

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 494**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07012542 .2**
96 Fecha de presentación: **26.06.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1876245**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2008**

54 Título: **Método y aparato para determinar el tamaño de un foco metastásico**

30 Prioridad:
03.07.2006 JP 2006183914

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.09.2012

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

72 Inventor/es:
Motonari, Daito;
Kazuki, Nakabayashi y
Yasuhiro, Otomo

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 387 494 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

Método y aparato para determinar el tamaño de un foco metastásico

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método y un aparato para determinar metástasis cancerosa contenida en un ganglio linfático.

10 Antecedentes

Para determinar en qué medida un cáncer ha metastatizado al tejido de un ganglio linfático, generalmente se realiza un diagnóstico tisular. En un diagnóstico tisular, el tejido de un ganglio linfático se corta finamente para preparar una sección, una célula cancerosa en la sección se tiñe usando un anticuerpo marcado que se une específicamente a una célula cancerosa, y un grado de metástasis cancerosa se mide mediante microscopia de ésta. Sin embargo, dado que es necesaria mucha habilidad para un ensayo, el ensayo depende en gran medida de los conocimientos técnicos del operador del ensayo, y es difícil obtener un resultado de la determinación del objetivo.

Como método para determinar la metástasis de una célula cancerosa a un ganglio linfático, por ejemplo, se conoce el método descrito en el documento JP2006053113. El documento JP2006053113 describe un método para diagnosticar metástasis de adenocarcinoma pulmonar a un ganglio linfático. Específicamente, se preparan una sección de tejido de pulmón de un paciente con metástasis a los ganglios linfáticos y una sección de tejido de pulmón de un paciente sin metástasis a los ganglios linfáticos como muestras, y una molécula útil como marcador de diagnóstico de metástasis se identifica midiendo una cantidad de expresión de diversas moléculas. Además, existe la descripción de que, usando esta molécula, es posible diagnosticar metástasis de un cáncer de pulmón a un ganglio linfático en un paciente con adenocarcinoma pulmonar. Sin embargo, esta técnica no puede determinar en qué medida ha metastatizado un cáncer a un ganglio linfático.

Se conocen métodos y aparatos para la amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo, la amplificación de ARNm de CK19, por ejemplo del documento EP 1 813 682. Dichos métodos y aparatos se describen en el contexto específico de metástasis de un tumor maligno, por ejemplo en el documento EP 1 867 735.

Resumen

El alcance de la presente invención se define exclusivamente mediante las reivindicaciones adjuntas, y no resulta afectado en ninguna medida por las afirmaciones en este resumen.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método que puede determinar objetivamente en qué medida ha metastatizado un cáncer a un ganglio linfático.

La presente invención proporciona un método para determinar un tamaño de un foco metastásico, que comprende una etapa de cuantificar un ARNm de citoqueratina 19 en una muestra de ensayo preparada a partir de un ganglio linfático sospechoso de metástasis de una célula cancerosa, y una etapa de obtener un tamaño de un foco metastásico en el ganglio linfático en base al resultado de cuantificación del ARNm.

Además, la presente invención proporciona un aparato para determinar metástasis cancerosa de acuerdo con el método proporcionado, que comprende una parte de cuantificación para cuantificar ARNm de citoqueratina 19 en una muestra de ensayo preparada a partir de un ganglio linfático sospechoso de metástasis de una célula cancerosa, una parte de comparación para comparar el resultado de cuantificación del ARNm con un primer umbral y un segundo umbral que es más alto que el primer umbral, y una parte de determinación para determinar si la metástasis cancerosa del ganglio linfático es negativa, débilmente positiva o fuertemente positiva, en base al resultado de la comparación.

De acuerdo con la presente invención, puede determinarse en qué medida una célula cancerosa ha metastatizado a un ganglio linfático.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una vista en perspectiva que muestra una construcción completa de un aparato 1 de acuerdo con una realización de la presente invención;

La figura 2 es una vista en perspectiva que muestra una construcción completa de una parte de cuantificación de ácido nucleico 101;

La figura 3 es una vista en planta esquemática de la parte de cuantificación de ácido nucleico 101;

La figura 4 es una vista en diagrama de bloques que muestra una construcción de una parte de control 102d;

La figura 5 es un diagrama de flujo del proceso con la parte de control 102d;

La figura 6 es un ejemplo de una pantalla para mostrar el resultado de la determinación en la parte de

visualización 102c;

La figura 7 es un gráfico que muestra una relación entre un tamaño de un foco metastásico de un cáncer de mama y el resultado de cuantificación de un ARNm de CK19;

La figura 8 es un gráfico que muestra una relación entre un tamaño de un foco metastásico de un cáncer de intestino grueso y el resultado de cuantificación de un ARNm de CK19;

La figura 9 es un gráfico que muestra una relación entre una cantidad de expresión de un ARNm en un ganglio linfático al que una célula cancerosa derivada de carcinoma tubulopapilar ha metastatizado, y el número de células cancerosas contenidas en un foco metastásico;

La figura 10 es un gráfico que muestra una relación entre una cantidad de expresión de un ARNm en un ganglio linfático al que una célula cancerosa derivada de carcinoma tubular sólido ha metastatizado, y el número de células cancerosas contenidas en un foco metastásico;

La figura 11 es un valor supuesto de una cantidad de expresión de un ARNm de CK19 en un ganglio linfático que tiene un foco metastásico de un volumen particular;

La figura 12 es un gráfico que muestra el resultado de cuantificación de un ARNm de CK19 cuando se usa un ganglio linfático tomado de un paciente con cáncer de mama; y

La figura 13 es un gráfico que muestra el resultado de cuantificación de un ARNm de CK19 cuando se usa un ganglio linfático tomado de un paciente con cáncer de intestino grueso.

Descripción detallada de la invención

Una realización de la presente invención es un método para determinar metástasis cancerosa contenida en un ganglio linfático tomado de un organismo vivo. De acuerdo con este método, puede obtenerse un tamaño de un foco metastásico de un cáncer en un ganglio linfático (en lo sucesivo en este documento, también denominado simplemente como foco metastásico).

En este documento, un tamaño de un foco metastásico es un concepto que incluye un eje principal y un área de un foco metastásico preparada durante la preparación de una sección tisular de un ganglio linfático, un volumen de un foco metastásico calculado a partir de este eje principal, una masa de un foco metastásico, y el número de células cancerosas contenidas en un foco metastásico.

El cáncer, tal como se usa en este documento, es un tumor que se ha vuelto maligno, y tiene el mismo significado que el de un tumor maligno. El cáncer incluye carcinoma, sarcoma, y un cáncer derivado de un órgano hematopoyético. Los ejemplos del carcinoma incluyen un cáncer derivado de una célula epitelial tal como un cáncer de mama, un cáncer de estómago, un cáncer de intestino grueso, un cáncer de próstata, un cáncer de cuello del útero y un cáncer de cuerpo uterino. Los ejemplos del sarcoma incluyen osteosarcoma y sarcoma de tejido blando. Los ejemplos del cáncer derivado de un órgano hematopoyético incluyen leucemia y linfoma maligno.

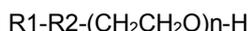
Para obtener un tamaño de un foco metastásico, en primer lugar, se cuantifica un ARNm marcador tumoral (en lo sucesivo en este documento, también denominado simplemente como ARNm) contenido en un ganglio linfático. El ARNm marcador tumoral es un ARNm transcrito a partir de un gen marcador tumoral. El gen marcador tumoral se refiere a un gen tal que una cantidad de expresión en una célula cancerosa y una cantidad de expresión en una célula normal son significativamente diferentes, tal como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos del gen marcador tumoral incluyen genes que codifican CK (citoqueratinas) tales como CK18, CK19 y CK20, CEA (antígeno carcinoembrionario), MUC1, MMG (mamoglobina), PSA (antígeno específico de la próstata), CA15-3, EpCAM (molécula de adhesión a célula epitelial) y similares.

Durante la cuantificación de un ARNm, es preferible que una muestra de ensayo se prepare a partir del ganglio linfático, y un ARNm contenido en esta muestra de ensayo se cuantifique. Por ejemplo, un ganglio linfático y un tampón se mezclan, una célula en el tampón es tratada química y/o físicamente para transferir un ARN en una célula a una solución (solubilización), y una solución que contiene este ARN puede usarse como muestra de ensayo.

Para suprimir la degradación de un ARN, es preferible que el tampón sea fuertemente ácido. Un intervalo de un pH es preferiblemente de 2,5 a 5,0, más preferiblemente de 3,0 a 4,0. Para mantener un pH en este intervalo, pueden usarse tampones conocidos.

Además, es preferible que un tensioactivo esté contenido en el tampón. El tensioactivo daña una membrana celular o una membrana nuclear. Mediante este daño, se vuelve fácil transferir un ácido nucleico en una célula a una solución. Un tipo del tensioactivo no está particularmente limitado, siempre que tenga dicha acción, pero es preferible un tensioactivo no iónico, y es más preferible un tensioactivo no iónico a base de polioxietileno.

En particular, un tensioactivo no iónico a base de polioxietileno representado por la siguiente fórmula general:



(en la que R1 es un grupo alquilo, un grupo alquenoilo, un grupo alquinilo o un grupo isoocilo que tiene de 10 a 22 átomos de carbono, o; R2 es -O- o -(C₆H₆)-O-; n es un número entero de 8 a 120) es adecuado. Los ejemplos del

mismo incluyen éter polioxietilenoaurílico, éter polioxietilencetílico, éter polioxietilenooleílico, éter polioxietilenoiristílico, éter polioxietilenoestearílico, éter polioxietilenoilfenílico y éter polioxietilenoisooctilfenílico. Específicamente, Brij 35 (éter polioxietilenoaurílico (35)) es adecuado. Una concentración del tensioactivo en el tampón es preferiblemente del 0,1 al 6% (v/v), más preferiblemente del 1 al 5% (v/v).

5 Además, cuando se realiza la cuantificación de un ARNm mediante amplificación de ácido nucleico descrita a continuación, es preferible que dimetilsulfóxido (DMSO) esté contenido en el tampón. Una sustancia que inhibe una reacción enzimática en la amplificación de ácido nucleico (sustancia inhibidora) está contenida en un ganglio linfático en algunos casos, y una influencia de esta sustancia inhibidora puede reducirse eficazmente mediante la acción de DMSO. Además, el DMSO también tiene el efecto de reducir la actividad de una enzima de amplificación de ácido nucleico. Una concentración de DMSO en una solución de tratamiento es preferiblemente del 1 al 50% (v/v), más preferiblemente del 5 al 30% (v/v), de la forma más preferible del 10 al 25% (v/v).

15 Durante la preparación de una muestra de ensayo, es preferible que un ganglio linfático se someta a tratamiento físico tal como homogeneización. De este modo, una membrana celular o una membrana nuclear de una célula en un ganglio linfático es fragmentada físicamente, y se vuelve fácil transferir un ácido nucleico en una célula a una solución. La homogeneización puede realizarse de forma manual con un mazo de mortero o similar, o puede realizarse usando un homogeneizador eléctrico disponible en el mercado. Los restos de una célula que flotan en el homogenado resultante pueden precipitar centrifugando el homogenado durante de unos pocos segundos a unos pocos minutos. De este modo, un sobrenadante que contiene un ARN y similares (lisado) puede prepararse como muestra de ensayo.

25 La cuantificación de un ARNm puede realizarse mediante un método conocido usando amplificación de ácido nucleico, un chip de ADN o similar. Cuando se usa el método de amplificación de ácido nucleico, adecuadamente se usan un método de RT-PCR (PCR de transcripción inversa) y un método RT-LAMP (LAMP de transcripción inversa: para el método LAMP, véase el documento US6410278) que comprenden una reacción de transcripción inversa antes de una reacción de amplificación de ácido nucleico. En particular, como método cuantitativo de amplificación de ácido nucleico, pueden usarse métodos conocidos tales como un método de Green y un método TaqMan (marca registrada de Roche Diagnostic) (véase el documento Linda G. et al., 1993, Nucleic Acids Research, vol. 21, págs. 3761-3766 etc.).

35 Como un chip de ADN que puede usarse en la cuantificación de un ARNm, puede usarse un sustrato en el que se inmoviliza un polinucleótido y/o a fragmento del mismo de un ADN que es capaz de hibridar con un ADNc del gen marcador tumoral. La detección de un ARN usando el chip de ADN puede realizarse mediante métodos conocidos usados generalmente. Por ejemplo, la detección puede realizarse de la siguiente manera. En primer lugar, utilizando una secuencia de poli A presente en un extremo 3' de un ARNm en una muestra de ensayo, se realiza una reacción de transcripción inversa. Usando un nucleótido marcado con una sustancia fluorescente tal como Cy3 y Cy5 durante una reacción de transcripción inversa, se sintetiza un ADNc marcado de forma fluorescente. Cuando éste se pone en contacto con el sustrato sobre el cual está inmovilizado el polinucleótido, este polinucleótido y el ADNc marcado forman una cadena doble. Después de la formación de la cadena doble, la fluorescencia del ADNc puede medirse para cuantificar un ARNm.

45 El resultado de cuantificación de un ARNm medido mediante el método anterior puede ser una cantidad de sustancia de un ARNm, una masa de ARNm, o un número de copias por unidad de área. Como alternativa, el resultado puede ser un periodo de tiempo o un número de ciclos (en el caso del uso de PCR) hasta que una intensidad de fluorescencia, una turbidez o una intensidad de luz transmitida de la solución de reacción, llega a valores predeterminados.

50 Habitualmente, un ARNm de un gen que se piensa que se expresa de forma constitutiva en cualquier célula (por ejemplo gen constitutivo etc.: en lo sucesivo en este documento, denominado como gen normalizado) se cuantifica junto con la cuantificación del ARNm marcador tumoral, y un valor cuantificado del ARNm marcador tumoral se divide (normaliza) por un valor cuantificado de un ARNm de un gen normalizado o similar, con lo cual, se convierte en una cantidad de expresión del ARNm marcador tumoral por ARNm del gen normalizado (por ejemplo véase el documento M. Inokuchi et al., British Journal of Cancer (2003) 89, 1750-1756).

55 Sin embargo, cuando no solamente una célula cancerosa sino también una célula de ganglio linfático normal está contenida en un ganglio linfático en una gran cantidad, dado que el resultado de medición está influido por el número de células normales, en algunos casos un tamaño de un foco metastásico no se obtiene correctamente. Por lo tanto, en la presente realización, es preferible que la normalización no se realice al valor cuantificado del ARNm marcador tumoral, y el valor cuantificado (valor absoluto) se usa como está.

65 El resultado de cuantificación de ARNm se correlaciona con un tamaño de un foco metastásico. Por esta razón, un tamaño de un foco metastásico en un ganglio linfático puede obtenerse en base al resultado de cuantificación de ARNm tal como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, un tamaño de un foco metastásico puede obtenerse escalonadamente. Cuando se obtiene un tamaño escalonadamente de un foco metastásico, el resultado de cuantificación de ARNm y una pluralidad de umbrales se comparan. En este caso, es preferible que al menos un

umbral (primer umbral) se establezca de modo que el negativo para cáncer y el positivo para cáncer puedan discriminarse.

5 El umbral se establece apropiadamente dependiendo de un tipo de cáncer o el marcador tumoral. Además, cuando se obtiene un tamaño de un foco metastásico, es preferible que este primer umbral se use para discriminar negativo y positivo, y se obtiene un tamaño de un foco metastásico respecto a positivo para metástasis.

10 El primer umbral puede establecerse a un valor no superior a un valor cuantificado de un ARNm contenido en un ganglio linfático para el cual se ha confirmado la presencia de una célula cancerosa (muestra positiva), y superior que un valor cuantificado de un ARNm contenido en un ganglio linfático para el cual se ha confirmado la ausencia de una célula cancerosa (muestra negativa). Es preferible que valores cuantificados de ARNm de una pluralidad de muestras positivas y valores cuantificados de ARNm de una pluralidad de muestras negativas se midan por adelantado, y un valor mediante el cual una muestra positiva y una muestra negativa pueden discriminarse con la probabilidad más alta se establece como umbral.

15 Cuando se obtiene la información escalonada mencionada anteriormente, un segundo umbral se usa adicionalmente además del primer umbral. Es decir, el segundo umbral mediante el cual puede discriminarse débilmente positiva y fuertemente positiva se usa además del primer umbral. De este modo, cuando el resultado de cuantificación de un ARNm es menor que el primer umbral, puede determinarse que un foco metastásico no está sustancialmente presente (es decir, negativo para metástasis cancerosa). Además, cuando el resultado de cuantificación de un ARNm no es inferior al primer umbral e inferior que el segundo umbral, puede determinarse que un foco metastásico relativamente pequeño está presente (débilmente positivo para metástasis cancerosa). Además, cuando el resultado de cuantificación de un ARNm no es inferior al segundo umbral, puede determinarse que un foco metastásico relativamente grande está presente (fuertemente positivo para metástasis cancerosa).

20 Un foco metastásico en un ganglio linfático puede clasificarse en micrometástasis y macrometástasis en base a un tamaño. La metástasis en la que un foco metastásico se confirma y el foco metastásico tiene un eje principal de menos de 2 mm en una sección tisular preparada a partir del tejido de un ganglio linfático se denomina micrometástasis. La metástasis en la que el foco metastásico tiene un eje principal de no menos de 2 mm se denomina macrometástasis. El segundo umbral puede establecerse en un valor mediante el cual pueden discriminarse micrometástasis y macrometástasis. Como alternativa, pueden establecerse una pluralidad de umbrales, dependiendo de un tamaño de un foco metastásico, en lugar del segundo umbral.

25 Además, la información cuantitativa de un tamaño de un foco metastásico también puede obtenerse de una cantidad de expresión de un ARNm marcador tumoral. Es decir, el número de células cancerosas en un ganglio linfático, un área, un volumen o una masa de un foco metastásico, y similares puede obtenerse cuantitativamente.

30 Otra realización de la presente invención es un aparato para determinar metástasis cancerosa para realizar el método mencionado anteriormente. Cuando se usa este aparato, un tamaño de un foco metastásico en un ganglio linfático también puede obtenerse escalonadamente. Este aparato se explicará a continuación en referencia a los dibujos.

35 La figura 1 es una vista en perspectiva que muestra una construcción completa de un aparato 1 de acuerdo con una realización de la presente invención. Este aparato 1 está construido de una parte de cuantificación de ácido nucleico 101, y un ordenador personal (PC) 102 que está conectado para comunicar con la parte de cuantificación de ácido nucleico 101 mediante un cable. El ordenador personal 102, tal como se muestra en la figura 1, comprende una parte de introducción 102 que incluye un teclado, una parte de visualización 102c que incluye un monitor, y una parte de control 102d para analizar el resultado de la medición.

40 La parte de cuantificación de ácido nucleico 101 del aparato 1 se explicará a continuación usando la figura 2 y la figura 3. La figura 2 es una vista en perspectiva que muestra una construcción completa de la parte de cuantificación de ácido nucleico 101. La figura 3 una vista en planta esquemática de la parte de cuantificación de ácido nucleico 101 de la figura 2.

45 La parte de cuantificación de ácido nucleico 101, tal como se muestra en la figura 2, comprende un mecanismo de dispensado 10, una parte de colocación de la muestra 20, una parte de colocación de la punta 30, una unidad de desechado de la punta 40, una parte de detección de la reacción 50 constituida por cinco bloques de detección de la reacción 50a, y una parte de transferencia 60 para transferir el mecanismo de dispensado 10 en una dirección del eje X y una dirección del eje Y.

50 Además, el mecanismo de dispensado 10, tal como se muestra en la figura 2, comprende una parte de brazo 11 que se mueve en una dirección del eje X y una dirección del eje Y (dirección horizontal) mediante la parte de transferencia 60, y unidades de jeringa duplicadas (dos) 12 que pueden moverse independientemente en una dirección del eje z (dirección vertical) con respecto a la parte de brazo 11.

65

Además, tal como se muestra en la figura 2 y la figura 3, diez pocillos recipientes de muestra 21a a 21j, un pocillo recipiente de reactivo enzimático 21k y un pocillo recipiente de reactivo cebador 211 están provistos en la parte de colocación de la muestra 20 en un orden desde la parte frontal del aparato. Además, diez pocillos recipientes de muestra 21a a 21j están provistos para disponerse en 5 filas y 2 columnas. Además, los pocillos recipientes de muestra 21c y 21d, los pocillos recipientes de muestra 21e y 21f, los pocillos recipientes de muestra 21g y 21h, y los pocillos recipientes de muestra 21i y 21j están provistos en una posición de muestra 1, una posición de muestra 2, una posición de muestra 3 y una posición de muestra 4, respectivamente, desde un lado interno de aparato.

Además, en la presente realización, un recipiente de muestra 22 que aloja a un lisado (muestra de ensayo) preparado sometiendo a un tejido biológico previamente extirpado al tratamiento mencionado anteriormente (homogeneización, filtración) se coloca en los pocillos recipientes de muestra 21c, 21e, 21g y 21i en un lado izquierdo frontal y, al mismo tiempo, un recipiente de muestra 23 que aloja a una muestra diluida obtenida diluyendo 10 veces la muestra mencionada anteriormente se coloca en los pocillos recipientes de muestra 21d, 21f, 21h y 21j en un lado derecho frontal.

Además, un recipiente 24 que aloja a un control positivo (*InCt*) para confirmar que un ácido nucleico a amplificar es amplificado normalmente, está montado en el pocillo recipiente de muestra 21a y, al mismo tiempo, un recipiente 25 que aloja a un control negativo para confirmar que un ácido nucleico no a amplificar no es amplificado, normalmente se coloca en el pocillo recipiente de muestra 21b.

Además, un recipiente de reactivo enzimático 26 que aloja a un reactivo enzimático de amplificación de ácido nucleico para amplificar un ADNc (en lo sucesivo en este documento, también denominado como ADNc de CK19) correspondiente a un ARNm de CK19 (ARNm marcador tumoral: en lo sucesivo en este documento, también denominado como ARNm de CK19), y un recipiente de reactivo cebador 27 que aloja a un reactivo (en lo sucesivo en este documento, denominado como reactivo cebador) que comprende un cebador que puede hibridar con el ADNc de CK19 se colocan en el pocillo recipiente de reactivo enzimático 21h y el pocillo recipiente de reactivo cebador 211, respectivamente.

Además, cada bloque de detección de la reacción 50a de la parte de detección de la reacción 50, tal como se muestra en la figura 2 y la figura 3, está construido por una parte de reacción 51, dos partes de detección de turbidez 52, y un mecanismo de cierre de la tapa 53 (véase la figura 3). Dos pocillos de células de detección 51a para colocar una célula de detección 54 están provistos en una parte de reacción 51 provista en cada bloque de detección de la reacción 50a, tal como se muestra en la figura 3. Respectivos bloques de detección de la reacción 50a se disponen en una posición de la célula 1, una posición de la célula 2, una posición de la célula 3, una posición de la célula 4 y una posición de la célula 5 en un orden desde un lado interno de aparato.

Además, la parte de detección de turbidez 52 está construida por una parte de fuente de luz LED 52a constituida por un LED azul que tiene una longitud de onda de 456 nm fijada a un sustrato 55a dispuesto en una superficie lateral de la parte de reacción 51, y una parte de recepción de luz de fotodiodo 52b fijada a un sustrato 55b dispuesto en la otra superficie lateral de la parte de reacción 51. Dos conjuntos de partes de detección de turbidez 52, estando constituido un conjunto por una parte de fuente de luz LED 52a y una parte de recepción de luz de fotodiodo 52b, se disponen en cada bloque de detección de la reacción 50a.

Además, la célula de detección 54 tiene dos partes de célula 54a para alojar a una muestra, y dos partes de tapa 54b para cerrar las dos partes de la célula 54a.

Además, la parte de transferencia 60, tal como se muestra en la figura 2, comprende una guía de acción directa 61 y un tornillo de bola 62 para transferir el mecanismo de dispensado 10 en una dirección del eje Y, un motor de pasos 63 para impulsar al tornillo de bola 62, una guía de acción directa 64 y un tornillo de bola 65 para transferir el mecanismo de dispensado 10 en una dirección del eje X, y un motor de pasos 66 para impulsar al tornillo de bola 65. La transferencia del mecanismo de dispensado 10 en la dirección del eje X y la dirección del eje Y se realiza haciendo girar al tornillo de bola 62 y al tornillo de bola 65, respectivamente, con los motores de pasos 63 y 66.

A continuación, en referencia a la figura 1 a la figura 3, se explicará el movimiento de la parte de cuantificación de ácido nucleico 101 de acuerdo con la presente realización. En esta realización, tal como se ha descrito anteriormente, un ADNc correspondiente a un ARNm de CK19 (marcador tumoral) en el tejido de un ganglio linfático extirpado mediante una operación se amplifica usando el método de RT-LAMP, y se mide un cambio de una turbidez debido al enturbiamiento de pirofosfato de magnesio generado acompañado por amplificación. En base a un periodo hasta que la turbidez alcanza un valor predeterminado (tiempo de inicio de la amplificación), una cantidad del ARNm de CK19 (número de copias / μ l • lisado) se mide, y esta cantidad se compara con un umbral.

En primer lugar, tal como se muestra en la figura 2 y la figura 3, el recipiente de muestra 22 que aloja a una muestra de ensayo preparada sometiendo a un tejido extirpado a tratamiento (homogeneización, filtración) de antemano se coloca en los pocillos recipientes de muestra 21c a 21j. Además, el recipiente 24 que aloja a un control positivo y el recipiente 25 que aloja a un control negativo se colocan en los pocillos recipientes de muestra 21a y 21b, respectivamente (véase la figura 3). Además, el recipiente de reactivo enzimático 26 que aloja a un reactivo

enzimático de amplificación de ácido nucleico para amplificar el ADNc de CK19, y el recipiente de reactivo cebador 27 que aloja a un reactivo cebador para amplificar el ADNc de CK19 se colocan en el pocillo recipiente de reactivo enzimático 21k (véase la figura 3) y el pocillo recipiente de reactivo cebador 211, respectivamente. Además, dos rejillas 32 que alojan treinta y seis puntas de pipeta desechables 31 están montadas en una parte de colocación de la punta 30.

Cuando el movimiento de la parte de cuantificación de ácido nucleico 101 se inicia, en primer lugar, después de que la parte de brazo 11 del mecanismo de dispensado 10 es transferida de de una posición inicial a la parte de colocación de la punta 30 por la parte de transferencia 60 mostrada en la figura 2, las dos unidades de jeringa 12 del mecanismo de dispensado 10 se mueven hacia abajo en la parte de colocación de la punta 30. De este modo, dado que las puntas de partes de boquilla de las dos unidades de jeringa 12 son presionadas en aberturas superiores de las dos puntas de pipeta 31, las puntas de pipeta 31 se montan automáticamente en las puntas de las partes de boquilla de las dos unidades de jeringa 12. A continuación, después de que las dos unidades de jeringa 12 se mueven hacia arriba, la parte de brazo 11 del mecanismo de dispensado 10 se mueve en una dirección del eje X hacia arriba del recipiente de reactivo cebador 27 que aloja a un reactivo cebador. A continuación, después de que una unidad de jeringa 12 situada por encima del recipiente de reactivo cebador 27 se mueve hacia abajo, y el reactivo cebador es aspirado, la una unidad de jeringa 12 se mueve hacia arriba. Seguidamente, la parte de brazo 11 del mecanismo de dispensado 10 se mueve en una dirección del eje Y mediante la parte de transferencia 60, de modo que la otra unidad de jeringa 12 está situada por encima del mismo recipiente de reactivo cebador 27. A continuación, después de que la otra unidad de jeringa 12 se mueva hacia abajo, y un reactivo cebador es aspirado desde el mismo recipiente de reactivo cebador 27, la otra unidad de jeringa 12 se mueve hacia arriba. De esta manera, el reactivo cebador en el recipiente de reactivo cebador 27 es aspirado por las dos puntas de pipeta 31 montadas en las unidades de jeringa 12.

Después de la aspiración del reactivo cebador y después de que las dos unidades de jeringa 12 se muevan hacia arriba, la parte de brazo 11 del mecanismo de dispensado 10 es movida por la parte de transferencia 60 hacia encima del bloque de detección de la reacción 50a situado en la posición de célula 1 que está en un lado más interno (lado interno en la parte frontal del aparato). Además, en el bloque de detección de la reacción 50a que está en un lado más interno, las dos puntas de pipeta 31 montadas en las dos unidades de jeringa 12 se insertan en las dos partes de célula 54a de la célula de detección 54, respectivamente, moviendo las dos unidades de jeringa 12 hacia abajo. Además, los reactivos cebadores se descargan en las dos partes de célula 54a usando las unidades de jeringa 12.

Después de la descarga del reactivo cebador y después de que las dos unidades de jeringa 12 se hayan movido hacia arriba, la parte de brazo 11 del mecanismo de dispensado 10 es movida por la parte de transferencia 60 en una dirección del eje X hacia encima de la unidad de desechado de la punta 40. A continuación, en la unidad de desechado de la punta 40, la punta de pipeta 31 se desecha. Específicamente, moviendo las dos unidades de jeringa 12 hacia abajo, la punta de pipeta 31 se inserta en los dos pocillos de desechado de la punta 40a (véase la figura 3) de la unidad de desechado de la punta 40. En este estado, moviendo la parte de brazo 11 del mecanismo de dispensado 10 en una dirección del eje Y con la parte de transferencia 60, la punta de pipeta 31 se mueve hacia abajo por debajo de una parte de surco 40b. Además, moviendo las dos unidades de jeringa 12 hacia arriba, dado que una parte de collar en un lado superior de la punta de pipeta 31 topa contra caras inferiores en ambos lados de la parte de surco 40b, y es sometida a una fuerza hacia abajo desde las caras inferiores, la punta de pipeta 31 es desprendida automáticamente de las partes de boquilla de las dos unidades de jeringa 12. De este modo, la punta de pipeta 31 es desechada en la unidad de desechado de la punta 40.

A continuación, mediante un movimiento similar, el reactivo enzimático es descargado desde el recipiente de reactivo enzimático 26 a la parte de célula 54a y, además mediante un movimiento similar, una muestra se descarga desde el recipiente de muestra 22 y el recipiente de muestra 23 en la parte de célula 54a.

A continuación, después de la descarga del reactivo cebador, el reactivo enzimático y la muestra en la parte de célula 54a, se realiza el movimiento de cierre de la tapa de la parte de tapa 54b de la célula de detección 54. Después de que este movimiento de cierre de la tapa se ha completado, una temperatura del líquido en la célula de detección 54 se eleva desde aproximadamente 20°C a aproximadamente 65°C, con lo cual, un ADNc correspondiente al ARNm de CK19 es amplificado mediante la reacción RT-LAMP. A continuación, el enturbiamiento debido a pirofosfato de magnesio generado acompañado por la amplificación es detectado mediante nefelometría. Específicamente, usando la parte de fuente de luz LED 52a y la parte de recepción de luz de fotodiodo 52b mostrada en la figura 3, se detecta (monitoriza) una turbidez en la célula de detección 54 en el momento de una reacción amplificación, de este modo, se detecta una turbidez.

Los datos de turbidez de la muestra son enviados desde la parte de cuantificación de ácido nucleico 101 a la parte de control 102d del ordenador personal 102 en tiempo real.

La figura 4 es una vista en diagrama de bloques que muestra una construcción de la parte de control 102d. Esta parte de control 102d está construida principalmente por una CPU 6a, una ROM 6b, una RAM 6c, un disco duro 6d, una interfaz de introducción y de emisión 6e, una interfaz de emisión de imágenes 6f, y una interfaz de comunicación

6g, y la CPU 6a, la ROM 6b, la RAM 6c, el disco duro 6d, la interfaz de introducción y de emisión 6e, la interfaz de emisión de imágenes 6f, y la interfaz de comunicación 6g están conectadas de forma que puedan comunicar datos con un bus 6h.

- 5 La CPU 6a puede ejecutar un programa informático en la ROM 6b y el disco duro 6d, y una lectura de programa informático en la RAM 6c.

La ROM 6b memoriza un programa informático que es ejecutado por la CPU 6a, datos usados para ejecutar el programa informático, y similares.

- 10 La RAM 6c se usa como área de trabajo cuando un programa informático memorizado en la ROM 6b y el disco duro 6d es leído, o cuando un programa informático es ejecutado.

- 15 El disco duro 6d memoriza un programa informático a ser ejecutado por la CPU 6a, y datos a usar para ejecutar el programa informático. Este programa informático cumple una función de análisis de la información sobre turbidez enviada desde la parte de cuantificación de ácido nucleico 101 y emitir el resultado del análisis.

- 20 La parte de introducción 102a que incluye un teclado está conectada a la interfaz de introducción y de emisión 6e. La parte de introducción 102a está provista para una operación en una pantalla de emisión, y similares. La interfaz de emisión de imágenes 6f está conectada a la parte de visualización 102c. La parte de visualización 102c está provista para visualizar una turbidez enviada desde la parte de cuantificación de ácido nucleico 101 en tiempo real, y emitir el resultado del análisis. La interfaz de comunicación 6g está conectada a la parte de cuantificación de ácido nucleico 101, y cumple una función de recibir información sobre la turbidez.

- 25 A continuación, en referencia a la figura 5, se explicará un flujo del proceso que usa la parte de control 102d. La parte de control 102d recibe datos de turbidez desde la parte de cuantificación de ácido nucleico 101 en tiempo real (etapa S1). Un número de copias (copias/ μ l • lisado) de un ARNm se calcula a partir de un momento en el cual una turbidez de una solución de reacción alcanza un valor predeterminado (etapa S2), y este número se compara con un umbral predeterminado (primer umbral y segundo umbral), con lo cual, un tamaño de un foco metastásico se determina (etapa S3). Específicamente, cuando el número de copias de ARNm es menor de 250 copias/ μ l • lisado (primer umbral), se determina que la metástasis cancerosa es negativa, es decir, un foco metastásico no está sustancialmente presente. Cuando el número de copias de ARNm no es inferior a 250 copias/ μ l • lisado (primer umbral) e inferior a 5000 copias/ μ l • lisado (segundo umbral), se determina que la metástasis cancerosa es débilmente positiva (+), es decir, micrometástasis está presente. Cuando el número de copias de ARNm es superior a 10000 copias/ μ l • lisado (segundo umbral), se determina que la metástasis cancerosa es fuertemente positiva (++), es decir, macrometástasis está presente. A continuación, la parte de control 102d envía estos resultados de determinación a la parte de visualización 102c del ordenador personal 102 (etapa S4) para hacer que la parte de visualización 102c muestre los resultados de la determinación.

- 40 La expresión "copias/ μ l • lisado" indica el número de copias de ARNm en 1 μ l de un lisado obtenido disolviendo el tejido de un ganglio linfático que tiene un diámetro de aproximadamente 6 mm en 4 ml de un tampón (pH 3,4: que comprende glicina HCl 200 mM, Brij 35 (éter polioxietileno laurílico (35), fabricado por Sigma) al 5% y DMSO al 20% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)), y además diluyendo 10 veces el producto disuelto.

- 45 En la realización anterior, el primer umbral se establece preferiblemente entre 50 y 3000 copias/ μ l • lisado, más preferiblemente entre 100 y 1000 copias/ μ l • lisado, más preferiblemente entre 200 y 300 copias/ μ l • lisado. Además, el segundo umbral se establece preferiblemente entre 2000 y 20000 copias/ μ l • lisado, más preferiblemente entre 4000 y 10000 copias/ μ l • lisado.

- 50 A continuación, se explicará en referencia a la figura 6, un ejemplo de una pantalla para mostrar el resultado de la determinación en la parte de visualización 102c. Un tiempo de inicio de la amplificación para el ARNm de CK19 se muestra en una columna 200, y un tiempo de inicio de la amplificación para un control positivo se muestra en una columna 205. Una cantidad de expresión de ARNm de CK19 (copias/ μ l) calculada por la CPU 6a en base a ello se muestra en una columna 201. La información respecto a un tamaño de un foco metastásico obtenida comparando esta cantidad de expresión con un primer umbral y un segundo umbral se muestra en una columna 202. En la figura 6, se muestra ++, es decir, el hecho de cáncer fuertemente positivo. Además, una curva en tiempo real de una turbidez de una solución de reacción en la que el ARNm de CK19 se amplificó se muestra en una columna 203, y una curva en tiempo real de una turbidez de una solución de reacción en la que el control positivo se amplificó se muestra en una columna 205.

- 60 En el aparato de la realización anterior, en base al resultado de comparación con umbrales, un tamaño de un foco metastásico en un ganglio linfático se determinó escalonadamente. Sin embargo, tal como se ha descrito anteriormente, un área de un foco metastásico, y el número de células contenidas en un foco metastásico pueden obtenerse cuantitativamente a partir del resultado del cálculo del número de copias de ARNm.

65

Ejemplos

(Ejemplo 1)

5 (1) Inmunohistoquímica

Usando 11 tejidos de ganglio linfático extirpados de pacientes con cáncer de mama, y 7 ganglios linfáticos extirpados de pacientes con cáncer de intestino grueso, un área de un foco metastásico (tamaño de foco metastásico) se midió mediante inmunohistoquímica.

10 En un lugar cerca de un centro de cada uno de estos ganglios linfáticos (aproximadamente de 50 a 600 mg/ganglio), una sección que tenía un grosor de aproximadamente 10 µm (en lo sucesivo en este documento, también denominada como sección) se extirpó, y se colocó en un portaobjetos de vidrio. Para esta sección, una célula cancerosa se tiñó usando un anticuerpo anti-CK19 y un Kit Envision (ambos de DAKO). Usando un Densitómetro Calibrado GS-710 (Bio-rad), se midió un tamaño del foco metastásico de una célula cancerosa de esta sección. Los resultados de la medición (mm²) se muestran en la siguiente Tabla 1.

(2) Cuantificación de ARNm de CK19

20 Una sección (grosor de aproximadamente 10 µm) adyacente a la sección extirpada anteriormente se extirpó, y se extrajo el ARN usando un kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) para preparar una muestra de ARN. Usando esta muestra de ARN, se preparó una solución de reacción que tenía la siguiente composición, y un número de copias del ARNm de CK19 se calculó mediante un método TaqMan. La medición mediante el método TaqMan se realizó de acuerdo con unas instrucciones de uso adjuntas usando una mezcla maestra de RT-PCR *TaqMan One-step RT-PCR Master Mix* y un sistema de PCR en tiempo real *Prism 7700 Realtime PCR system* (ambos de Applied Biosystems).

25 Composición de la solución de reacción (50 µl)

Agua purificada 20,10 µl

Muestra de ARN 2 µl

TaqMan 2 × mezcla *Universal PCR Master Mix* 25 µl

30 40 x MultiScribe y mezcla *RNase Inhibitor Mix* 1,25 µl

Cebador directo 100 µM 0,15 µl

Cebador inverso 100 µM 0,15 µl

7.4 pmol/ µl (concentración final 200 nm) sonda TaqMan 1,35 µl

35 Además, una secuencia del cebador y una secuencia de la sonda TaqMan para detectar el ARNm de CK19 son las siguientes.

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

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

40 Sonda TaqMan: 5'-GCCTACCTGAAGAAGAACCATGAGGAGGAA-3' (SEC ID N°: 3)

Además, esta sonda TaqMan tiene 6-carboxifluoresceína (FAM) en un extremo 5', y 6-carboxi-tetrametil-rodamina (TAMRA) en un extremo 3'.

45 Los valores de cuantificación (copias/sección) de un ARNm se muestran en la siguiente Tabla 1. Además, una relación entre un tamaño del foco metastásico de un cáncer de mama y el resultado de cuantificación de ARNm de CK19 se muestra en la figura 7, y una relación entre un tamaño del foco metastásico de un cáncer de intestino grueso y el resultado de cuantificación del ARNm de CK19 se muestra en la figura 8.

50

Tabla 1

	Tamaño del foco metastásico (mm ²)	ARNm de CK19 (copias/sección)
Cáncer de mama	0,67	3,00E + 06
	0,029	1,07E + 04
	2,82	9,69E + 06
	8,4	2,03E + 07
	9,36	1,23E + 07
	6,14	7,20E + 06
	2,51	1,70E + 07
	0,079	7,20E + 04
	0,15	5,08E + 05
	15,68	4,70E + 07
	3,91	6,40E + 06

	Tamaño del foco metastásico (mm ²)	ARNm de CK19 (copias/sección)
Cáncer de intestino grueso	4,45	8,00E + 06
	9,39	2,00E + 07
	8,18	2,90E + 07
	6,29	3,40E + 07
	5,33	9,70E + 06
	1,47	1,10E + 05
	3,04	2,10E + 06

5 A partir de la Tabla 1, y las figuras 7 y 8, en un cáncer de intestino grueso o un cáncer de mama, se reconoció una relación por correlación entre el resultado de cuantificación del ARNm de CK19 y un tamaño (mm²) de un foco metastásico. Por lo tanto, se confirma que un tamaño (mm²) de un foco metastásico puede predecirse cuantificando el ARNm de CK19.

(Ejemplo 2)

10 Treinta y cinco secciones que tenían un grosor de aproximadamente 10 µm se extirparon de un ganglio linfático al que había metastatizado una célula cancerosa derivada de carcinoma tubulopapilar a un intervalo constante. Las treinta y cinco secciones se sometieron a inmunohistoquímica como en el Ejemplo 1(1), y el número de células cancerosas (número/sección) se contó.

15 Dado que la sección usada en inmunohistoquímica no puede usarse en la cuantificación un ARNm, una cantidad de expresión de un ARNm (copias/sección) de una sección (grosor de aproximadamente 10 µm) adyacente a esta sección se midió como en el Ejemplo 1, y este resultado de cuantificación se hizo corresponder al número de células cancerosas con inmunohistoquímica. Una relación entre la cantidad de expresión del ARNm y el número de células cancerosas se muestra en la figura 9.

20 Treinta secciones que tenían un grosor de aproximadamente 10 µm se extirparon de un ganglio linfático al que había metastatizado una célula cancerosa derivada de carcinoma tubular sólido, a un intervalo constante. Las treinta secciones se sometieron a inmunohistoquímica como en el Ejemplo 1(1), y el número (número/sección) de células cancerosas se contó. A continuación, usando una sección adyacente a cada sección, una cantidad de expresión (copias/sección) de un ARNm se midió como en el Ejemplo 1(2).

25 De la misma manera que la del Ejemplo 2, una relación entre la cantidad de expresión de ARNm y el número de células cancerosas se muestra en la figura 10, dejando que la cantidad de expresión de ARNm en una sección predeterminada que se sometió a recuento de células cancerosas fuera la cantidad de expresión de ARNm de una sección adyacente.

30 Tal como se muestra en las figuras 9 y 10, se mostró una buena relación de correlación entre la cantidad de expresión del ARNm de CK19 y el número de células cancerosas. Por lo tanto, se confirmó que el número de células cancerosas en un foco metastásico puede predecirse cuantificando el ARNm de CK19.

35 (Ejemplo 3)

40 Usando once ganglios linfáticos para los que no se reconoció metástasis cancerosa (muestra negativa) y de la misma manera que la del Ejemplo 1(2), se preparó una muestra de ensayo, y se midió una cantidad de expresión del ARNm de CK19 (valor de fondo) en cada muestra.

45 Además, en base a datos sobre un cáncer de mama mostrados en la Tabla 1, se calcularon una cantidad de expresión de un ARNm de CK19 cuando se postuló que un foco metastásico en cada sección era un cubo que tenía 1 mm en cada lado (volumen 1 mm³), y una cantidad de expresión de un ARNm de CK19 cuando se postuló que el foco metastásico era un cubo que tenía 2 mm en un lado (volumen 8 mm³).

50 Además, una cantidad de expresión de un ARNm de CK19 de una muestra negativa que es un valor de fondo se añadió a cada una de una cantidad de expresión de un ARNm de CK19 cuando un foco metastásico era de 1 mm³, y una cantidad de expresión de un ARNm de CK19 cuando el foco metastásico era de 8 mm³. Es decir, estos valores son una cantidad de expresión de un ARNm de CK19 (fondo) de un ganglio linfático que no tenía foco metastásico, un valor supuesto de una cantidad de expresión de un ARNm de CK19 de un ganglio linfático que tenía un foco metastásico de 1 mm³, y un valor supuesto de una cantidad de expresión de un ARNm de CK19 de un ganglio linfático que tenía un foco metastásico de 8 mm³. Estos valores se muestran en la figura 11.

55 A partir de la figura 11, las muestras podrían clasificarse en negativas y positivas estableciendo el primer umbral en 1,0E + 07 copias. Es decir, cuando una cantidad de expresión de un ARNm de CK19 medida a partir de un ganglio linfático es menor que el primer umbral, puede predecirse que una célula cancerosa no ha metastatizado a este ganglio linfático y, cuando la cantidad de expresión es el primer umbral o superior, puede predecirse que una célula

cancerosa ha metastatizado a este ganglio linfático.

En el presente Ejemplo, el primer umbral puede establecerse para ser no inferior a $3,0E + 06$ copias que es un valor más alto de un fondo.

5 Además, cuando un eje principal de un foco metastásico es de 2 mm en un diagnóstico tisular, éste se denomina macrometástasis y, cuando el diámetro es menor de 2 mm, éste se llama micrometástasis. Por lo tanto, dado que un valor más inferior de una cantidad de expresión de un ARNm de CK19 cuando se postula que es un cubo con un lado de 2 mm es de aproximadamente $2,0E + 8,0$ copias a partir de la figura 11, al establecer esto como el segundo umbral, puede predecirse si el foco metastásico es micrometástasis o macrometástasis.

(Ejemplo 4)

15 A sesenta y cuatro ganglios linfáticos (muestra negativa 42, muestra positiva 22) tomados de pacientes con cáncer de mama, y sesenta y nueve ganglios linfáticos (muestra negativa 33, muestra positiva 36) tomados de pacientes con cáncer de intestino grueso (diámetro: aproximadamente 6 mm/ganglio linfático) se añadieron 4 ml de un tampón de pH 3,4 (que contenía glicina-HCl 200 mM, Brij 35 (éter polioxietilénlaurílico (35), Sigma) al 5% y DMSO al 20% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)), respectivamente, y esto se homogeneizó con un mezclador. El homogenado se centrifugó a 10000 xg durante 1 minuto, y se tomó un sobrenadante. Este sobrenadante se diluyó 10 veces con el tampón, y se tomaron 2 µl de una muestra de ensayo (lisado).

20 Esta muestra de ensayo y un reactivo de amplificación de ácido nucleico "reactivo de citoqueratina" (fabricado por Sysmex) se colocaron en un aparato de amplificación de ácido nucleico "GD-100" (fabricado por Sysmex), y un ARNm de CK19 (copias/µl • lisado) en la muestra de ensayo se cuantificó.

25 El resultado de cuantificación de ARNm de CK19 cuando un ganglio linfático tomado de un paciente con cáncer de mama se usó se muestra en la figura 12, y el resultado de cuantificación de ARNm de CK19 cuando se usó un ganglio linfático tomado de un paciente con cáncer de intestino grueso se muestra en la figura 13.

30 Dado que la muestra de ensayo usada en el presente Ejemplo se diluyó 40000 veces en comparación con la muestra de ensayo usada en el Ejemplo 3, el primer umbral se estableció en 250 copias/µl • lisado, y el segundo umbral se estableció en 5000 copias/µl • lisado en las figuras 12 y 13.

35 A partir de la figura 12, comparando una cantidad de expresión de un ARNm de CK19 (copias/µl • lisado) y el primer umbral, podía determinarse que todas las muestras negativas son negativas, y podía determinarse que todas las muestras positivas son positivas. Es decir, se confirmó que podía determinarse si la metástasis de un cáncer de mama a un ganglio linfático es negativa o positiva con una probabilidad del 100%. En el presente Ejemplo, al establecer el primer umbral entre 200 y 1000 copias/ µl • lisado, puede obtenerse el resultado similar al descrito anteriormente.

40 Además, se predice que una muestra en la que una cantidad de expresión de un ARNm de CK19 (copias/µl • lisado) no era inferior al segundo umbral en la figura 12 contiene macrometástasis de un cáncer de mama, y se predice que una muestra en la que la cantidad de expresión no era inferior al primer umbral e inferior al segundo umbral contiene micrometástasis de un cáncer de mama.

45 A partir de la figura 13, comparando una cantidad de expresión de un ARNm de CK19 (copias/µl • lisado) y el primer umbral (250 copias/µl • lisado), podía determinarse que todas las muestras negativas eran negativas, y podía determinarse que 35 de 36 muestras positivas eran positivas. Es decir, se confirmó que podía determinarse si la metástasis de un cáncer de intestino grueso a un ganglio linfático es negativa o positiva con una probabilidad de aproximadamente el 99%. En el presente Ejemplo, al establecer el primer umbral entre 100 y 300 copias/µl • lisado, podía obtenerse el resultado similar al descrito anteriormente.

50 Además, se predice que una muestra en la que una cantidad de expresión de un ARNm de CK19 (copias/µl • lisado) no era inferior al segundo umbral en la figura 13 contiene macrometástasis de un intestino grueso, y se predice que una muestra en la que la cantidad de expresión no era inferior al primer umbral e inferior al segundo umbral contiene micrometástasis de un intestino grueso.

60 A partir del resultado del presente Ejemplo, se descubrió que un foco metastásico en un ganglio linfático podía medirse usando el mismo umbral (primer umbral y segundo umbral) en un cáncer de mama y un cáncer de intestino grueso.

Los anteriores descripción detallada y ejemplos se han proporcionado a modo de explicación e ilustración, y no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

65

LISTA DE SECUENCIAS

<110> SYSMEX Corporation
 <120> Un método y aparato para medir una lesión carcinomatosa
 5 <130> 06-060
 <160> 3
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador diseñado para ARNm de CK19
 <400> 1
 15 cagatcgaag gcctgaagga 20
 <210> 2
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Cebador diseñado para ARNm de CK19
 <400> 2
 ctggcccct cagcgtact 19
 <210> 3
 25 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda diseñada para ARNm de CK19
 30 <400> 3
 gcctactga agaagaacca tgaggaggaa 30

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un tamaño de un foco metastásico, que comprende las etapas de:
 5 cuantificar ARNm de citoqueratina 19 en una muestra de ensayo preparada a partir de un ganglio linfático, y
 obtener un tamaño de un foco metastásico en el ganglio linfático en base al resultado de cuantificación del ARNm.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el resultado de cuantificación del ARNm es una cantidad absoluta del ARNm en la muestra de ensayo.
- 10 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una etapa de comparar el resultado de cuantificación del ARNm con un umbral, y la etapa de obtener un tamaño de un foco metastásico se realiza cuando el resultado de cuantificación del ARNm es el umbral o superior.
- 15 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el umbral se establece a de 50 a 3000 copias/ μ l • lisado.
5. Un método para determinar metástasis cancerosa, que comprende las etapas de:
 20 cuantificar ARNm de citoqueratina 19 en una muestra de ensayo preparada a partir de un ganglio linfático,
 comparar el resultado de cuantificación del ARNm con un umbral,
 determinar si la metástasis cancerosa del ganglio linfático es negativa o positiva, en base al resultado de la comparación, y
 emitir información que indica que la metástasis cancerosa del ganglio linfático es negativa o positiva, en base al resultado de la determinación,
 25 en el que la etapa de emisión se realiza para emitir, además, un tamaño de un foco metastásico, cuando el resultado de la determinación es positivo.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la etapa de comparación se realiza para comparar el resultado de cuantificación del ARNm con el umbral y un segundo umbral que es superior al umbral, y
 30 la etapa de determinación se realiza para determinar si la metástasis cancerosa del ganglio linfático es negativa, débilmente positiva o fuertemente positiva, en base al resultado de comparación con el umbral y el segundo umbral.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende, además, una etapa de emitir información que indica si la metástasis cancerosa del ganglio linfático es negativa, débilmente positiva, o fuertemente positiva, en base al resultado de la determinación.
 35
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la etapa de emisión se realiza para emitir, además, información que indica que un foco metastásico es micrometástasis, cuando el resultado de la determinación es débilmente positivo.
 40
9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la etapa de emisión se realiza para emitir, además, información que indica que un foco metastásico es macrometástasis, cuando el resultado de la determinación es fuertemente positivo.
- 45 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el segundo umbral se establece a de 2000 a 20000 copias/ μ l • lisado.
11. Un aparato para determinar el tamaño de un foco metastásico, que comprende:
 50 una parte de cuantificación para cuantificar ARNm de citoqueratina 19 en una muestra de ensayo preparada a partir de un ganglio linfático,
 una parte de comparación para comparar el resultado de cuantificación del ARNm con un umbral y un segundo umbral que es superior al umbral,
 una parte de determinación para determinar si la metástasis cancerosa del ganglio linfático es negativa, débilmente positiva o fuertemente positiva, en base al resultado de comparación con el umbral y el segundo umbral, determinando de este modo el tamaño de un foco metastásico, y
 55 una parte de visualización para emitir información que indica si la metástasis cancerosa del ganglio linfático es negativa o positiva, en base al resultado de la determinación,
 en el que la parte de visualización es, además, para emitir el tamaño del foco metastásico, cuando el resultado de la determinación es positivo, y en el que el aparato está adaptado adecuadamente para realizar un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
 60
12. El aparato de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende, además, una parte de visualización para emitir información que indica si la metástasis cancerosa del ganglio linfático es negativa, débilmente positiva o fuertemente positiva, en base al resultado de la determinación.
 65

13. El aparato de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la parte de visualización es, además, para emitir información que indica que un foco metastásico es micrometástasis, cuando el resultado de la determinación es débilmente positivo.
- 5 14. El aparato de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la parte de visualización es, además, para emitir información que indica que un foco metastásico es macrometástasis, cuando el resultado de la determinación es fuertemente positivo.

FIG. 1

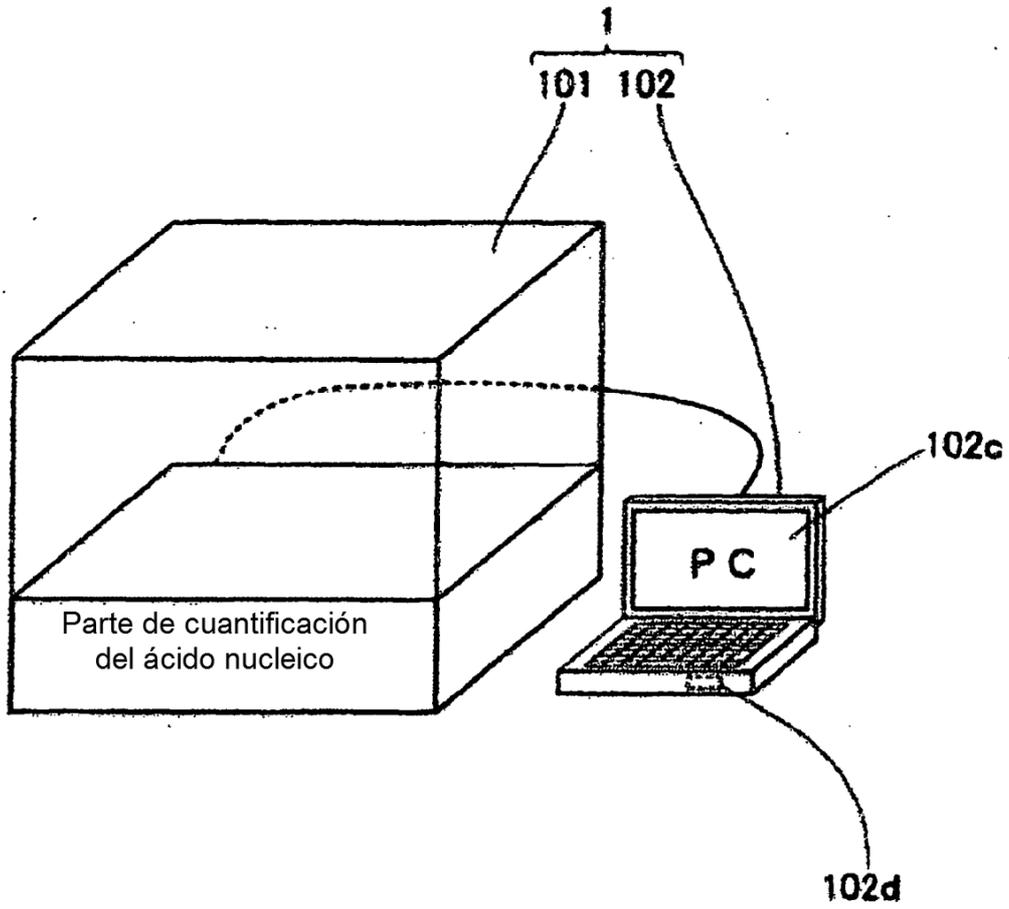


FIG. 2

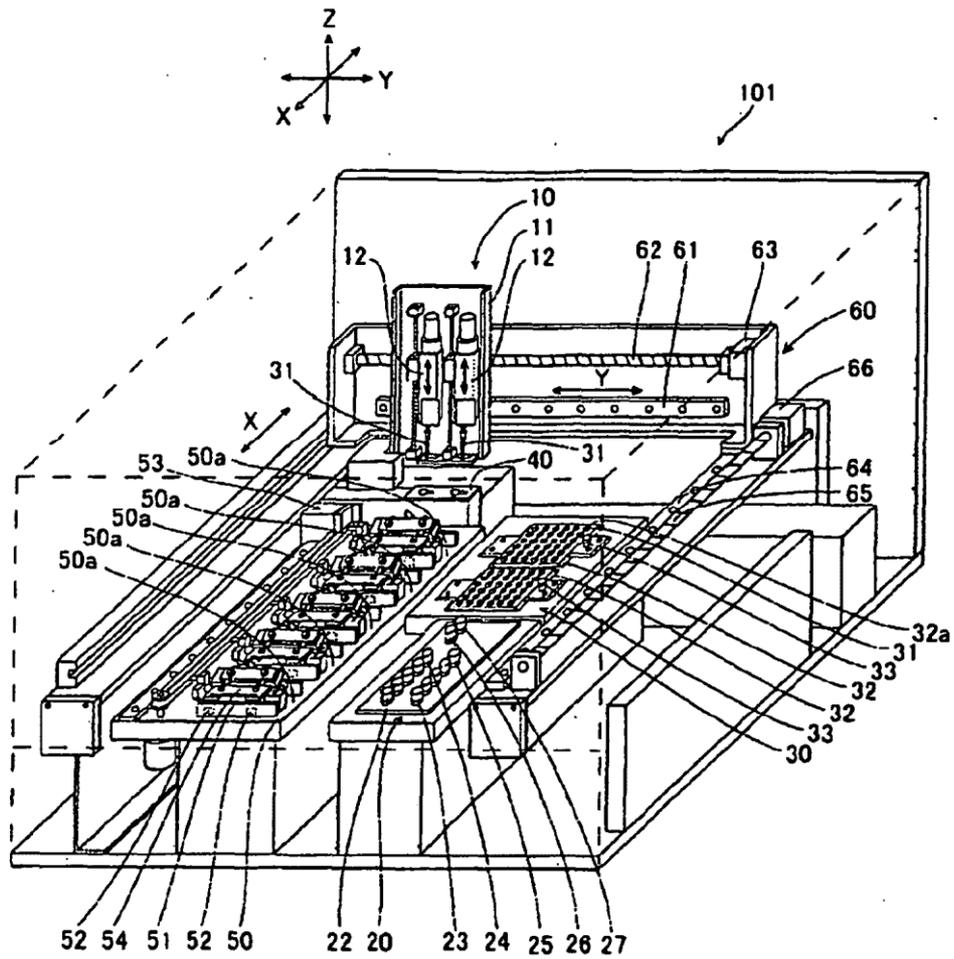


FIG. 3

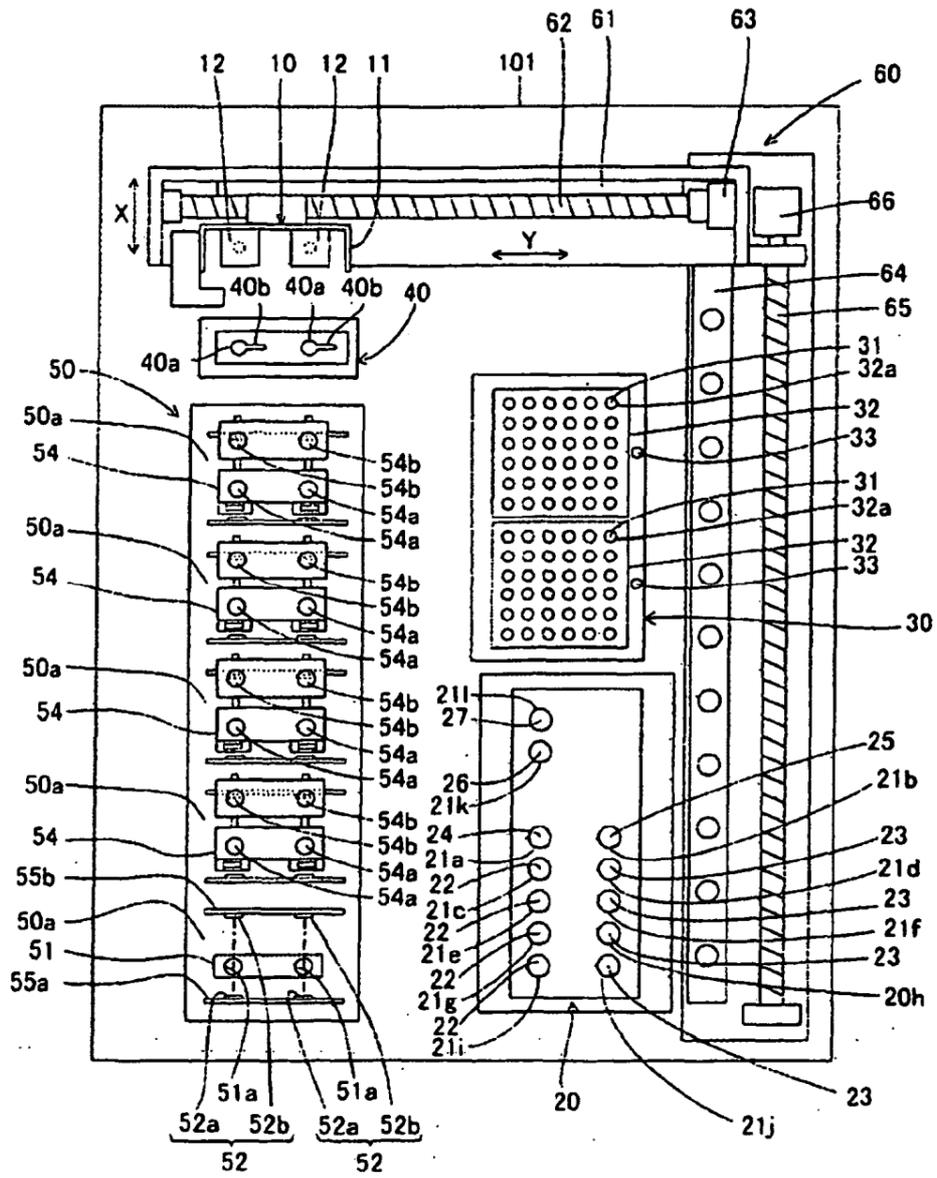


FIG. 4

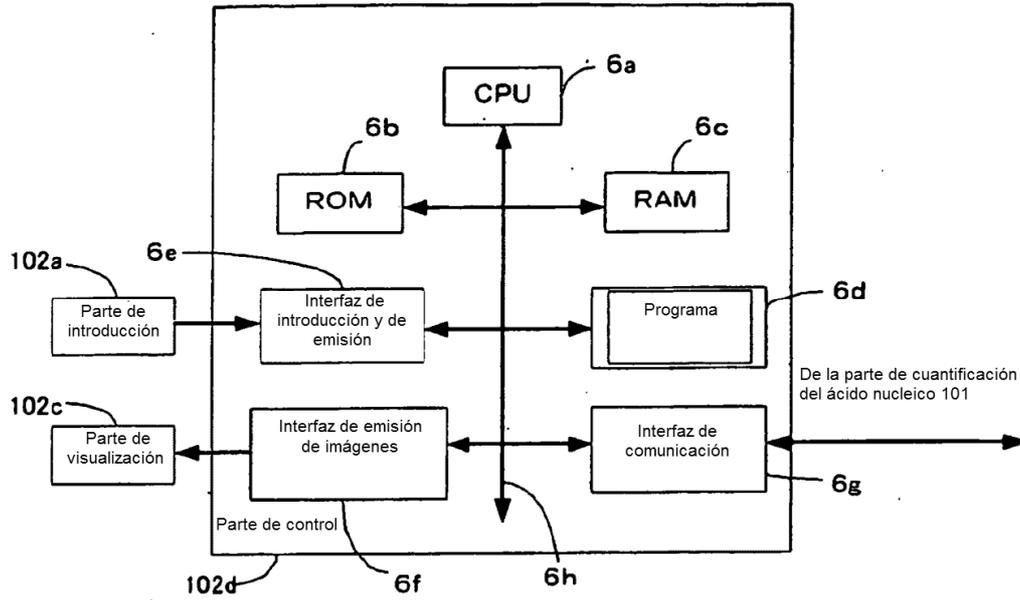


FIG. 5

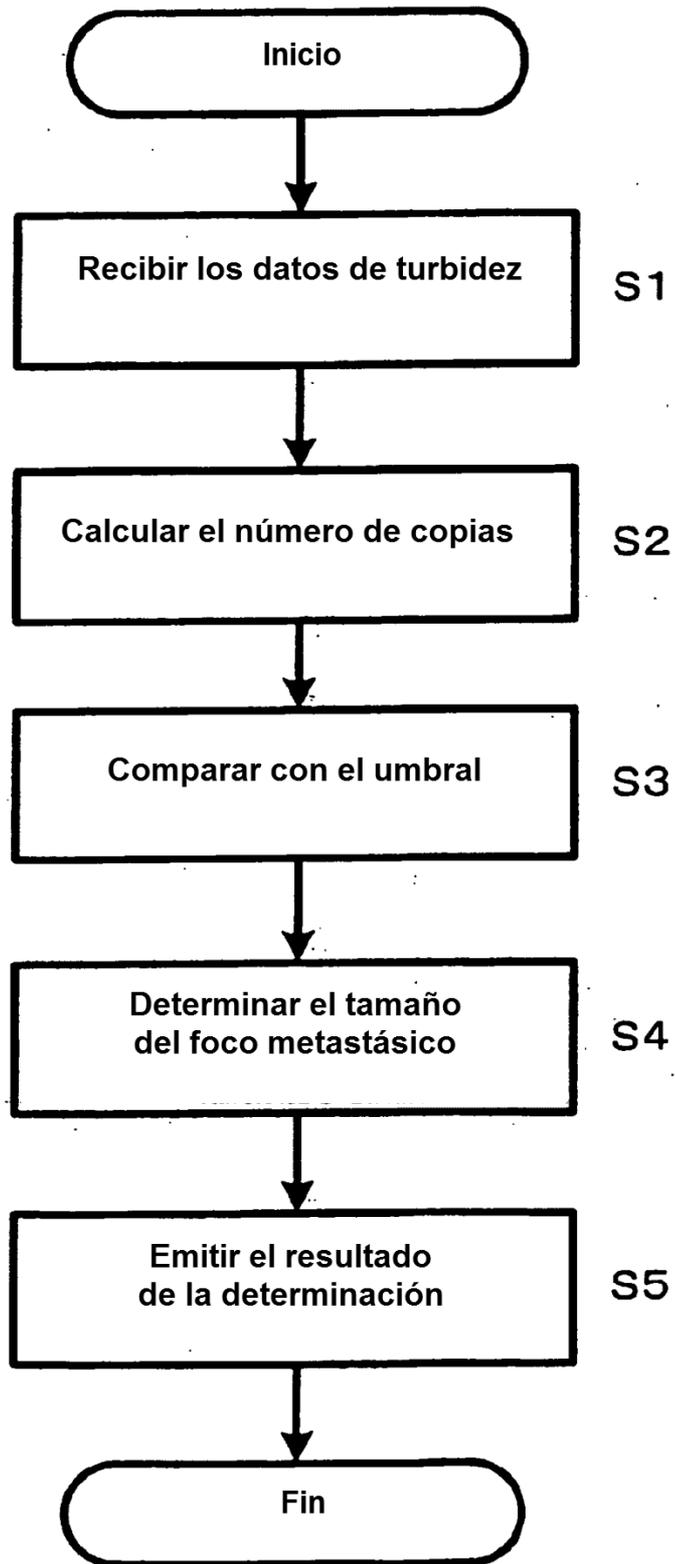


FIG. 6

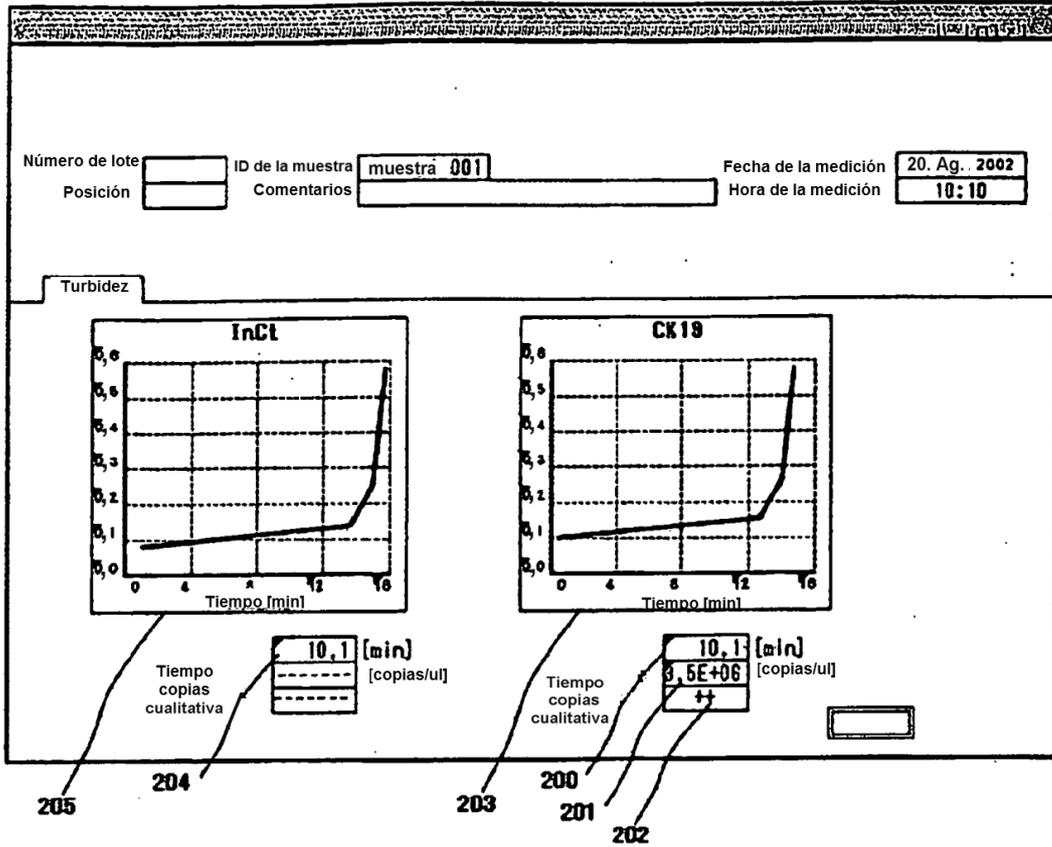


FIG. 7

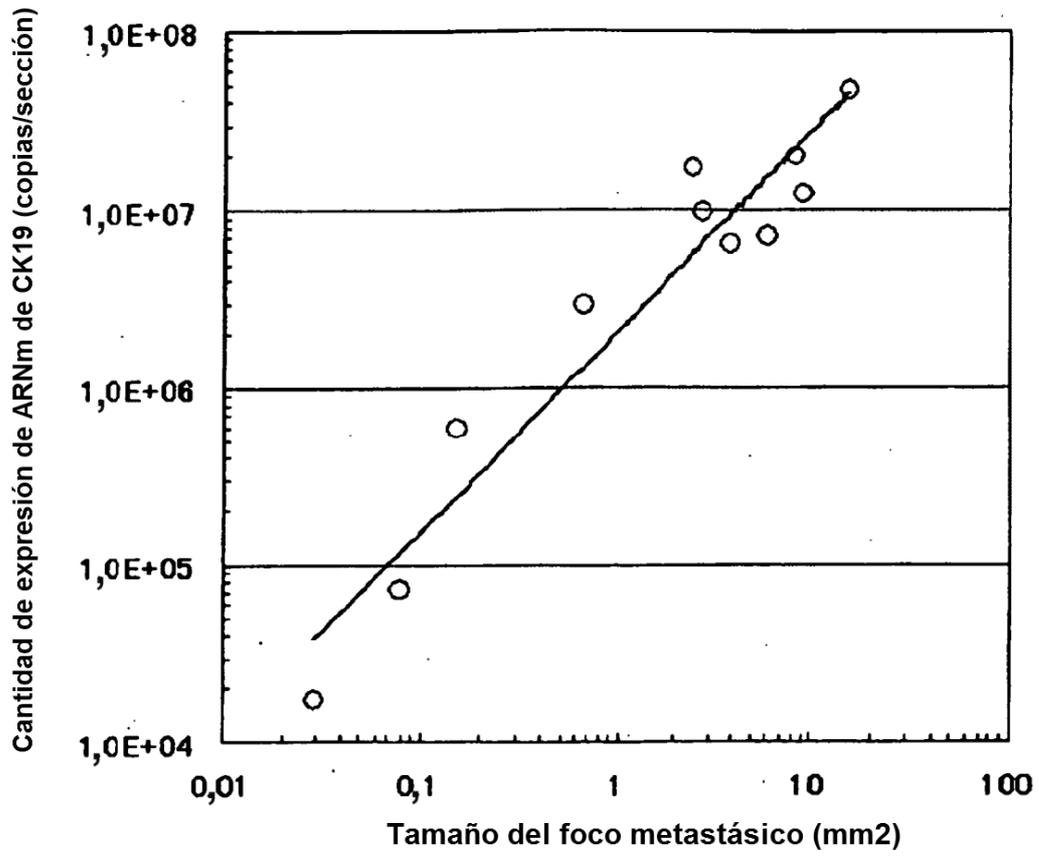


FIG. 8

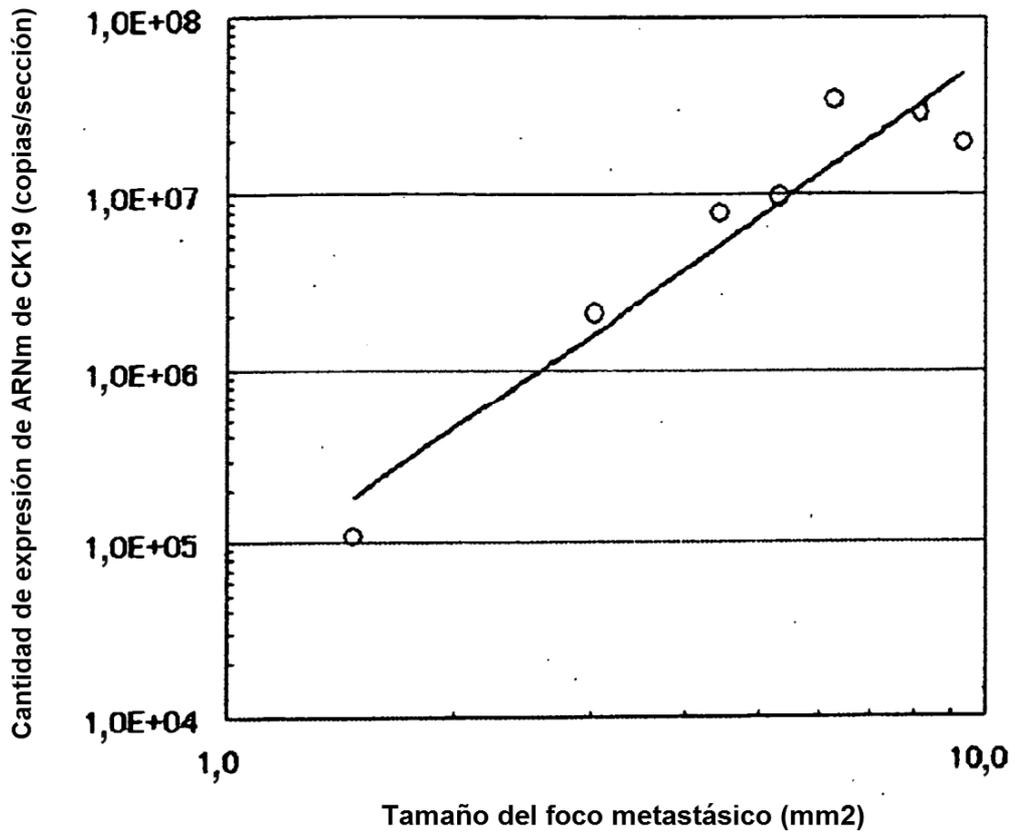


FIG. 9

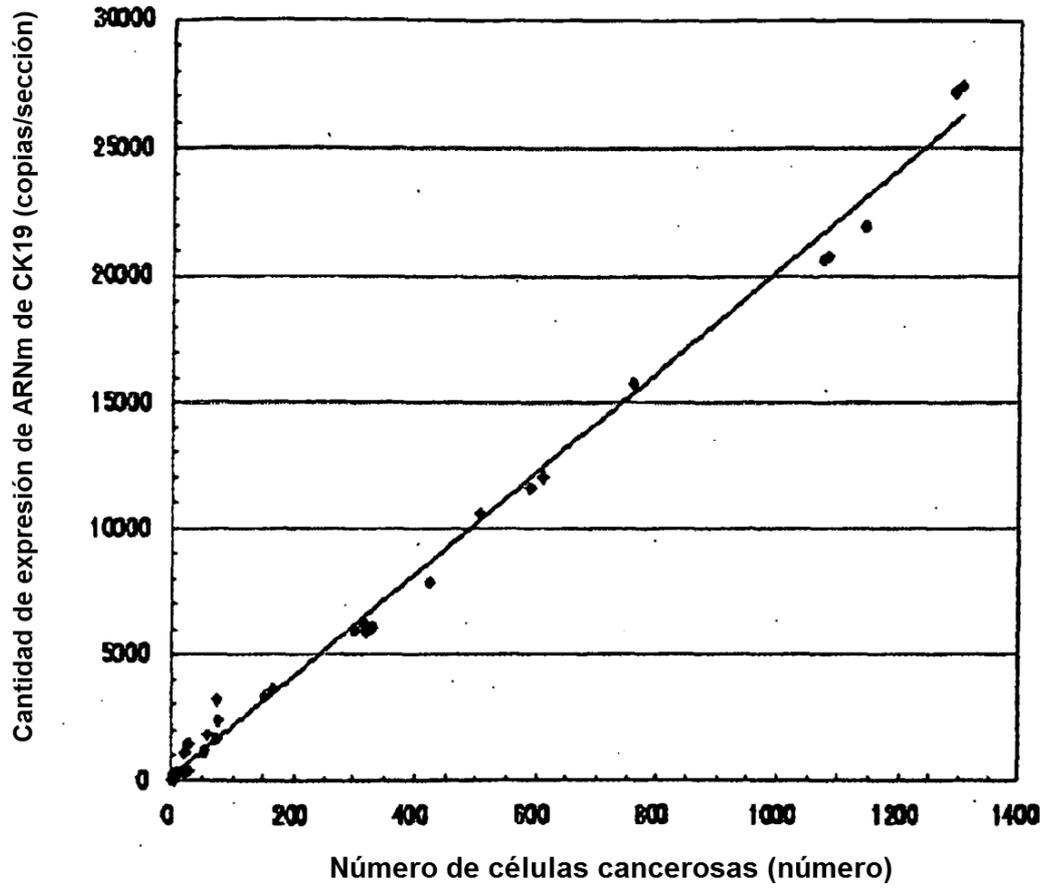


FIG. 10

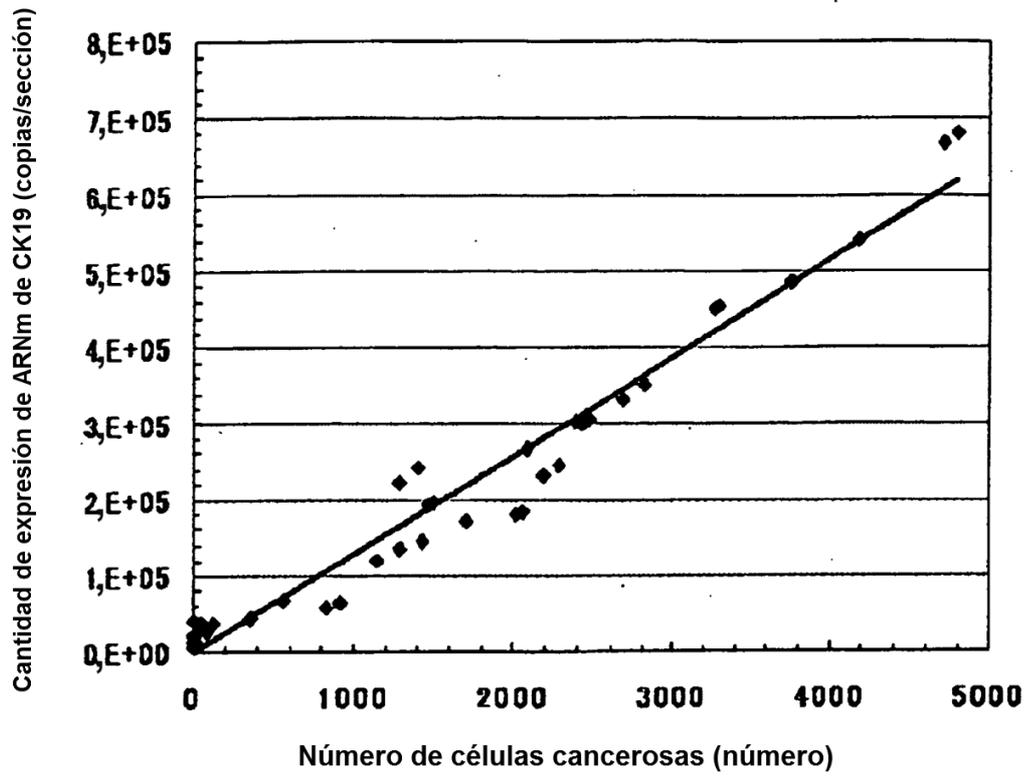


FIG. 11

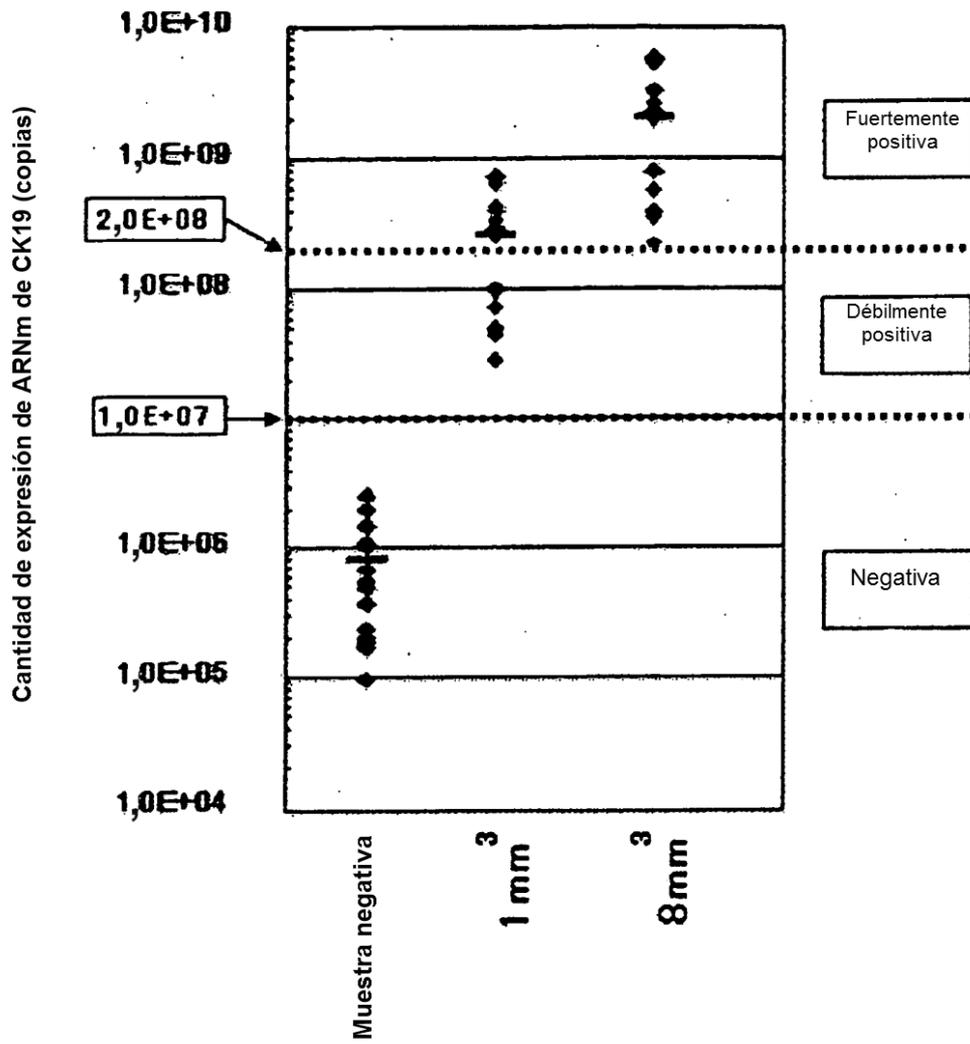


FIG. 12

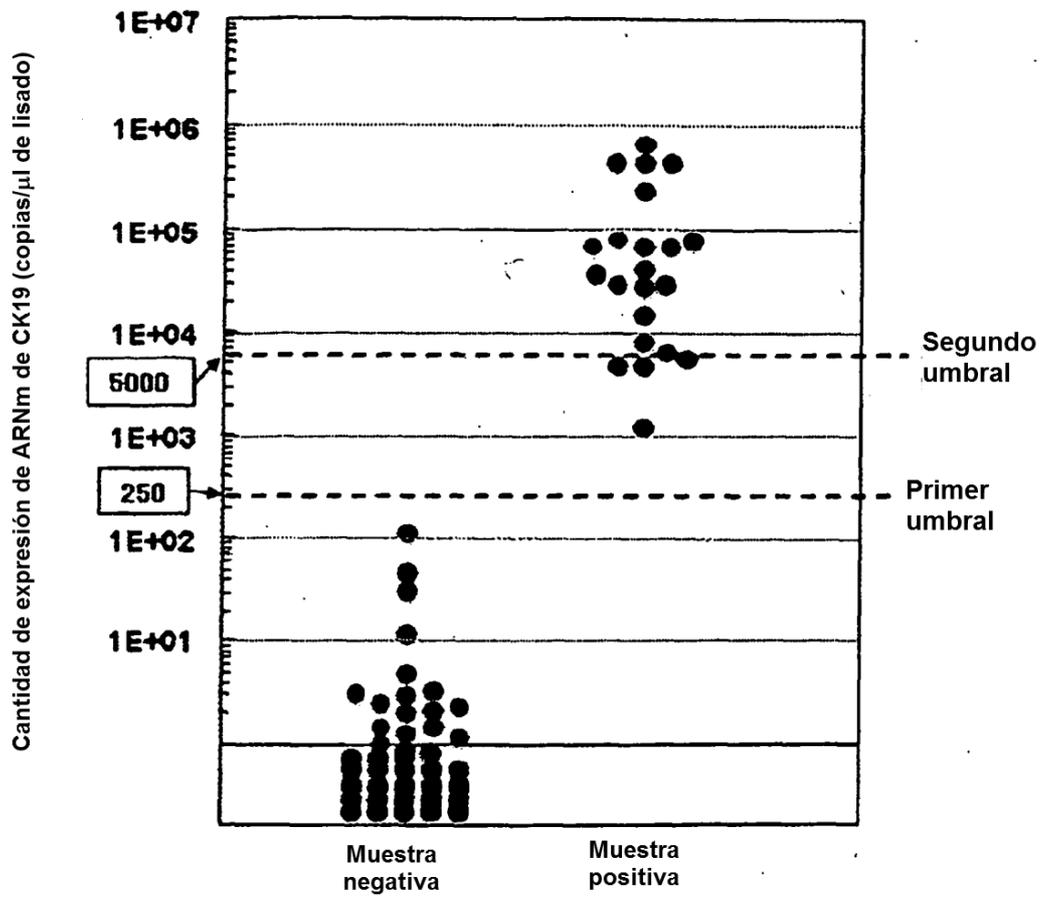


FIG. 13

