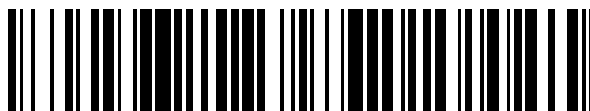


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 399**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G06F 19/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08163947 .8**

96 Fecha de presentación: **09.09.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2039782**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.03.2009**

54 Título: **MÉTODO Y APARATO PARA JUZGAR LA PRESENCIA O AUSENCIA DE CÉLULAS
CANCEROSAS.**

30 Prioridad:
20.09.2007 JP 2007243989

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.02.2012

73 Titular/es:
**SYSMEX CORPORATION
5-1, WAKINOHAMA-KAIGANDORI 1-CHOME
CHUO-KU
KOBE-SHI, HYOGO 651-0073, JP**

72 Inventor/es:
**Otomo, Yasuhiro;
Nakabayashi, Kaduki;
Shoji, Kayo y
Takata, Hideki**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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).

ES 2 375 399 T3

DESCRIPCIÓN

Método y aparato para juzgar la presencia o ausencia de células cancerosas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método y aparato para diagnosticar la presencia o ausencia de células cancerosas en una muestra que contiene células recogidas de un paciente, particularmente de un paciente que se sospecha que tiene metástasis de cáncer.

10 Antecedentes

El examen de la presencia o ausencia de células cancerosas en una muestra recogida de un paciente puede ser un indicador para el diagnóstico de metástasis de cáncer en un tejido u órgano a partir del cual se recoge la muestra. Para diagnosticar la presencia o ausencia de células cancerosas en una muestra, se han usado, de manera convencional, citodiagnósticos histológicos tales como tinción de Papanicolau. En este método, sin embargo, existen problemas tales como la diferencia en los resultados del diagnóstico debido a la experiencia de una persona que realiza el diagnóstico, la necesidad de un largo periodo de tiempo para realizar el examen y similar.

Por consiguiente, se han realizado ampliamente estudios sobre diagnóstico patológico molecular de cáncer por LAMP (método de amplificación isotérmica mediada por bucle y PCR (reacción en cadena de la polimerasa). El diagnóstico patológico molecular puede realizarse detectando un gen marcador de cáncer contenido en un tejido y una célula (por ejemplo, un ARNm de una proteína expresada específicamente en una célula cancerosa (en lo sucesivo en el presente documento, denominado también simplemente marcador de cáncer)). Por ejemplo, se sabe que los ARNm de la citoqueratina 19 (CK19) y del antígeno carcinoembrionario (CEA) son eficaces como genes marcadores de cáncer para diagnosticar metástasis nodular linfática del cáncer de mama. También se sabe que un ARNm de CEA es eficaz como un marcador de cáncer para diagnosticar metástasis de cáncer de estómago. Estos marcadores de cáncer son moléculas reconocidas por ser significativamente diferentes en el nivel de expresión entre una muestra normal y una muestra que contiene células cancerosas que lo metastasizan.

Un resultado de diagnóstico de la presencia o ausencia de células cancerosas, obtenido en base al nivel de expresión de un marcador de cáncer, puede servir como un indicador para un médico por ejemplo para realizar una diagnosis para detectar metástasis de células cancerosas con respecto a un tejido específico en un paciente.

Convencionalmente, cuando se realiza dicho examen molecular, el nivel de expresión a analizar de un marcador de cáncer se somete a conversión (normalización) con respecto al nivel de expresión del mismo por célula debido a la cantidad de células que varía de una muestra a otra. Por tanto, el nivel de expresión normalizado del marcador de cáncer en una muestra se compara con un valor umbral, diagnosticando de este modo la presencia o ausencia de células cancerosas. Específicamente, el nivel de expresión de un gen marcador de cáncer se divide por el nivel de expresión de un gen constitutivo, (es decir, un gen que se calcula que se expresa un nivel constante en muchos tejidos y células), normalizando de esta manera el nivel de expresión del gen marcador de cáncer con el nivel de expresión del gen constitutivo (M. Inokuchi et al., British Journal of Cancer (2003) 891750-1756).

La Publicación de Estados Unidos N° 2007264635 describe un método para obtener información para predecir una recaída de cáncer, que comprende una reacción de amplificación de un gen predeterminado por PCR y medir sus productos de amplificación. Más específicamente, esta publicación describe el diagnóstico de recaída de cáncer de estómago normalizando un resultado de medición con β -actina en el Ejemplo 4 y diagnosticando la recaída sin normalización en el Ejemplo 5, respectivamente.

50 Sumario

El alcance de la presente invención se define únicamente por las reivindicaciones adjuntas y no se ve afectado en ningún grado por las declaraciones de este sumario.

La presente invención proporciona un método para diagnosticar si existe o no una célula cancerosa en una muestra que incluye una célula obtenida de un paciente, que comprende: una etapa de obtención para obtener un valor relacionado con un nivel de expresión de un gen marcador de cáncer y un valor relacionado con un nivel de expresión de un gen constitutivo; una primera etapa de comparación para comparar el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador del cáncer con un primer valor umbral; una etapa de normalización para normalizar el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer basándose en el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo, cuando el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer es menor que el primer valor umbral en la primera etapa de comparación; una segunda etapa de comparación para comparar el valor normalizado obtenido a partir de la etapa de normalización con un segundo valor umbral y una etapa de juicio para diagnosticar si existen o no células cancerosas en la muestra basándose en un resultado de comparación de la primera etapa de comparación o la segunda etapa de comparación.

La presente invención también proporciona un método para diagnosticar si existe o no una célula cancerosa en una muestra que incluye una célula obtenida de un paciente, que comprende: una etapa de obtención para obtener un valor relacionado con un nivel de expresión de un gen marcador de cáncer y un valor relacionado con un nivel de expresión de un gen constitutivo; una primera etapa de comparación para comparar el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer con un primer valor umbral; una etapa de normalización para normalizar el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer basándose en el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo, cuando el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer es menor que el primer valor umbral en la primera etapa de comparación; una segunda etapa de comparación para comparar el valor normalizado obtenido a partir de la etapa de normalización con un segundo valor umbral; y una etapa de diagnóstico para diagnosticar si existen células cancerosas o no en la muestra basándose en un resultado de comparación de la primera etapa de comparación o la segunda etapa de comparación.

La presente invención también proporciona un aparato para diagnosticar si existe o no una célula cancerosa en una muestra que incluye una célula obtenida de un paciente, que comprende: una parte de medición para medir la muestra para obtener un valor relacionado con un nivel de expresión de un gen marcador del cáncer y un valor relacionado con un nivel de expresión de un gen constitutivo en la muestra; y un controlador que incluye una memoria bajo control de un procesador, almacenando la memoria instrucciones que permiten al procesador realizar operaciones, que comprenden: una etapa de obtención para obtener el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer y el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo; una primera etapa de comparación para comparar el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador del cáncer con un primer valor umbral; una etapa de normalización para normalizar el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador del cáncer basándose en el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo; una segunda etapa de comparación para comparar el valor normalizado obtenido a partir de la etapa de normalización con un segundo valor umbral; una etapa de diagnóstico para diagnosticar si existen células cancerosas o no en la muestra basándose en resultados de comparación de la primera etapa de comparación y la segunda etapa de comparación; y una etapa de producción para producir un veredicto obtenido a partir de la etapa de diagnóstico.

La presente invención también proporciona un aparato para diagnosticar si existen células de cáncer o no en una muestra que incluye una célula obtenida de un paciente, que comprende: una parte de medición para medir la muestra para obtener un valor relacionado con un nivel de expresión de un gen marcador de cáncer y un valor relacionado con un nivel de expresión de un gen constitutivo en la muestra; y un controlador que incluye una memoria bajo el control de un procesador, almacenando la memoria instrucciones que permitan al procesador realizar operaciones, que comprenden: una etapa de obtención para obtener el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador del cáncer y el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo; una primera etapa de comparación para comparar el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador del cáncer con un primer valor umbral; una etapa de normalización para normalizar el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador basándose en el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo, cuando el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador del cáncer es menor que el primer valor umbral en la primera etapa de comparación; una segunda etapa de comparación para comparar el valor normalizado obtenido a partir de la etapa de normalización con un segundo valor umbral; una etapa de diagnóstico para diagnosticar si existen células cancerosas o no en la muestra basándose en un resultado comparativo de la primera etapa de comparación o la segunda etapa de comparación; y

una etapa de producción para producir un veredicto obtenido a partir de la etapa de diagnóstico.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una vista en perspectiva que muestra toda la construcción de un aparato de diagnóstico de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 2 es una vista en perspectiva que muestra toda la construcción de un aparato de medición por amplificación de ácidos nucleicos como una parte de medición del aparato de diagnóstico mostrado en la FIG. 1.

La FIG. 3 es una vista plana esquemática del aparato de medición por amplificación de ácidos nucleicos en la FIG. 2.

La FIG. 4 es un diagrama en bloque que muestra un aparato de diagnóstico de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 5 es un diagrama de flujo que muestra la operación de un aparato de diagnóstico de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 6 es un diagrama de flujo que muestra la operación de un aparato de diagnóstico de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 7 es una vista que muestra un ejemplo de visualización de una visualización del aparato de diagnóstico de la presente invención.

La FIG. 8 es un gráfico que muestra los resultados en los Ejemplos.

Descripción detallada de la realización

El método en la presente realización es un método para diagnosticar la presencia o ausencia de células cancerosas en una muestra que contiene células recogidas de un paciente. El paciente es preferiblemente un paciente en el que se pretende juzgar la presencia o ausencia de células cancerosas, particularmente un paciente en el que se pretende juzgar metástasis de cáncer. Las células obtenidas del paciente son preferiblemente células incluidas en un tejido nodular linfático, sangre o un lavado de la cavidad corporal.

Particularmente, las condiciones de un lavado de la cavidad corporal pueden ser peores. El lavado de cavidad corporal se usa frecuentemente para realizar mediciones tras el paso del tiempo después de la recogida, por tanto las condiciones de la muestra pueden deteriorarse adicionalmente. Por consiguiente, el método en la presente realización es útil como un método para el diagnóstico de la presencia o ausencia de células cancerosas contenidas en el lavado de la cavidad corporal.

El lavado de la cavidad corporal es un líquido obtenido generalmente por lavado de una cavidad corporal cercana a una lesión cancerosa con solución salina fisiológica, para determinar la presencia o ausencia de metástasis de cáncer. El lavado de cavidad corporal obtenido de un paciente incluye un lavado de cavidad abdominal, un lavado de cavidad torácica y similar. El lavado de cavidad abdominal incluye un lavado subhepático, un lavado subdiafragmático izquierdo, y un lavado del saco de Douglas, y similar.

Preferiblemente, adicionalmente la muestra se trata para proporcionar una muestra de medición sometida a medición.

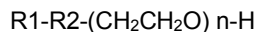
Cuando la muestra es un tejido nodular linfático, la muestra de medición puede obtenerse tratando un tejido nodular linfático con una solución de tratamiento. Preferentemente la solución de tratamiento contiene DMSO (dimetilsulfóxido). La concentración de DMSO en la solución de tratamiento es preferentemente aproximadamente del 5 al 30% en volumen, más preferiblemente aproximadamente del 10 al 25% en volumen.

Cuando la muestra es un lavado de la cavidad corporal, puede usarse un extracto de ácido nucleico obtenido a partir de una célula en suspensión que sea un concentrado de células en el lavado de la cavidad corporal como la muestra de medida. La suspensión celular puede obtenerse por concentración de células en un lavado de la cavidad corporal mediante centrifugación o similar. El extracto de ácido nucleico puede obtenerse tratando la suspensión celular mediante un método de extracción de ácido nucleico conocido en la técnica. También puede usarse una muestra obtenida por tratamiento de la suspensión celular con la solución de tratamiento como una muestra de medida. Con frecuencia los ácidos nucleicos en el lavado de la cavidad corporal como una muestra se han destruido. Por consiguiente, el extracto de ácidos nucleicos se usa preferiblemente como una muestra de medida.

La solución de tratamiento puede contener un tampón, un tensioactivo, etc., si fuera necesario además de DMSO.

El tampón no está limitado siempre que el pH de la solución de tratamiento pueda mantenerse en el intervalo de aproximadamente 2,5 a 5,0, y ejemplos de los mismos incluyen tampón glicina-HCl etc.. La concentración del tampón no está particularmente limitada en la medida en que el pH de la solución de tratamiento pueda mantenerse en el intervalo mencionado anteriormente.

El tensioactivo no está particularmente limitado siempre y cuando sea un tensioactivo usado normalmente en la técnica, aunque el tensioactivo es preferiblemente un tensioactivo no aniónico, más preferiblemente un tensioactivo no iónico de polioxietileno. Particularmente el tensioactivo es preferiblemente un tensioactivo no iónico de polioxietileno representado mediante la siguiente fórmula:



en la que R1 es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo o isooctilo que tiene de 10 a 22 átomos de carbono; R2 es -O- o -(C₆H₄)-O-; n es un número entero de 8 a 120. Los ejemplos específicos del tensioactivo no iónico de polioxietileno incluyen polioxietilen lauril éter, polioxietilen cetil éter, polioxietilen oleil éter, polioxietilen miristil éter, polioxietilen estearil éter, polioxietilen nonilfenil éter y polioxietilen isooctil fenil éter. Más específicamente, es adecuado Brij35 (polioxietilen (35) lauril éter) y similares. La concentración del tensioactivo no está particularmente limitada siempre que sea una concentración usada habitualmente en la técnica. Por ejemplo, la concentración del tensioactivo en la solución de tratamiento es preferiblemente del 0,1 al 6% en volumen, más preferiblemente del 1 al 5% en volumen.

La proporción de mezcla de la solución de tratamiento con respecto a un tejido nodular linfático o una suspensión celular no está particularmente limitada. Por ejemplo, aproximadamente del 0,0001 al 0,005 ml de la solución de tratamiento puede añadirse y mezclarse con 1 mg de tejido de nódulo linfático. Aunque esta mezcla no esté particularmente limitada puede realizarse, por ejemplo, para un tiempo tal para mezclar el tejido nodular linfático con la solución de tratamiento suficientemente a temperatura ambiente.

Después de mezclar el tejido nodular linfático con la solución de tratamiento que contiene DMSO, el tejido nodular

linfático se modifica preferiblemente. El método para modificar el tejido nodular linfático incluye la homogeneización por succión y descarga repetida a través de una jeringa, homogeneización con un homogenizador y método de congelación/descongelación. El homogenizador que puede usarse en la invención es uno usado habitualmente en la materia e incluye, por ejemplo, un mezclador de Waring, un homogenizador de Potter-Elvehjem, un homogenizador polytron, un homogenizador Dounce, y una prensa de French y un desintegrador ultrasónico. Las condiciones de rotura se establecen adecuadamente dependiendo del método y aparato usado y pueden ser las condiciones usadas habitualmente en la materia.

Una solución de rotura de las células rotas por el método descrito anteriormente puede ser purificar parcialmente mediante procedimientos de purificación habituales tales como centrifugación, filtración y cromatografía en columna. Dependiendo del tipo de gen marcador a detectar, la solución parcialmente purificada puede adicionalmente purificada por un método tal como un método de extracción de ácido nucleico.

En la etapa de obtención en el método en la presente invención, se obtienen valores respectivamente relacionados con niveles de expresión de un gen marcador de cáncer y un gen conservador en la muestra.

En esta memoria descriptiva, la expresión "gen marcador de cáncer" se refiere a un gen marcador molecular que se produce a un nivel de expresión significativamente más alto en una célula cancerosa que en una célula normal. Por consiguiente, el gen marcador del cáncer es preferiblemente un ácido nucleico tal como ARNm o ADN, más preferiblemente ARNm.

El gen marcador de cáncer es preferiblemente un gen de una proteína tal como citoqueratina (CK) (por ejemplo CK18, CK19 o CK20), antígeno carcinoembrionario (CEA), mucina MUC1 o mamaglobina (MMG).

El gen constitutivo no está particularmente limitado siempre que sea un gen que se sepa que se expresa a un nivel constante en muchas células. El gen constitutivo es preferiblemente un gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, ciclofilina, β -actina o α -tubulina.

Los valores relacionados con los niveles de expresión del gen marcador de cáncer y el gen constitutivo, respectivamente, medidos en la etapa de obtención son valores adecuadamente seleccionados dependiendo del método de medición del nivel de expresión de cada gen. Los valores relacionados con los niveles de expresión del gen marcador de cáncer y el gen constitutivo son preferiblemente valores relacionados con las cantidades de los ARNm de los genes respectivos. Los valores relacionados con los niveles de expresión del gen marcador de cáncer y el gen constitutivo son preferiblemente valores obtenidos amplificando los ARNm mediante un método de amplificación de ácido nucleico. En este caso, los valores relacionados con los niveles de expresión del gen marcador de cáncer y el gen constitutivo pueden ser valores ópticamente medidos tales como intensidad de fluorescencia, turbidez y absorbancia medidos amplificando los ARNm o los ADNc correspondientes con cebadores predeterminados durante un tiempo predeterminado, o el tiempo o la cantidad de ciclos de la PCR repetidos hasta alcanzar una intensidad de fluorescencia, turbidez o absorbancia predeterminada durante la amplificación de los ARNm o los ADNc correspondientes con cebadores predeterminados.

El método de amplificación de ácido nucleico puede realizarse de acuerdo con un método usado habitualmente en la materia. Particularmente, es preferible un método de amplificación de ácido nucleico basado en LAMP (método de amplificación isotérmica mediada por bucle) o PCR (reacción en cadena de polimerasa). Cuando los ARNm del gen marcador de cáncer y del gen constitutivo se amplifican mediante el método de amplificación de ácido nucleico, es posible emplear un método de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, RT-PCR o RT-LAMP) que implique una reacción de transcripción inversa antes de la reacción de amplificación del ácido nucleico.

El método de amplificación de ácido nucleico puede realizarse específicamente añadiendo cebadores a la muestra para amplificar el ADNc correspondiente al gen marcador de cáncer o gen constitutivo, una ADN polimerasa dependiente de ARN (transcriptasa inversa), una ADN polimerasa dependiente de ADN (en lo sucesivo en el presente documento denominada también simplemente ADN polimerasa) etc. para preparar una solución de reacción, seguido por amplificación de ácido nucleico, para determinar un valor relacionado con el ADNc amplificado.

Las condiciones para la reacción de transcripción inversa y reacción de amplificación de ácido nucleico pueden variar adecuadamente dependiendo de las secuencias del gen marcador de cáncer y del gen constitutivo así como de los moldes y secuencias de cebadores. Las condiciones usadas en la reacción de transcripción inversa y reacción de amplificación de ácido nucleico pueden ser las descritas, por ejemplo, en Sambrook, J. et al (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

Las secuencias de los cebadores para la amplificación de los ADNc correspondientes al gen marcador de cáncer y gen constitutivo pueden seleccionarse adecuadamente dependiendo de las secuencias del gen marcador de cáncer y del gen constitutivo. El cebador tiene preferiblemente una longitud de 5 a 100 nucleótidos, más preferiblemente de 5 a 50 nucleótidos. El cebador puede producirse mediante métodos de síntesis de ácidos nucleicos conocidos en la materia.

En la siguiente Tabla 1 se muestran ejemplos preferidos de los cebadores para amplificar los ADNc correspondientes al gen marcador de cáncer y gen constitutivo.

5

Tabla 1

Nombre del gen		Secuencia del cebador	SEC ID N°
Antígeno carcinoembrionario (CEA)	directo	5'-agacaatcaragtctctgcgga-3'	1
	inverso	5'-atcctgtcctccacgggt-3'	2
Mucina MUC1	directo	5'-cctttcctcctgct-3'	3
	inverso	5'-ccgaagtctccttttctccad-3'	4
Citoqueratina 19 (CK19)	directo	5'-cagatcgaaggcctgaagga-3'	5
	inverso	5'-cttgcccctcagcgtact-3'	6
Mammaglobina (MMG)	directo	5'-ccaaacggacgaaactctgagc-3'	7
	inverso	5'-gcagtctgtgagccaaagggtc-3'	8
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	directo	5'-tgaagggtcggtgaacggatttggc-3'	9
	inverso	5'-tgttgggggcccagtggtgggata-3'	10
Ciclofilina	directo	5'-caaagtctggaccaaacacaa-3'	11
	inverso	5'-ttcaccttccaaagaccacat-3'	12
β-Actina	directo	5'-ccacactgtgccatctacg-3'	13
	inverso	5'-aggatcttcatgaggtagtcagtcag-3'	14
α-Tubulina	directo	5'-aagaagtccaagctggagttc-3'	15
	inverso	5'-gttggtctggaattctgtcag-3'	16

Las secuencia de cebadores no se limitan a las mostradas en la Tabla 1, y los expertos en la materia pueden seleccionar cebadores adecuados de secuencias conocidas de todos estos genes.

- 10 Los cebadores pueden modificarse por técnicas normalmente usadas en la materia. El marcaje de los cebadores puede realizarse usando un elemento radioactivo o una molécula no radioactiva. El radioisótopo que puede usarse en la invención incluye ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^3H y ^{125}I . La sustancia no radioactiva se selecciona de ligandos tales como biotina, avidina, estreptavidina y digoxigenina; haptenos; colorantes; y reactivos luminiscentes tales como reactivos radioluminescentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes, fluorescentes o fosforescentes.

- 15 Las enzimas que tienen una actividad de transcripción inversa y ADN polimerasa que pueden usarse en la invención pueden ser las bien conocidas en la materia. Las enzimas que tienen una actividad de transcripción inversa incluyen transcriptasa inversa del AMV (Virus de la Mieloblastosis Aviar), transcriptasa inversa de M-MLV (Virus de la Leucemia Murina de Molony), etc.. La ADN polimerasa que puede usarse en la invención incluye ADN polimerasa de Taq, ADN polimerasa de Pfu, ADN polimerasa de T4 y ADN polimerasa de Bst.

- 20 Determinando valores relacionados con los productos de amplificación de ácido nucleico formados mediante el método de amplificación de ácido nucleico, pueden determinarse valores relacionados con los niveles de expresión del gen marcador de cáncer y el gen constitutivo. Cuando los valores relacionados con los niveles de expresión del gen marcador de cáncer y gen constitutivo son las cantidades de los ARNm de los genes, puede usarse preferiblemente RT-PCR cuantitativa (PCR cuantitativa de transcripción inversa) y RT-LAMP cuantitativa (LAMP cuantitativa de transcripción inversa). De acuerdo con estos métodos, los estados ópticos (turbidez, absorbancia, intensidad de fluorescencia, etc.) de la solución de reacción cambian con la amplificación de los ácidos nucleicos (ADNc) y pueden por tanto medirse en tiempo real para determinar los valores relacionados con los niveles de expresión del gen marcador de cáncer y gen constitutivo.

- 30 Los ejemplos específicos de RT-PCR cuantitativa incluyen un método SYBR Green que implica añadir previamente SYBR Green a una solución de reacción antes de la reacción de amplificación de ácido nucleico y medir, en tiempo real, la intensidad de fluorescencia aumentada con la amplificación del ADNc durante la reacción de amplificación y un método TaqManTM que implica una reacción de amplificación con una sonda TaqManTM y después medir, en tiempo real, la intensidad de fluorescencia aumentada con la amplificación del ADNc. Los valores relacionados con los niveles de expresión del gen marcador de cáncer y gen constitutivo también pueden determinarse como la cantidad de ciclos necesarios hasta alcanzar la intensidad de fluorescencia de la solución de reacción un nivel

predeterminado.

Cuando se usa RT-LAMP, se forma una gran cantidad de pirofosfato de magnesio como producto secundario complementario en la amplificación del ADNc. Como este pirofosfato de magnesio es insoluble, a medida que aumenta el pirofosfato de magnesio, la solución de reacción se vuelve turbia. Por consiguiente, la turbidez (o absorbancia) de la solución de reacción puede medirse ópticamente en tiempo real para determinar los valores relacionados con los niveles de expresión del gen marcador de cáncer o gen constitutivo. El método SYBR Green también puede usarse en el método RT-LAMP. Los valores relacionados con los niveles de expresión del gen marcador de cáncer y gen constitutivo también puede determinarse como el tiempo necesario hasta que se alcance la turbidez, absorbancia, intensidad de fluorescencia o similar de la solución de reacción a nivel predeterminado.

El método en la presente realización comprende una primera etapa de comparación para comparar el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer, obtenido en la etapa de obtención, con un primer valor umbral. El primer valor umbral es un valor que puede establecerse adecuadamente dependiendo del tipo de gen marcador de cáncer y del método usado en la etapa de obtención, particularmente del tipo de método de amplificación de ácido nucleico usado. El primer valor umbral puede ajustarse a un valor igual a o menor que el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer contenido en una muestra (muestra positiva) en la que se confirma que contiene células cancerosas, particularmente una muestra en la que se confirma que tiene metástasis de cáncer y simultáneamente con respecto a un valor superior al valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer contenido en una muestra (muestra negativa) en la que se confirma que no tiene células cancerosas, particularmente una muestra en la que se confirma que no tiene metástasis de cáncer. El primer valor umbral se ajusta preferiblemente a un valor que se obtiene determinando valores relacionados con los niveles de expresión del gen marcador de cáncer en una pluralidad de muestras positivas y valores relacionados con los niveles de expresión del gen marcador de cáncer en una pluralidad de muestras negativas y que es capaz de diferenciar muestras positivas y negativas entre sí con una mayor probabilidad.

Un modo del método en la presente realización comprende una etapa de normalización para normalizar el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer, mediante el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo obtenido en la etapa de obtención.

En la presente memoria descriptiva, "normalización" significa que el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer se convierte a un valor relativo basándose en el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo. Específicamente, la normalización se realiza dividiendo el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer entre el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo.

El método en la presente realización comprende una segunda etapa de comparación para comparar el valor normalizado obtenido en la etapa de normalización con un segundo valor umbral.

El segundo valor umbral es un valor que puede establecerse adecuadamente dependiendo del tipo de gen marcador de cáncer, del tipo de gen constitutivo y del método usado en la etapa de obtención, particularmente el tipo de método de amplificación de ácido nucleico usado. El segundo valor umbral puede ajustarse a un valor igual a o menor que un valor normalizado obtenido normalizando el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer contenido en una muestra (muestra positiva) en la que se confirma que contiene células cancerosas, particularmente una muestra en la que se confirma que tiene metástasis de cáncer, por el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo en la muestra positiva y simultáneamente con un valor superior a un valor normalizado obtenido normalizando el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer contenido en una muestra (muestra negativa) en la que se confirma que no tiene células cancerosas, particularmente una muestra en la que se confirma que no tiene metástasis de cáncer, por el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo en la muestra negativa. El segundo valor umbral se ajusta preferiblemente con un valor que se obtiene determinando el valor normalizado de los valores relacionados con los niveles de expresión del gen marcador de cáncer en una pluralidad de muestras positivas y valores normalizados de los valores relacionados con los niveles de expresión del gen marcador de cáncer en una pluralidad de muestras negativas y que es capaz de diferenciar muestras positivas y negativas entre sí a una mayor probabilidad.

El método en la presente realización comprende una etapa de diagnóstico para diagnosticar si existen o no células cancerosas en la muestra basándose en resultados de comparación obtenidos en la primera etapa de comparación y en la segunda etapa de comparación.

En la etapa de diagnóstico es preferible que las células cancerosas a diagnosticar estén presentes en la muestra cuando el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer en la primera etapa de comparación sea igual a o mayor que el primer valor umbral y/o el valor normalizado en la segunda etapa de comparación sea igual a o mayor que el segundo valor umbral.

Es decir, es preferible que las células cancerosas a diagnosticar estén presentes en la muestra en cualquiera de los siguientes casos:

Caso (A) en el que el resultado de comparación en la primera etapa de comparación es:

(valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer) $\geq$ (primer valor umbral), mientras que el resultado de comparación en la segunda etapa de comparación es:

5 (valor normalizado) $<$ (segundo valor umbral);

Caso (B) en el que el resultado de comparación en la primera etapa de comparación es:

10 (valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer) $<$ (primer valor umbral), mientras que el resultado de comparación en la segunda etapa de comparación es:

(valor normalizado) $\geq$ (segundo valor umbral); y

15 Caso (C) en el que el resultado de comparación en la primera etapa de comparación es:

(valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer) $\geq$ (primer valor umbral), y el resultado de comparación en la segunda etapa de comparación es:

20 (valor normalizado) $\geq$ (segundo valor umbral).

Otro modo de la presente realización comprende una primera etapa de diagnóstico para diagnosticar si están presentes o no células cancerosas en la muestra basándose en un resultado de comparación obtenido en una primera etapa de comparación y una segunda etapa de diagnóstico para diagnosticar si están presentes o no células cancerosas en la muestra basándose en un resultado de comparación obtenido en una segunda etapa de comparación.

En la primera etapa de diagnóstico, cuando el valor relacionado con el valor de expresión del gen marcador de cáncer en la primera etapa de comparación es igual a o mayor que el primer valor umbral, se diagnostica la presencia de células cancerosas en la muestra.

En la segunda etapa de diagnóstico, cuando el valor normalizado en la segunda etapa de comparación es igual a o mayor que el segundo valor umbral, se diagnostica la presencia de células cancerosas en la muestra

35 En otro modo adicional de la presente realización, cuando el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer es menor que el primer valor umbral en la primera etapa de comparación, se realiza la etapa de normalización y la segunda etapa de comparación. En este modo, se diagnostica la presencia de células cancerosas en la muestra, cuando el nivel de expresión del gen marcador de cáncer es mayor que el primer valor umbral en la primera etapa de comparación y por lo tanto, no se realiza la etapa de normalización ni la segunda etapa de comparación, usando un valor normalizado.

Es también un aspecto de la presente realización, un aparato para diagnosticar la presencia o ausencia de células cancerosas, que se usa para realizar el método para diagnosticar la presencia o ausencia de células cancerosas. La FIG. 4 es un diagrama en bloque que muestra el aparato en la presente realización.

Como se muestra en la FIG. 4, el aparato en la presente realización incluye:

una parte de medición 100 para medir la muestra para obtener un valor relacionado con el nivel de expresión de un gen marcador de cáncer y un valor relacionado con el nivel de expresión de un gen constitutivo en la muestra que contiene células recogidas de un paciente;

una primera parte de comparación 200 para comparar el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador obtenido en base a un resultado de medición de la parte de medición, con un primer valor umbral; una parte de normalización 300 para normalizar el nivel de expresión del gen marcador de cáncer, en base al valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo obtenido a partir de resultado de medición de la parte de medición;

una segunda parte de comparación 400 para comparar el valor normalizado obtenido en la parte de normalización con un segundo valor umbral;

una parte de diagnóstico 500 para diagnosticar si están presentes o no células cancerosas en la muestra en base a los resultados de comparación obtenidos en la primera parte de comparación y en la segunda parte de comparación; y

una parte de resultados 600 para producir un resultado de diagnóstico obtenido en la parte de diagnóstico.

La parte de medición 100 no está limitada particularmente siempre que pueda medir la muestra para obtener el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer y el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo. La parte de medición es preferiblemente un aparato de medición por amplificación de ácidos nucleicos que puede medir ácidos nucleicos amplificados por los métodos de amplificación de ácido nucleico, tal

como método LAMP y método PCR. Particularmente, la parte de medición es preferiblemente un aparato de medición por amplificación de ácidos nucleicos para medir ópticamente los productos de amplificación de los ácidos nucleicos obtenidos amplificando el gen marcador de cáncer y el gen constitutivo en una muestra por cebadores y una enzima de amplificación de ácidos nucleicos.

5

La primera parte de comparación 200, la parte de normalización 300, la segunda parte de comparación 400, la parte de diagnóstico 500 y la parte de resultado 600 pueden estar constituidas por un ordenador personal (PC) 102 conectado a la parte de medición 100. En este caso, el ordenador personal (PC) 102 comprende un controlador 102 (d) para controlar la parte de medición 100 (Fig. 1). El controlador 102 (d) incluye una CPU (unidad procesadora central), RAM, ROM y una memoria etc. la memoria almacena instrucciones que permiten a la CPU realizar operaciones para (1) obtener el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer y el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo de la parte de medición 100, (2) comparar el nivel de expresión del gen marcador de cáncer obtenido a partir del resultado de medición de la parte de medición 100 con un primer umbral, (3) normalizar el nivel de expresión del gen marcador de cáncer basándose en el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo obtenido del resultado de medición de la parte de medición, (3) comparar el valor normalizado resultante con un segundo valor umbral, (4) diagnosticar la presencia o ausencia de células cancerosas en la muestra basándose en estos resultados de comparación y obtener un resultado de diagnóstico para una visualización 102c.

10

15

20

La parte de resultado 600 no está particularmente limitada siempre y cuando pueda producir el resultado de diagnóstico obtenido en la parte de diagnóstico 500 y los ejemplos de la parte de resultado incluyen una parte de impresión, una visualización, y una parte de resultado de audio. Específicamente, la parte de resultado puede ser un monitor, impresora o altavoz conectado a la parte de diagnóstico, preferiblemente un monitor.

25

El aparato en la presente realización puede incluir adicionalmente una parte de preparación de muestra de medición para preparar la muestra de medición descrita anteriormente. La parte de preparación de muestra de medición preferiblemente incluye una parte de concentración de células para concentrar células en una muestra (por ejemplo, una parte centrífugadora), una parte de extracción de ácido nucleico para extraer ácidos nucleicos de las células y una parte de concentración de ácido nucleico para concentrar los ácidos nucleicos obtenidos.

30

En las FIGS. 1 a 3, se muestra una realización del aparato para diagnosticar metástasis de cáncer de acuerdo con la presente invención. La FIG. 1 es una vista en perspectiva que muestra toda la constitución del aparato de diagnóstico de acuerdo con una realización de la presente invención. La FIG. 2 es una vista en perspectiva que muestra toda la constitución de un aparato de medición por amplificación de ácidos nucleicos como la parte de medición mostrada en la FIG. 1. La FIG. 3 es una vista esquemática en planta de un aparato de medición por amplificación de ácidos nucleicos en la FIG. 2.

35

Como se muestra en la FIG. 1, el aparato de diagnóstico 1 en una realización de la presente invención puede estar compuesto por un aparato de medición por amplificación de ácidos nucleicos 101 y un ordenador personal (PC) 102 conectado al aparato de medición por amplificación de ácidos nucleicos para permitir comunicación entre ellos con o sin una línea. El ordenador personal (PC) 102 funciona como la primera parte de comparación 200, la segunda parte de comparación 400, la parte de normalización 300, la parte de diagnóstico 500 y la parte de resultado 600.

40

Como se muestra en la FIG. 2, el aparato de medición por amplificación de ácidos nucleicos 101 incluye una parte mecánica dispensadora 10, una parte de ajuste de muestra 20, una parte de ajuste de microplaca 30, una parte de colocación de microplaca 40, una parte de detección de reacción 50 compuesta por cinco bloques de detección de reacción 50a y una parte de transferencia 60 para transferir la parte mecánica dispensadora 10 en las direcciones axiales X e Y.

45

Como se muestra en la FIG. 2, la parte mecánica dispensadora 10 incluye un brazo 11 que se mueve en las direcciones axiales X e Y (en la dirección horizontal) por medio de la parte de transferencia 60 y dos jeringas 12 que pueden moverse independientemente en la dirección axial Z (en la dirección vertical) con respecto al brazo 11.

50

Como se muestra en las FIGS. 2 y 3, la parte de ajuste de muestra 20 se proporciona con diez orificios de ajuste de recipiente de muestra 21a a 21j, un orificio de ajuste de recipiente de reactivo enzimático 21k y un orificio de ajuste de recipiente de reactivo cebador 211 en el orden desde la parte anterior del aparato. Los diez orificios de ajuste de recipiente de muestra 21a a 21j están dispuestos en 2 líneas cada una con 5 orificios. Después, los orificios de ajuste de recipiente de muestra 21c y 21d, los orificios de ajuste de recipiente de muestra 21e y 21f, los orificios de ajuste de recipiente de muestra 21g y 21h, y los orificios de ajuste de recipiente de muestra 21i y 21j se disponen en una posición de ajuste de muestra 1, una posición de ajuste de muestra 2, una posición de ajuste de muestra 3 y una posición de ajuste de muestra 4 respectivamente en el orden desde la parte posterior del aparato.

55

60

En la presente realización, se prepara un recipiente de muestra 22 que da cabida a una muestra de medición preparada tratando una muestra, tal como tejido nodular linfático o un lavado de cavidad abdominal, que se ajusta en los orificios de ajuste de recipiente de muestra 21c, 21e, 21g y 21i en la parte izquierda anterior. Un recipiente de muestra 23 que da cabida a una muestra diluida preparada diluyendo la muestra de medición 10 veces se ajusta en

65

los orificios de ajuste de recipiente de muestra 21d, 21f, 21h y 21j en la parte derecha anterior.

Un recipiente 24 que da cabida a un control positivo para confirmar que un ácido nucleico que debe amplificarse está normalmente amplificado se ajusta en el orificio de ajuste de recipiente de muestra 21a. Un recipiente 25 que da cabida a un control negativo para confirmar que un ácido nucleico que no debe amplificarse no está normalmente amplificado se coloca en el orificio de ajuste del recipiente de muestra 21b.

Un recipiente de reactivo enzimático 26 que da cabida a un reactivo enzimático de amplificación de ácido nucleico para amplificar el ácido nucleico se ajusta en un orificio de ajuste de recipiente de reactivo enzimático 21k. Un recipiente de reactivo enzimático 27 que da cabida a un reactivo cebador para amplificar un ADNc correspondiente al ARNm del antígeno carcinoembrionario (en lo sucesivo en el presente documento denominado simplemente CEA) se ajusta en un orificio de ajuste de un recipiente de reactivo cebador 21l. Un recipiente de reactivo cebador 28 que da cabida a un reactivo cebador para amplificar un ADNc correspondiente al ARNm de β -actina se ajusta en un orificio de ajuste de recipiente de reactivo cebador 21m.

Como se muestra en las FIGS. 2 y 3, cada uno de los bloques de detección de reacción 50a en la parte de detección de reacción 50 están formados por una parte de reacción 51, dos partes de detección de turbidez 52 y una parte mecánica tapada con una tapa 53 (véase FIG. 2). Como se muestra en la FIG. 3, la parte de reacción 51 dispuesta en cada bloque de detección de reacción 50a se proporciona con dos orificios de ajuste de células de detección 51a para ajustar una célula de detección 54. Los bloques de detección de reacción 50a se disponen en una posición de ajuste de célula 1, una posición de ajuste de célula 2, una posición de ajuste de célula 3, una posición de ajuste de célula 4 y una posición de ajuste de célula 5 respectivamente en el orden desde la parte trasera del aparato.

La parte de detección de turbidez 52 está compuesta de una fuente de luz LED 52a que consiste en una LED azul que tiene una longitud de onda de 465 nm unida a un sustrato 55a dispuesto en un lado de la parte de reacción 51 y una parte receptora de luz fotodiódica unida a un sustrato 55b dispuesto en el otro lado de la parte de reacción 51. Cada bloque de detección de reacción 50a está provisto de dos conjuntos cada uno consistiendo en una parte de detección de turbidez 52 que incluye una fuente de luz LED 52a y una parte receptora de luz fotodiódica 52b.

La célula de detección 54 tiene dos partes de célula 54a para dar cabida a una muestra de medición y dos tapas 54b para cerrar las dos partes de célula 54a.

Como se muestra en la FIG. 2, una parte de transferencia 60 incluye una guía de desplazamiento 61 y una rosca de bola 62 para transferir la parte mecánica dispensadora 10 en la dirección axial Y, un motor de velocidad gradual 63 para accionar la rosca de bola 62, una guía de desplazamiento 64 y una rosca de bola 65 para transferir la parte mecánica dispensadora 10 en la dirección axial X, y un motor de velocidad gradual 66 para accionar la rosca de bola 65. La transferencia de la parte mecánica dispensadora 10 en las direcciones axiales X e Y se realiza girando las roscas de bola 62 y 65 con los motores de velocidad gradual 63 y 66, respectivamente.

Como se muestra en la FIG. 1, el ordenador personal (PC) 102 incluye dispositivos de entrada que son un teclado 102a y ratón 102b, consistiendo la pantalla 102c en un monitor y el controlador 102d para comparar, normalizar y diagnosticar el resultado de medición de una muestra. Mediante un comando memorizado en una memoria contenida en el ordenador personal (PC) 102, el controlador 102d funciona como una primera parte de comparación 200, una segunda parte de comparación 400, una parte de normalización 300 y una parte de diagnóstico 500. Después, el resultado de diagnóstico obtenido en el controlador 102d se presenta en una visualización 102c. Es decir, el ordenador personal (PC) 102 funciona como un sistema informático que diagnostica la presencia o ausencia de células cancerosas en la muestra de medición, basándose en el resultado de medición en el aparato de medición por amplificación de ácidos nucleicos como una parte de medición y obtiene el resultado de diagnóstico.

El aparato de diagnóstico en la realización descrita anteriormente está formado por el aparato de medición por amplificación de ácidos nucleicos 101 y el ordenador personal (PC) 102 conectado al aparato de medición por amplificación de ácidos nucleicos 101, pero las funciones del ordenador personal (PC) 102 pueden integrarse en el aparato de medición por amplificación de ácidos nucleicos 101.

La FIG. 5 es un diagrama de flujo que muestra el funcionamiento de un aparato de diagnóstico 1 de acuerdo con la presente realización. El funcionamiento del aparato de diagnóstico 1 se describe con referencia a la FIG. 5. El aparato descrito en lo sucesivo en el presente documento es un aparato capaz de ejecutar las siguientes etapas: 1) un gen marcador de cáncer (CEA) y un gen constitutivo (β -actina) presente en un lavado de cavidad abdominal obtenido por lavado de la cavidad abdominal de un paciente sometido a cirugía de cáncer de estómago se amplifica mediante el método LAMP, 2) un cambio de turbidez blanca atribuible al pirofosfato de magnesio formado acompañando a la amplificación se mide por lo tanto determinando valores relacionados con los niveles de expresión de CEA y β -actina, 3) estos valores se comparan con un valor umbral, para diagnosticar la presencia o ausencia de células cancerosas en el lavado de cavidad abdominal y 4) se proporciona información para facilitar el diagnóstico de metástasis de cáncer de estómago. En la siguiente descripción, se describe principalmente el funcionamiento en un mecanismo para medir el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer, pero esta descripción también se aplica al funcionamiento en un mecanismo para medir el valor relacionado

con el nivel de expresión del gen constitutivo.

Como se muestra en las FIGS. 2 y 3, un recipiente de muestra 22 que da cabida a una muestra de medición preparada por tratamiento de un lavado de cavidad abdominal (mediante concentración, extracción de ácido nucleico, etc.) se ajusta en orificios de ajuste de recipiente de muestra 21c a 21j (etapa S1). Independientemente, un recipiente 24 que da cabida a un control positivo y un recipiente 25 que da cabida a un control negativo se ajustan en orificios de ajuste de recipiente de muestra 21a y 21b, respectivamente (véase la FIG. 3) (etapa S2). Un recipiente de reactivo enzimático 26 que da cabida a un reactivo enzimático de amplificación de ácido nucleico para la amplificación de ácido nucleico, un recipiente de reactivo cebador 27 que da cabida a un reactivo cebador (reactivo cebador de CEA) para la amplificación de CEA y un recipiente de reactivo cebador 28 que da cabida a un reactivo cebador (reactivo cebador de β -actina) para la amplificación de β -actina se ajusta en un orificio de ajuste de recipiente de reactivo enzimático 21k, un orificio de ajuste de recipiente de reactivo de cebador 211 y un orificio de ajuste de recipiente de reactivo cebador 211 respectivamente (etapa S3). Dos rejillas 32 que dan cabida a 36 microplacas de pipeta desechables 31 se disponen en una parte de ajuste de microplaca 30 (etapa S4).

Cuando el aparato de medición por amplificación de ácidos nucleicos 101 comienza a funcionar (etapa S5), un brazo 11 de la parte mecánica dispensadora 10 se transfiere desde la posición inicial de la parte de ajuste de microplaca 30 mediante la parte de transferencia 60 mostrada en la FIG. 2 y en la parte de ajuste de microplaca 30, dos jeringas 12 de la parte mecánica dispensadora 10 se transfieren hacia abajo. Las puntas de las boquillas de las dos jeringas 12 se presionan hacia el interior de las aberturas superiores de las dos microplacas de pipeta 31 y de esta manera las placas de pipeta 31 se ajustan automáticamente hacia el interior de las puntas de las boquillas de las dos jeringas 12 (etapa S6). Después, las dos jeringas 12 se transfieren hacia arriba y después el brazo 11 de la parte mecánica dispensadora 10 se transfiere en la dirección axial X a una posición por encima del recipiente del reactivo cebador 27 que da cabida a un reactivo cebador de CEA. Después, una jeringa 12 colocada por encima del recipiente de reactivo cebador 27 se transfiere hacia abajo, para succionar el reactivo cebador de CEA y después se transfiere hacia abajo (etapa S7). Después de esto, el brazo 11 de la parte mecánica dispensadora 10 se transfiere en la dirección axial Y por la parte de transferencia 60 hasta que la otra jeringa 12 se coloca por encima del mismo recipiente de reactivo cebador 27. Después, la otra jeringa 12 se transfiere hacia abajo, para succionar el reactivo cebador de CEA desde el mismo recipiente de reactivo cebador 27 y después se transfiere hacia abajo (etapa S8). De esta manera, el reactivo cebador de CEA en el recipiente de reactivo cebador 27 se succiona mediante las dos microplacas de pipeta 31 acopladas en las jeringas 12.

Las dos jeringas 12 que han succionado el reactivo cebador de CEA se transfieren hacia arriba y después el brazo 11 de la parte mecánica dispensadora 10 se transfiere mediante la parte de transferencia 60 a una posición por encima del bloque de detección de reacción 50a colocado en la posición de ajuste de célula 1 en el lado más posterior (lado posterior de la parte anterior de aparato). En el bloque de detección de reacción 50a en el lado más posterior, las dos jeringas 12 se transfieren hacia abajo, por lo que las dos microplacas de pipeta 31 acopladas en las dos jeringas 12 se insertan respectivamente en dos partes de célula 54a de la célula de detección 54. Usando las jeringas 12, el reactivo cebador de CEA se descarga hacia el interior de las dos partes de célula 54a respectivamente (etapa S9).

Después descargar el reactivo cebador de CEA, las dos jeringas 12 se mueven hacia arriba y después el brazo 11 de la parte mecánica dispensadora 10 se transfiere en la dirección axial X hasta una posición por encima de una parte de disposición de microplaca 40 mediante la parte de transferencia 60. Después, la microplaca de pipeta 31 se dispone en la parte de disposición de microplaca 40 (etapa S10). Específicamente, las dos jeringas 12 se transfieren hacia abajo, por lo tanto las microplacas de pipeta 31 se insertan en dos orificios dispensadores de microplaca 40a de la parte de disposición de microplaca 40 (véase FIG. 3). En este estado, el brazo 11 de la parte mecánica dispensadora 10 se transfiere en la dirección axial Y por la parte de transferencia 60, transfiriendo de esta manera las microplacas de pipeta 31 por debajo del surco 40b. Después, las dos jeringas 12 se transfieren hacia arriba, por lo cual un elemento de collar de la superficie superior de la microplaca de pipeta 31 se pone en contacto contra los lados inferiores del surco 40b y reciben fuerza hacia abajo desde los lados inferiores y de esta manera las microplacas de pipeta 31 se desprenden automáticamente de las boquillas de las dos jeringas 12. Las microplacas de pipeta 31 se liberan de esta manera en la parte de disposición de microplaca 40.

Después, el reactivo enzimático se descarga desde el recipiente de reactivo enzimático 26 hacia el interior de la parte de célula 54a mediante el mismo movimiento (etapa S11), y las muestras se descargan desde los recipientes de muestra 22 y 23 hacia el interior de las partes de célula 54a mediante el mismo movimiento (etapa S12).

Después, el reactivo cebador de CEA, el reactivo enzimático y la muestra se descargan hacia el interior de la parte de célula 54a, y después se cierra la tapa 54b de la célula de detección 54 (etapa S13). Después del cierre de la tapa, la temperatura del líquido en la célula de detección 54 aumenta desde aproximadamente 20 °C a aproximadamente 65 °C, por lo cual un ADNc correspondiente al ARNm de CEA, como un gen marcador de cáncer, se amplifica mediante RT-LAMP (etapa S14). Después, se detecta, por turbidimetría, la turbidez blanca atribuible al pirofosfato de magnesio complementario formado en la amplificación. Específicamente, los datos de turbidez A se detectan detectando (monitorizando) la turbidez en la célula de detección 54 durante la reacción de amplificación, usando una fuente de luz LED 52a y una parte receptora de luz fotodiodica 52b mostrada en la FIG. 3 (etapa S15).

Individualmente, los datos de turbidez B relacionados con la expresión de un gen constitutivo de β -actina se detecta mediante el mismo movimiento al descrito anteriormente (etapa S16).

Los datos de turbidez obtenidos se transmiten en tiempo real desde el aparato de medición por amplificación de ácidos nucleicos 101 al ordenador personal (PC) 102. El controlador 102d en el ordenador personal (PC) 102 compara los datos de turbidez A en el gen marcador de cáncer con un primer umbral C1 previamente determinado (etapa S17), normaliza los datos de turbidez A en el gen marcador de cáncer basándose en los datos de turbidez B del gen constitutivo (etapa S18), compara el valor normalizado resultante D con un segundo umbral C2 previamente determinado (etapa S19), diagnostica la presencia o ausencia de células cancerosas basándose en el resultado de comparación resultante (etapa S20) y produce el resultado de diagnóstico (etapa S21). Basándose en este resultado obtenido, un médico puede, por ejemplo, juzgar metástasis de cáncer.

El diagnóstico de la presencia o ausencia de células cancerosas en la etapa S20 puede realizarse mediante el mismo tratamiento al de la etapa de diagnóstico en la presente realización descrita anteriormente. Es decir, es preferible que las células cancerosas a diagnosticar estén presentes en la muestra de medición cuando el dato de turbidez A en el gen marcador de cáncer sean igual a o mayor al del primer umbral C1 en la etapa S17, y/o el valor normalizado D sea igual a o mayor al del segundo umbral C2 en la etapa S19.

Específicamente, es preferible que en la etapa S20, las células cancerosas a diagnosticar estén presentes en la muestra de medición en cualquiera de los siguientes casos:

Caso (A) en el que el resultado de comparación en la etapa S17 es:

(datos de turbidez (A) $\geq$ (primer umbral C1), mientras que el resultado de comparación en la etapa S19 es:

(valor normalizado D) $<$ (segundo umbral C2);

Caso (B) en el que el resultado de comparación en la etapa S17 es:

(datos de turbidez (A) $<$ (primer umbral C1), mientras que el resultado de comparación en la etapa S19 es:

(valor normalizado D) $\geq$ (segundo umbral C2); y

Caso (C) en el que el resultado de comparación en la etapa S17 es:

(datos de turbidez (A) $\geq$ (primer umbral C1), y el resultado de comparación en la etapa S19 es:

(valor normalizado D) $\geq$ (segundo umbral C2).

La FIG. 7 es un ejemplo visual del visualizador 102c mostrado en la FIG. 1. En la FIG. 7, 111 es un área visualizadora para una barra de herramientas que muestra botones para ejecutar diversas funciones tales como la función de ayuda, 112 es un área visualizadora para una visualización de información de muestra de medición para visualizar diversa información sobre una muestra de medición y 113 es un área visualizadora para una visualización de un resultado de medición para visualizar un resultado de medición de la muestra de medición visualizada en el visualizador de información de muestra de medición 112.

El visualizador de información de muestra de medición 112 se proporciona con un área de visualización del número de muestra 112a, un área de visualización del tipo de muestra 112b, un área de visualización de sitio 112c, un área de visualización de comentario 112d, un área de visualización de la fecha de medición 112e y un área de visualización de la hora de medición 112f. El área de visualización del número de muestra 112a muestra el número de muestra de una muestra de medición usada. El área de visualización del tipo de muestra 112b muestra el tipo de una muestra recogida del paciente. El tipo de una muestra recogida de un paciente incluye, por ejemplo, un tejido de nódulo linfático, sangre y lavado de cavidad abdominal y un lavado de cavidad torácica. El área de visualización de sitio 112 muestra información sobre el sitio del cual se extrae la muestra del paciente. En la FIG. 7, se visualiza, por ejemplo, "subdiafragmática izquierda" en el área de visualización de sitio 112c. A partir de esto, puede saberse que esta muestra de medición es una muestra de medición preparada de un lavado de cavidad abdominal subdiafragmática izquierda. El área de visualización de comentario 112d visualiza otra información sobre la muestra de medición, que está disponible para el diagnóstico de metástasis de cáncer. El área de visualización de fecha de medición 112e y el área de visualización de la hora de medición 112f muestran la fecha de medición de la muestra de medición (en la Figura, "26/09/2005"), y la hora de medición de la muestra de medición (en la Figura, "12 : 53 : 06"), respectivamente.

El visualizador de resultados de medición 113 se proporciona con un gráfico 113a, un primer área visualizador de resultados de medición 113b, un segundo área de visualización de resultados de medición 113c, un área de visualización de valor normalizado 113d, un primer área de visualización de resultados de diagnóstico 113e, un

segundo área de visualización de resultados de diagnóstico 113e y un área de visualización de resultados de diagnóstico completo 113g. El gráfico 113a visualiza un gráfico que presenta la relación entre un valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer y un primer valor umbral y entre un valor normalizado obtenido normalizando un valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer, basándose en el nivel de expresión del gen constitutivo y un segundo valor umbral, en la muestra de medición mostrada en el visualizador de información de muestra de medición 112. En la FIG. 7, el gráfico 113a muestra, en el eje de abscisas, la relación entre el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer y el primer valor umbral y en el eje de ordenadas la relación entre el valor normalizado y el segundo valor umbral. El primer área de visualización de resultado de medición 113b visualiza el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer. En la FIG. 7, el primer área de visualización de resultados de medición 113 visualiza la cantidad de ARNm de CEA (copias/ μ l) como el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer. El segundo área de visualización de resultados de medición 113c visualiza el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo. En la FIG. 7, el segundo área de visualización de resultados de medición 113c visualiza la cantidad de ARNm de β -actina (copias/ μ l) como el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo. El área de visualización del valor normalizado 113d visualiza el valor normalizado. En la FIG. 7, 113d visualiza, como valor normalizado, un valor obtenido dividiendo la cantidad de ARNm de CEA entre la cantidad de ARNm de β -actina. El primer área de visualización del resultado de diagnóstico 113e visualiza información sobre un resultado de diagnóstico (primer resultado de diagnóstico) concerniente a la presencia o ausencia de células cancerosas en la muestra de medición, en base al resultado de comparación entre el valor relacionado con el nivel de expresión del gen marcador de cáncer y el primer valor umbral. En la FIG. 7, el primer área de visualización del resultado de diagnóstico 113e visualiza “-” como información sobre el primer resultado de diagnóstico. “-” lo que indica que, en la muestra de medición, no están presentes células cancerosas. El segundo área de visualización del resultado de diagnóstico 113f visualiza información sobre un resultado de diagnóstico (segundo resultado de diagnóstico) concerniente a la presencia o ausencia de células cancerosas en la muestra de medición, en base al resultado de comparación entre el valor normalizado y el segundo valor umbral. La FIG. 7, el segundo área de visualización del resultado diagnóstico 113f muestra “+” como información sobre el segundo resultado de diagnóstico. El símbolo “+” indica que, en la muestra de medición, están presentes células cancerosas. El área de visualización de resultado de diagnóstico completo 113g visualiza información sobre un resultado de diagnóstico completo concerniente a la presencia o ausencia de células cancerosas en la muestra de medición, en base a los resultados del primer y segundo diagnóstico. En la FIG. 7, el área de visualización del resultado de diagnóstico completo 113g presenta “+” como información sobre el resultado de diagnóstico completo.

Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describe con más detalle por referencia a los Ejemplos, pero la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos.

(1) Recogida de lavados de cavidad abdominal y preparación de muestras

En intervenciones quirúrgicas de 50 pacientes con cáncer de estómago, se recogieron lavados de cavidad abdominal para examinar metástasis de cáncer de estómago. Específicamente, la cavidad abdominal se abrió, después se inyectaron 100 ml de solución salina fisiológica dentro de la cavidad abdominal (sitios subhepático, subdiafragmático izquierdo y/o saco de Douglas) para lavar la cavidad y se recogió el lavado. El lavado de cavidad abdominal recogido se centrifugó a aproximadamente 3.000 xg durante 10 minutos y después se eliminó el sobrenadante, con lo que se obtuvo una muestra de aproximadamente 50 a 100 μ l.

Estos 50 pacientes consistían en 17 pacientes con metástasis de cáncer de estómago reconocida y 33 pacientes sin metástasis reconocida mediante biopsia celular.

(2) RT-PCR

La muestra preparada en (1) se trató usando el Kit RNeasy Mini (fabricado por QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para proporcionar 50 μ l de una solución de ARN purificada.

La solución de ARN purificada resultante se midió para determinar la cantidad de ARNm de CEA como gen marcador de cáncer y la cantidad de ARN de β -actina como gen constitutivo respectivamente mediante RT-PCR cuantitativa (TaqMan™ RT-PCR) con los siguientes cebadores en una solución de reacción que tenía la composición mostrada a continuación.

Cebadores para la amplificación de ARNm de CEA:

Cebador directo: 5'-agacaatcacagtctctgcgga-3' (SEC ID N°: 1)

Cebador inverso: 5'-atcctgtcctccacgggtt-3' (SEC ID N°: 2)

Sonda TaqMan: 5'-FAM-agctgccaagccct-TAMRA-3' (SEC ID N°: 17)

Cebadores para la amplificación del ARNm de β -actina:

Cebador directo: 5'-ccacactgtgcccatctacg-3' (SEC ID N°: 13)

Cebador inverso: 5'-aggatctcatgaggtagtcagtcag-3' (SEC ID N°: 14)

5 Sonda TaqMan: 5'-FAM-atgccctcccccatgccatcctcggt-TAMRA-3' (SEC ID N°: 18)

Composición para la solución de reacción RT-PCR

1 X mezcla Maestra de RT-PCR TaqMan™ en una etapa (fabricada por Applied Biosystems)

10 Cebador directo: 300 nM

Cebador inverso: 300 nM

Sonda TaqMan: 250 nM

Solución de ARN purificado: 1 μ l

Total: 25 μ l

15 Usando PRISM7700 (fabricado por Applied Biosystems), la solución de reacción se sometió a transcripción inversa a 50 °C durante 30 minutos y a 95 °C durante 15 minutos para amplificar el ADNc, después se sometió a 40 ciclos de reacción PCR, consistiendo cada ciclo de reacción PCR a 95 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 30 segundos, y se midió para determinar su intensidad por fluorescencia.

20 Previamente se preparó una curva patrón en la que las concentraciones de ARNm se representaron frente a la intensidad de fluorescencia usando soluciones patrón que contenían cantidades conocidas de ARNm preparadas por transcripción *in vitro* de cada gen clonado a partir de células cultivadas, y se determinaron las cantidades del ARNm de CEA y ARNm de β -actina en la muestra basándose en la curva patrón. La unidad es el número de copias de ARNm/ μ l.

25 La cantidad determinada de ARNm de CEA se muestra en "valor absoluto de CEA" en la Tabla 2. Este valor se comparó con un valor umbral (primer valor umbral) de 20 copias/ μ l. Las muestras que tenían el ARNm en una cantidad igual o mayor que el valor umbral se diagnosticaron como positivas "+", mientras que las muestras que tenían el ARNm en una cantidad inferior al valor umbral se diagnosticaron como negativas "-". El resultado de diagnóstico se muestra como "Juicio de Valor Absoluto" en la Tabla 3.

35 Se obtuvo un valor (valor normalizado) dividiendo la cantidad determinada del ARNm de CEA entre la cantidad de ARNm de β -actina. El valor normalizado obtenido de esta manera se muestra en la Tabla 2 como "Valor Normalizado CEA/Actina". Este valor se comparó con un valor umbral (segundo valor umbral) de 1×10^{-5} . Las muestras que tenían un valor normalizado igual o mayor que el valor umbral se diagnosticaron como positivas "+", mientras que las muestras que tenían un valor normalizado inferior al valor umbral se diagnosticaron como negativas "-". Los resultados del diagnóstico se muestran en la Tabla 3 como "Juicio de Valor Normalizado".

40 Las muestras que fueron positivas en el juicio de valor absoluto y/o el juicio de valor normalizado se diagnosticaron como positivas "+" para la presencia de células cancerosas. Este resultado se muestra en la Tabla 3 como "Juicio Completo".

45 Los resultados de la Tabla 2 y 3 se muestran en el gráfico de la Figura 8 en el que el "Valor Absoluto de CEA" se muestra en el eje de abscisas y el "Valor Normalizado de CEA/Actina" en el eje de ordenadas.

Tabla 2

N°	Sitio	Resultado de la Biopsia	Valor Absoluto de CEA	Valor Absoluto de Actina	Valor Normalizado de CEA/Actina
1	subdiafragmático izquierdo	+	1,5E+01	5,0E+05	2,9E-05
2	saco de Douglas	+	7,1E+02	8,1E+05	8,8E-04
3	subdiafragmático izquierdo	+	1,3E+02	7,6E+05	1,7E-04
4	saco de Douglas	+	5,2E+02	3,9E+06	1,3E-04
5	saco de Douglas	+	4,7E+04	4,5E+06	1,0E-02
6	saco de Douglas	+	3,7E+03	8,9E+07	4,1E-05
7	subhepático	+	1,7E+02	3,0E+07	5,6E-06

ES 2 375 399 T3

8	subhepático	+	2,4E+01	2,4E+05	9,9E-05
9	subhepático	+	3,0E+03	3,0E+06	1,0E-03
10	subdiafragmático izquierdo	+	4,7E+01	1,5E+06	3,2E-05
11	saco de Douglas	+	2,7E+04	3,1E+07	8,9E-04
12	saco de Douglas	+	1,5E+05	7,0E+06	2,2E-02
13	subdiafragmático izquierdo	+	1,0E+01	1,9E+05	5,2E-05
14	saco de Douglas	+	6,5E+03	3,1E+08	2,1E-05
15	saco de Douglas	+	9,6E+03	7,6E+07	1,3E-04
16	saco de Douglas	+	1,1E+03	3,6E+07	3,1E-05
17	saco de Douglas	±	2,9E+01	3,6E+07	7,9E-07
18	saco de Douglas	-	ND	8,9E+05	-
19	subdiafragmático izquierdo	-	ND	8,1E+05	-
20	subdiafragmático izquierdo	-	7,7E+01	1,6E+07	4,7E-06
21	subhepático	-	1,8E+01	5,7E+05	3,1E-05
22	saco de Douglas	-	ND	1,2E+05	-
23	subdiafragmático izquierdo	-	ND	9,2E+05	-
24	saco de Douglas	-	ND	5,8E+05	-
25	saco de Douglas	-	ND	9,7E+07	-
26	subdiafragmático izquierdo	-	ND	1,7E+07	-
27	saco de Douglas	-	ND	3,7E+07	-
28	saco de Douglas	-	1,9E+02	1,1E+07	1,7E-05
29	saco de Douglas	-	ND	7,4E+05	-
30	saco de Douglas	-	ND	2,2E+06	-
31	saco de Douglas	-	6,7E+01	2,1E+07	3,3E-06
32	saco de Douglas	-	ND	7,5E+06	-
33	saco de Douglas	-	1,3E+00	1,8E+05	7,4E-06
34	subdiafragmático izquierdo	-	ND	2,5E+05	-
35	subdiafragmático izquierdo	-	9,4E+01	1,4E+07	6,9E-06
36	saco de Douglas	-	ND	4,8E+06	-
37	saco de Douglas	-	ND	1,2E+08	-
38	saco de Douglas	-	ND	6,0E+05	-
39	saco de Douglas	-	ND	1,0E+07	-
40	saco de Douglas	-	ND	5,1E+07	-
41	saco de Douglas	-	ND	5,3E+05	-

42	saco de Douglas	-	ND	5,3E+05	-
43	saco de Douglas	-	ND	6,5E+06	-
44	saco de Douglas	-	ND	2,3E+06	-
45	saco de Douglas	-	ND	2,6E+06	-
46	subdiafragmático izquierdo	-	ND	4,5E+06	-
47	subdiafragmático izquierdo	-	ND	1,5E+05	-
48	saco de Douglas	-	1,1E+01	4,9E+06	2,3E-06
49	subdiafragmático izquierdo	-	2,8E+00	2,2E+05	1,2E-05
50	subdiafragmático izquierdo	-	1,1E+02	3,8E+07	2,8E-06

Tabla 3

Nº	Juicio de Valor Absoluto	Juicio de Valor Normalizado	Juicio Compresivo	Observaciones
1	-	+	+	
2	+	+	+	
3	+	+	+	
4	+	+	+	
5	+	+	+	
6	+	+	+	
7	+	-	+	
8	+	+	+	
9	+	+	+	
10	+	+	+	
11	+	+	+	
12	+	+	+	
13	-	+	+	
14	+	+	+	
15	+	+	+	
16	+	+	+	
17	+	-	+	
18	-	-	-	
19	-	-	-	
20	+	-	+	recurrencia peritoneal
21	-	+	+	saco de Douglas: positivo
22	-	-	-	
23	-	-	-	
24	-	-	-	
25	-	-	-	

26	-	-	-	
27	-	-		
28	+	+	+	progresión en pared gástrica: elevada
29	-	-	-	
30	-	-	-	
31	+	-	+	
32	-	-	-	
33	-	-	-	
34	-	-	-	
35	+	-	+	saco de Douglas: positivo
36	-	-	-	
37	-	-	-	
38	-	-	-	
39	-	-	-	
40	-	-		
41	-	-	-	
42	-	-	-	
43	-	-	-	
44	-	-		
45	-	-	-	
46	-	-	-	
47	-	-	-	
48	-	-	-	
49	-	+	+	recurrencia peritoneal
50	+	-	+	saco de Douglas: positivo

A partir de los resultados de las Tablas 2 y 3, se diagnosticó que tenían células cancerosas las muestras número 20, 21, 28, 31, 35, 49 y 50 entre las muestras diagnosticadas por biopsia como negativas con respecto a la presencia de células cancerosas, mediante el método de la presente invención. Entre estas muestras, las 6 muestras, excepto la muestra N° 31, eran muestras que se habían diagnosticado que eran positivas con respecto a la presencia de células cancerosas, en otro lavado de cavidad abdominal recogido de un sitio distinto al del lavado de cavidad abdominal usado como muestra, o eran muestras de pacientes que mostraron una elevada progresión de cáncer de estómago en la pared gástrica o tenían recurrencia peritoneal. Es decir, puede apreciarse que el método de la presente invención puede usarse para detectar una cantidad muy pequeña de células cancerosas incluso en muestras juzgadas libres de células cancerosas por biopsia, es decir, en muestras diagnosticadas negativas para metástasis de cáncer de estómago, permitiendo de esta manera un juicio más preciso de la presencia o ausencia de células cancerosas y, por consiguiente, proporcionando información útil para juzgar la metástasis de cáncer de estómago.

La anterior descripción detallada y ejemplos se han proporcionado a modo de explicación e ilustración y no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Para el experto en la materia serán evidentes muchas variaciones en las realizaciones actualmente preferidas, y continúan dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

Listado de secuencias

<110> Sysmex Corporation

<120> Método para juzgar metástasis de cáncer

<130> 07-082JP

<160> 18
 <170> PatentIn versión 3.1
 5
 <210> 1
 < 211> 22
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 10
 <220>
 < 223> Cebador
 <400> 1
 15 agacaatcac agtctctgcg ga 22
 <210> 2
 < 211> 20
 < 212> ADN
 20 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Cebador
 25 <400> 2
 atccttgccc tccacgggtt 20
 <210> 3
 < 211> 14
 < 212> ADN
 30 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Cebador
 35 <400> 3
 cctttcctcc tgct 14
 <210> 4
 < 211> 21
 < 212> ADN
 40 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Cebador
 45 <400> 4
 ccgaagtctc ctttctcca c 21
 50 <210> 5
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 55 <220>
 < 223> Cebador
 <400> 5
 60 cagatcgaag gcctgaagga 20
 <210> 6
 < 211> 19
 < 212> ADN
 65 < 213> Artificial

ES 2 375 399 T3

	<220>		
	< 223> Cebador		
5	<400> 6		
	cttgcccct cagcgctact	19	
	<210> 7		
	< 211> 22		
10	< 212> ADN		
	< 213> Artificial		
	<220>		
	< 223> Cebador		
15	<400> 7		
	ccaaacggat gaaactctga gc	22	
	<210> 8		
	< 211> 22		
20	< 212> ADN		
	< 213> Artificial		
	<220>		
	< 223> Cebador		
25	<400> 8		
	gcagttctgt gagccaaagg tc	22	
	<210> 9		
30	< 211> 26		
	< 212> ADN		
	< 213> Artificial		
	<220>		
35	< 223> Cebador		
	<400> 9		
	tgaaggtcgg tgtgaacgga ttggc	26	
	<210> 10		
40	< 211> 22		
	< 212> ADN		
	< 213> Artificial		
	<220>		
45	< 223> Cebador		
	<400> 10		
	tgttgggggc cgagttggga ta	22	
50	<210> 11		
	< 211> 21		
	< 212> ADN		
	< 213> Artificial		
55	<220>		
	< 223> Cebador		
	<400> 11		
60	caaatgctgg accaaacaca a	21	
	<210> 12		
	< 211> 22		
	< 212> ADN		
65	< 213> Artificial		

	<220> < 223> Cebador	
5	<400> 12 ttcaccttc caaagaccac at	22
10	<210> 13 < 211> 20 < 212> ADN < 213> Artificial	
15	<220> < 223> Cebador	
	<400> 13 ccacactgtg cccatctacg	20
20	<210> 14 < 211> 26 < 212> ADN < 213> Artificial	
25	<220> < 223> Cebador	
	<400> 14 aggatcttca tgaggtagtc agtcag	26
30	<210> 15 < 211> 21 < 212> ADN < 213> Artificial	
35	<220> < 223> Cebador	
	<400> 15 aagaagtcca agctggagtt c	21
40	<210> 16 < 211> 21 < 212> ADN < 213> Artificial	
45	<220> < 223> Cebador	
50	<400> 16 gttggtctgg aattctgtca g	21
55	<210> 17 < 211> 15 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> Sonda TaqMan	
60	<400> 17 agctgcccac gccct	15
65	<210> 18 < 211> 26 < 212> ADN < 213> Artificial	

ES 2 375 399 T3

<220>

< 223> Sonda TaqMan

<400> 18

5 atgccctccc ccatgccatc ctgcgt 26

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar la existencia o no de una célula cancerosa en una muestra que incluye una célula obtenida de un paciente, realizándose el método usando un aparato de medición por amplificación de ácidos nucleicos, que comprende:
 - una etapa de medición para medir un valor relacionado con el nivel de expresión de antígeno carcinoembrionario (CEA) y un valor relacionado con el nivel de expresión de un gen constitutivo; determinándose dichos niveles de expresión por medición de un producto de amplificación derivado de una amplificación de ácido nucleico;
 - una primera etapa de comparación para comparar el valor relacionado con el nivel de expresión de CEA con un primer valor umbral, siendo dicho primer valor umbral un valor igual o menor que el valor del nivel de expresión de CEA en una muestra en la que se ha confirmado que contiene células cancerosas y mayor que el valor del nivel de expresión de CEA en una muestra en la que se ha confirmado que no contiene células cancerosas;
 - una etapa de normalización para normalizar el valor relacionado con el nivel de expresión de CEA basándose en el valor relacionado con el nivel de expresión del gen constitutivo;
 - una segunda etapa de comparación para comparar el valor normalizado obtenido de la etapa de normalización con un segundo valor umbral, siendo dicho segundo valor umbral un valor igual o menor que un valor normalizado obtenido normalizando el valor del nivel de expresión de CEA en una muestra en la que se ha confirmado que contiene células cancerosas por el valor de un gen constitutivo en dicha muestra y superior a un valor normalizado obtenido normalizando el valor del nivel de expresión de CEA en una muestra que se ha confirmado que no contiene células cancerosas; y
 - una etapa de diagnóstico para diagnosticar la existencia o no de células cancerosas en la muestra basándose en los resultados de la comparación de la primera etapa de comparación y la segunda etapa de comparación.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de diagnóstico determina la existencia de la célula cancerosa en la muestra, cuando el valor relacionado con el nivel de expresión de CEA no es inferior al primer valor umbral y/o cuando el valor normalizado no es inferior al segundo valor umbral.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la primera etapa de diagnóstico determina la existencia de la célula cancerosa en la muestra, cuando el valor relacionado con el nivel de expresión de CEA no es inferior al primer valor umbral.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la segunda etapa de diagnóstico determina la existencia de la célula cancerosa en la muestra, cuando el valor normalizado no es inferior al segundo valor umbral.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la etapa de diagnóstico determina la existencia de la célula cancerosa en la muestra cuando al menos una de las etapas seleccionadas entre la primera etapa de diagnóstico de la reivindicación 3 y la segunda etapa de diagnóstico de la reivindicación 4 determina la existencia de la célula cancerosa en la muestra, no siendo el valor relacionado con el nivel de expresión de CEA inferior al primer valor umbral y no siendo el valor normalizado inferior al segundo valor umbral.

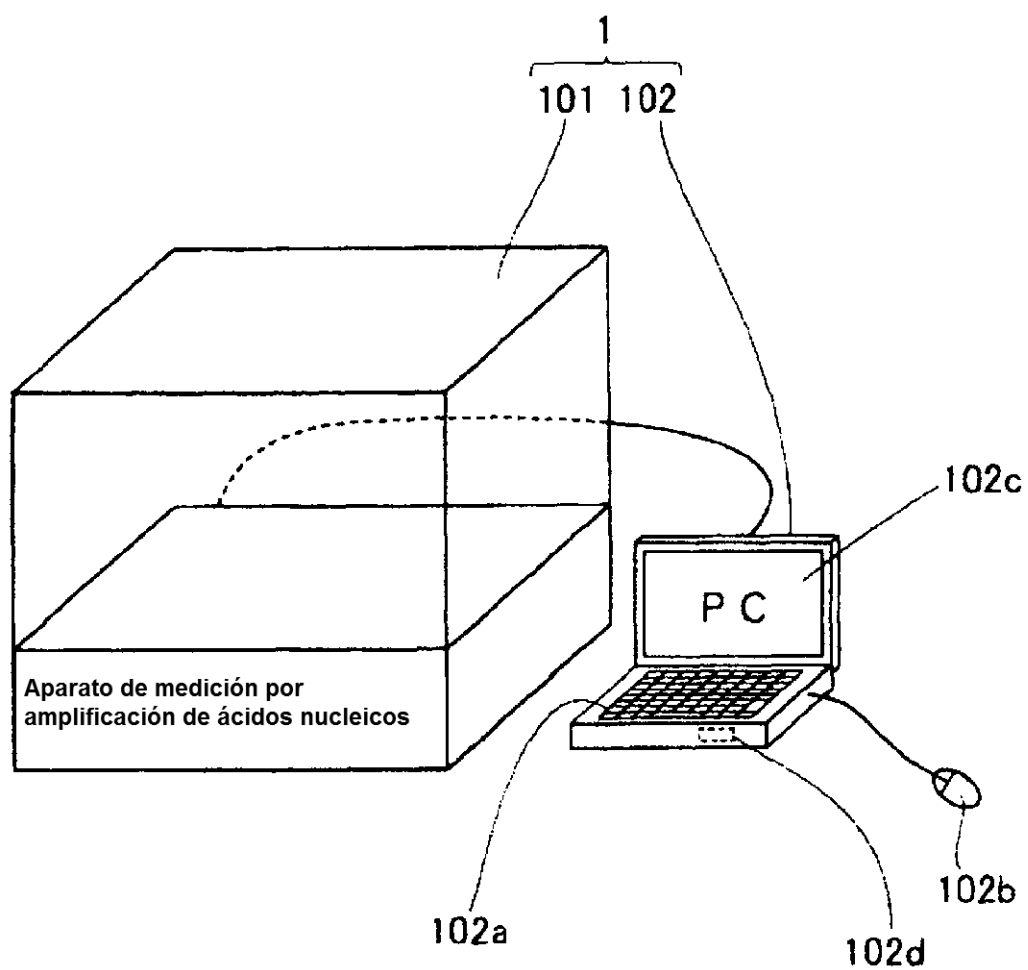


FIG. 1

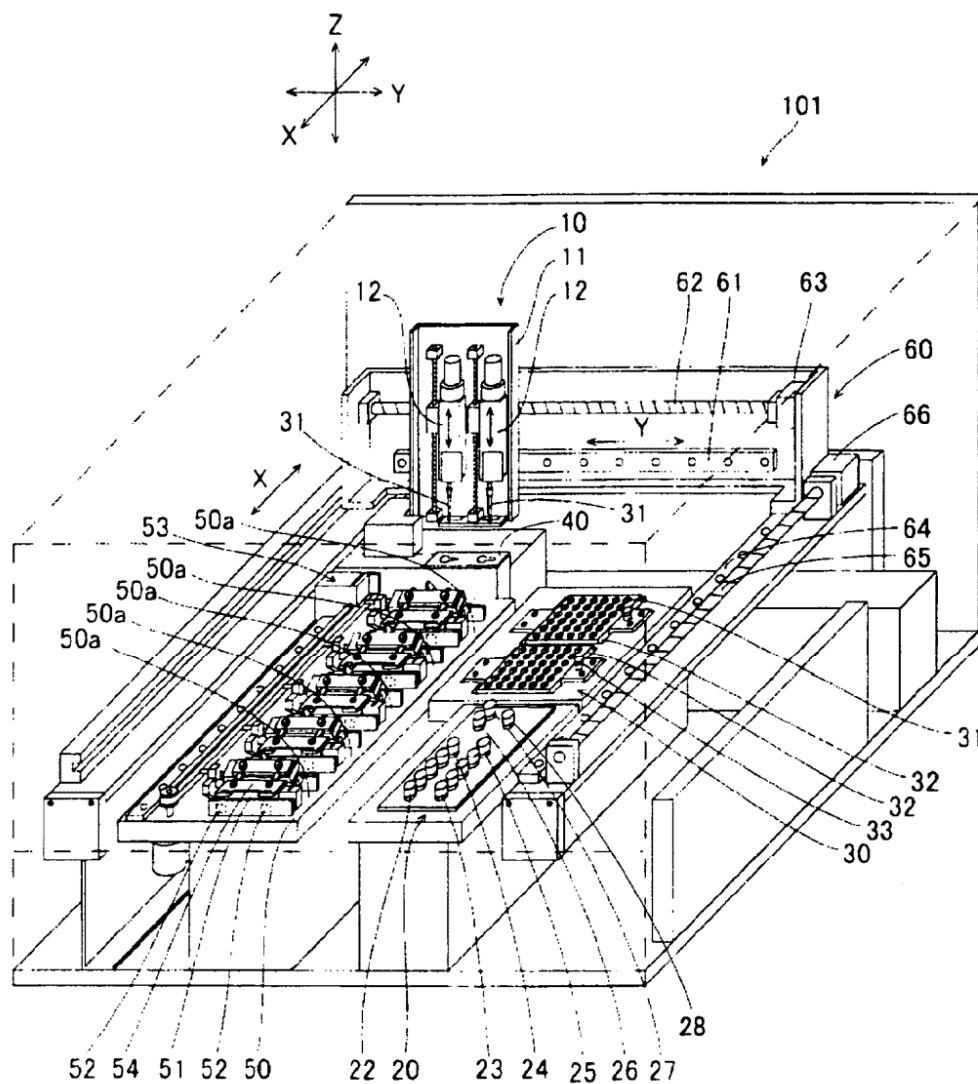


FIG. 2

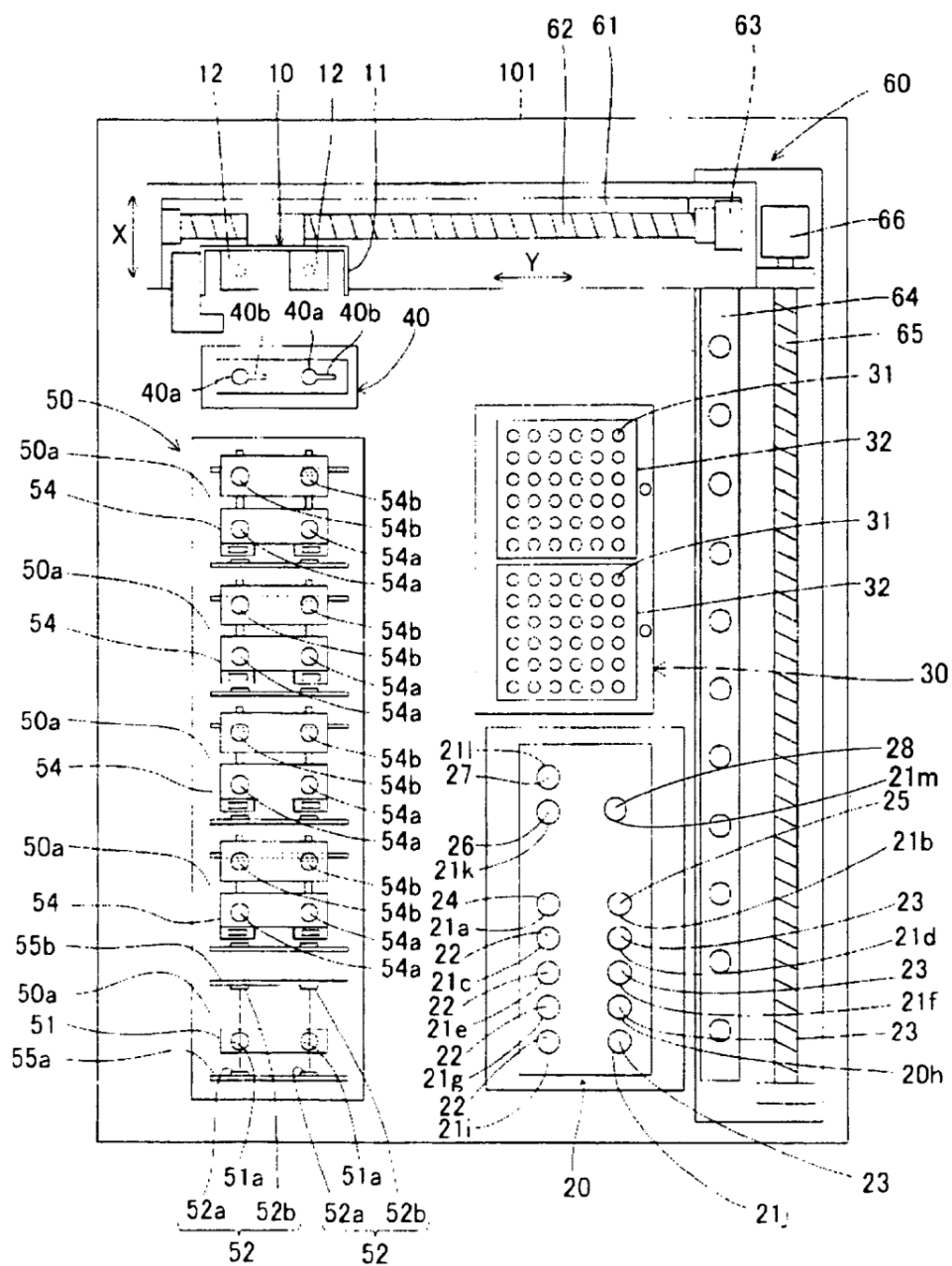
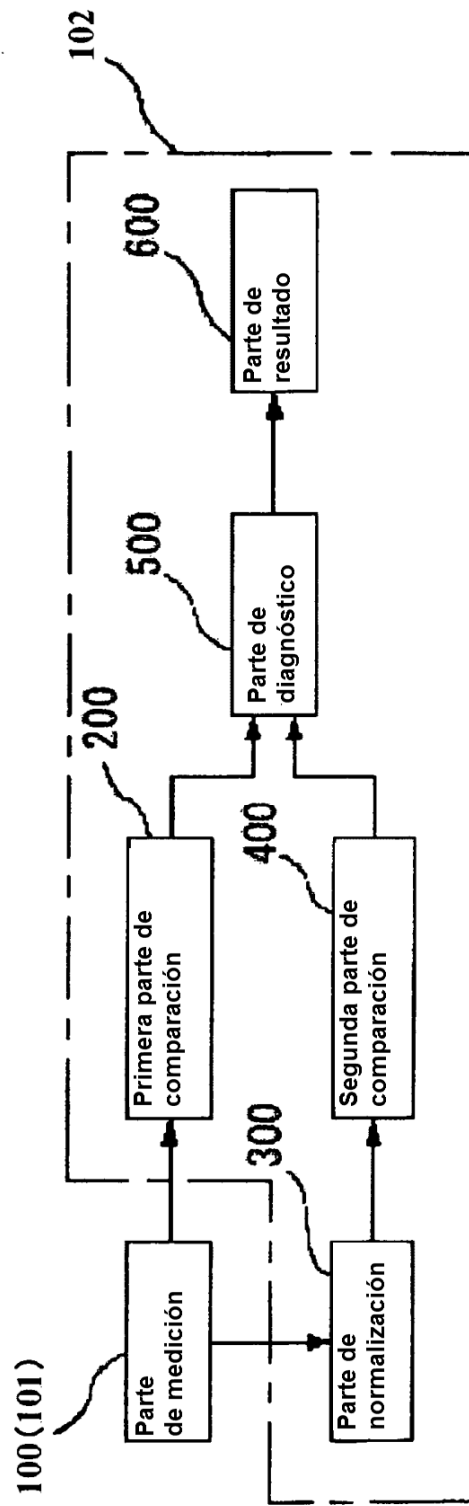


FIG. 3

FIG. 4



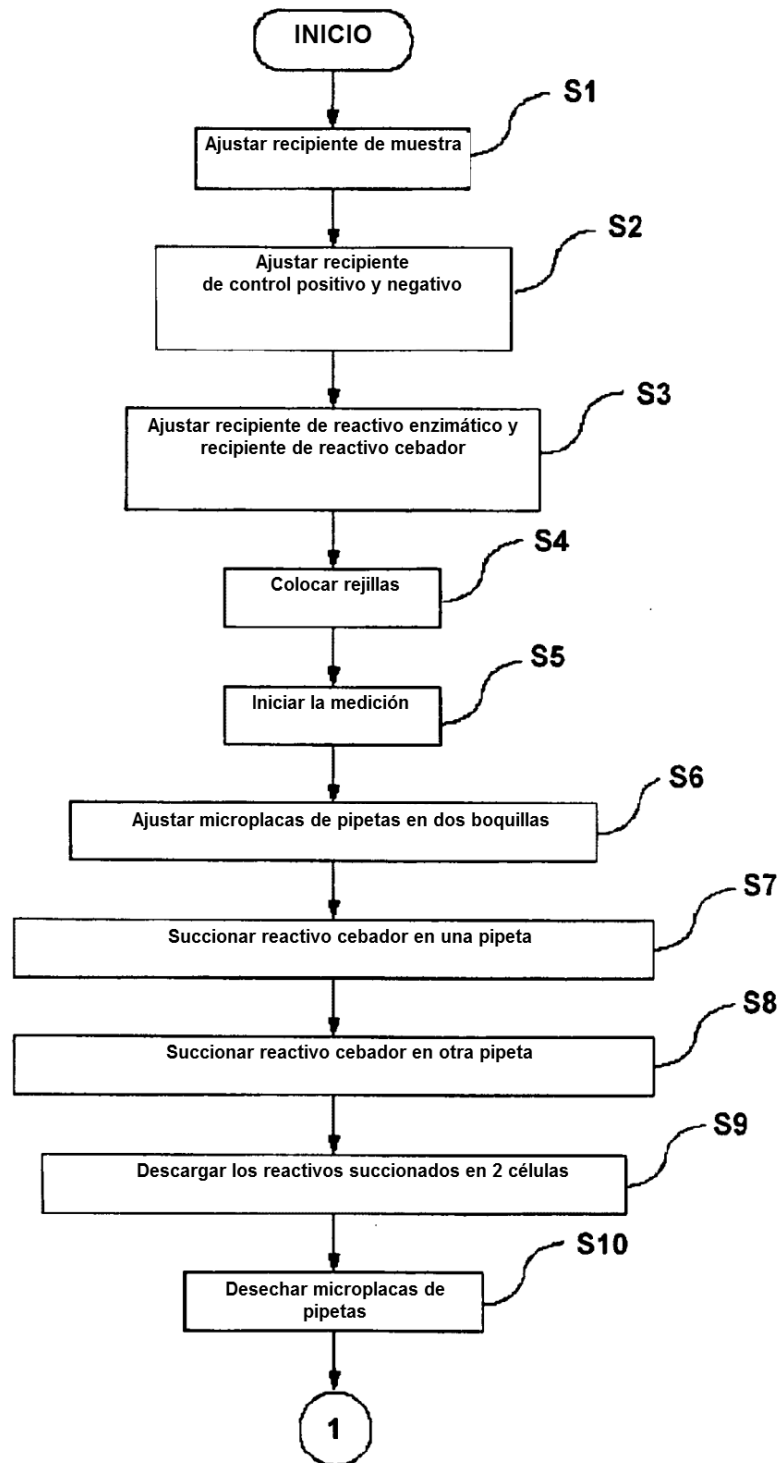


FIG 5

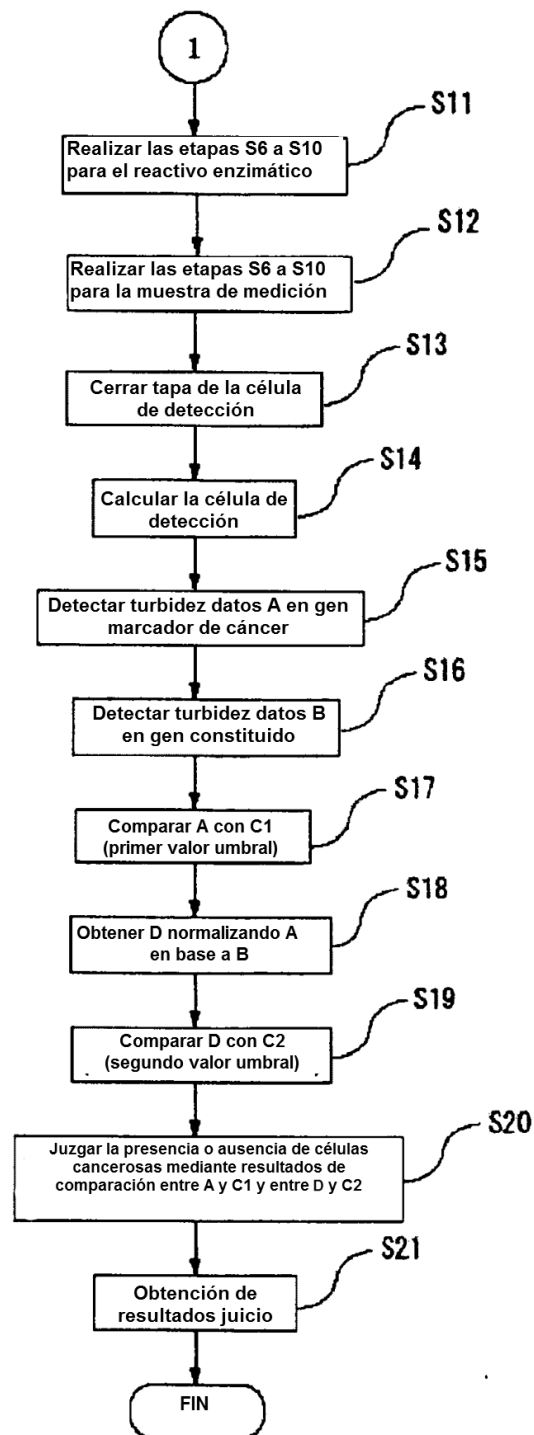


FIG. 6

FIG. 7

Pantalla Navegadora de Datos

Ayuda

Inicio de medición

Reinicio de alarma

Estado ajustado

Lista de trabajos

Monitor tiempo real

**Explo-
rador**

Nave-
gador

Curva patrón

Control de precisión

Página de anulación

Anulación

Página anterior

Página siguiente

Muestra Nº 25 112a Sitio Subdiafragmático izquierdo 112c

Tipo de muestra Lavado intraperitoneal Comentario 112d

Resultado 112b

Fecha 26/09/2005 112e

Tiempo 12:53:06 112f

ARNm de CEA/ARNm de beta-actina

1.E-01

1.E-02

1.E-03

1.E-04

1.E-05

1.E-06

1.E-07

No detectado

ARNm de CEA (copia/ul)

1.0E+01 1.0E+03 1.0E+05 1.0E+07

ARNm de CEA (copia/ul)

ARNm de CEA (copia/ul)	1.5E + 01
ARNm de beta-actina (copia/ul)	5.0E + 05
ARNm de CEA/ARNm de beta-actina	2.9E - 0.5
Juicio de valor absoluto	-
Juicio de valor normalizado	+
Juicio de valor completo	+

FIG. 8

