA PATRON
NA	CURVA PATRON
NA	CURVA PATRON
NA	CURVA PATRON
B	MARCOOREE

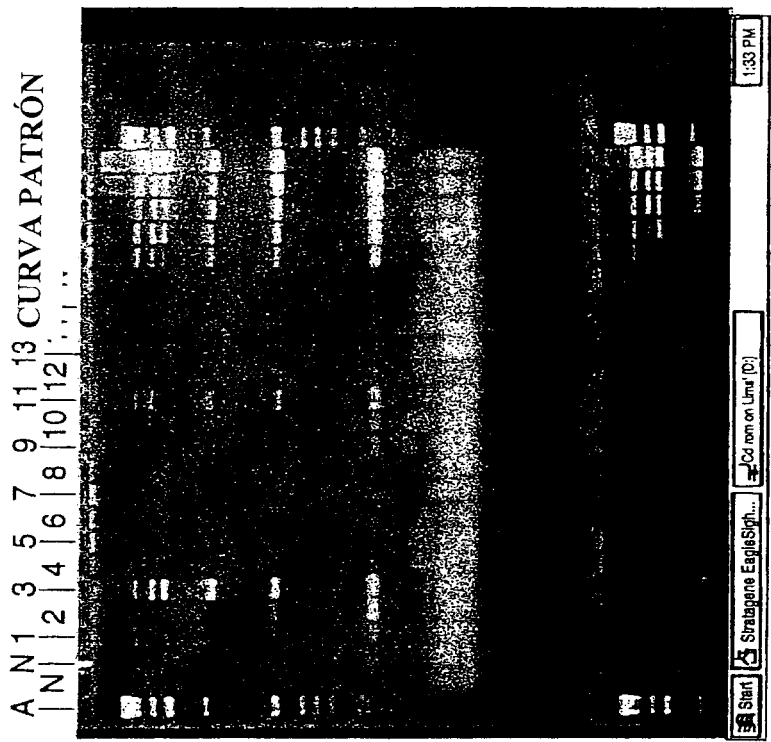


FIG. 11A

GEL Nº 2 RESULTADOS

Nº CALLE	ESTADO CLÍNICO
A	CALLE MARCATOR
N	CONTROL NEGATIVO
N	CONTROL NEGATIVO
16	NORMAL
17	NORMAL
18	CÁNCER
19	NORMAL
20	NORMAL
21	NORMAL
22	NORMAL
23	NORMAL
24	NORMAL
25	NORMAL
26	NORMAL
27	NORMAL
28	NORMAL
29	NORMAL
30	NORMAL
N	CONTROL NEGATIVO
NA	CURVA PATRÓN
NA	CURVA PATRÓN
NA	CURVA PATRÓN
NA	CURVA PATRÓN
NA	CURVA PATRÓN
B	MARCADOR

A N16 18 20 22 24 26 2 CURVA PATRÓN  
 N | 17 | 19 | 21 | 23 | 25 | 27 | 29 | N

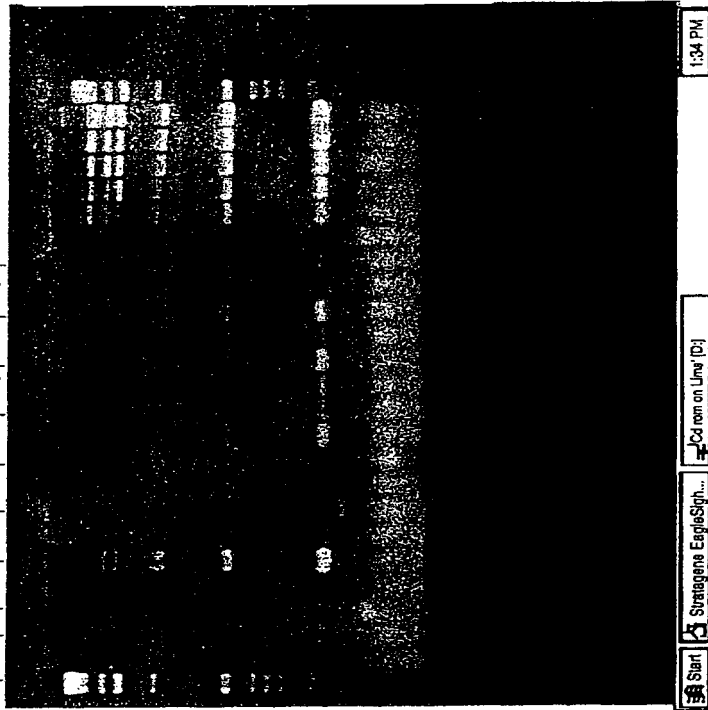


FIG. 11B

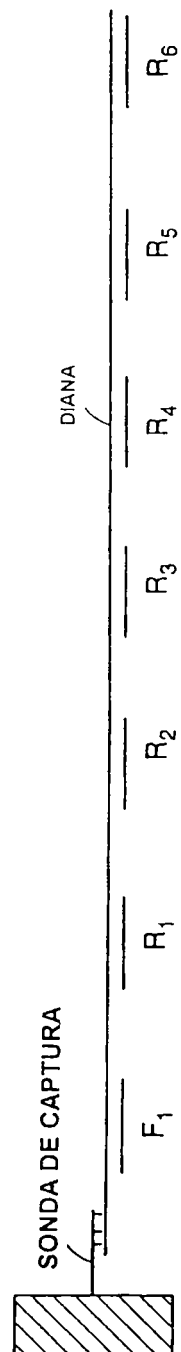


FIG. 12

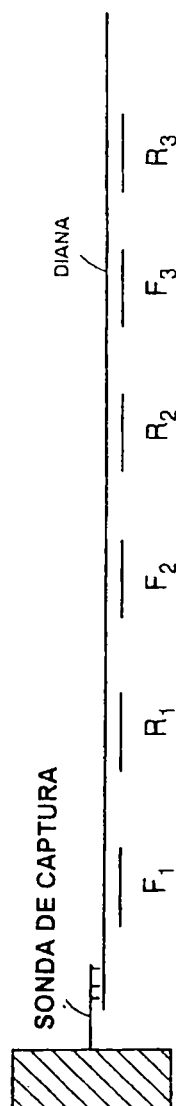


FIG. 13



## ES 2 329 543 T3

	<400> 4	
	tactcccctg ccctcaaca gatgtttgc caactgg	37
5	<210> 5	
	<211> 35	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda p53 exón 7	
15	<400> 5	
	atttttcca tactactacc catgacctc tcac	35
20	<210> 6	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda p53 exón 7	
30	<400> 6	
	atgaggccag tgcgccttgg ggagacctgt ggcaagc	37
35	<210> 7	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda p53 exón 8	
45	<400> 7	
	gaaaggacaa ggggtggttg gagtagatgg agcctgg	37
50	<210> 8	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda BRCA1	
60	<400> 8	
	gattctgaag aaccaactt gtccttaact agctctt	37
65	<210> 9	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

## ES 2 329 543 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda BRCA2	
5	<400> 9	
	ctaagtttga atccatgctt tgetcttctt gattatt	37
10	<210> 10	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda APC1	
	<400> 10	
20	cagatagccc tggacaaacc atgccaccaa gcagaag	37
	<210> 11	
25	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda APC2	
	<400> 11	
35	gaagttcctg gattttctgt tgctggatgg tagttgc	37
40		
45		
50		
55		
60		
65		