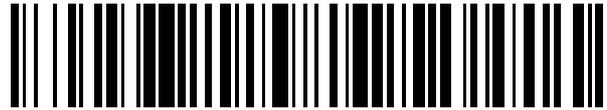


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 484 044**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2007 E 07815900 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2203570**

54 Título: **Deleción de 3,4 kb en el ADN mitocondrial para uso en la detección de cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.08.2014

73 Titular/es:

**MITOMICS INC. (100.0%)
SUITE 1000 290 MUNRO STREET
THUNDER BAY, ON P7A 7T1, CA**

72 Inventor/es:

**PARR, RYAN;
THAYER, ROBERT;
DAKUBO, GABRIEL;
CREED, JENNIFER;
ROBINSON, KERRY;
MAGGRAH, ANDREA y
REGULY, BRIAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 484 044 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

Delección de 3,4 kb en el ADN mitocondrial para uso en la detección de cáncer

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud es una continuación en parte de la solicitud PCT no. PCT/CA2006/000652 presentada el 18 de abril, 2006 que reivindica prioridad de las solicitudes provisionales U.S. nos. 60/672,016 presentada el 18 de abril, 2005, 60/721,522 presentada el 29 de septiembre, 2005, y 60/789,872 presentada el 7 de abril, 2006.

Campo de la invención

Esta invención se refiere al campo de la genómica mitocondrial. En particular se refiere a una delección de 3,4 kb en el genoma mitocondrial y a su utilidad como un indicador del cáncer.

10 Descripción de la técnica anterior

ADN mitocondrial (ADNmt) como una herramienta de diagnóstico

15 Las dinámicas de la secuencia del ADNmt son herramientas de diagnóstico importantes. Las mutaciones en el ADNmt son frecuentemente indicadores preliminares de una enfermedad en desarrollo, frecuentemente asociado con mutaciones nucleares, y actúan como biomarcadores relacionados específicamente con: enfermedad, tal como pero no limitado a, daño tisular y cáncer producidos por el tabaquismo y exposición pasiva a humo de tabaco (Lee et al., 1998; Wei, 1998); longevidad, basado en la acumulación de mutaciones en el genoma mitocondrial empezando aproximadamente a los 20 años de edad e incrementándose a partir de ahí (von Wurmb, 1998); enfermedad metastásica causada por mutación o exposición a carcinógenos, mutágenos, radiación ultravioleta (Birch-Machin, 2000); osteoartritis; enfermedad cardiovascular, de Alzheimer, de Parkinson (Shoffner et al., 1993; Sherratt et al., 1997; Zhang et al, 1998); pérdida auditiva asociada con la edad (Seidman et al., 1997); degeneración del nervio 20 óptico y disritmia cardiaca (Brown et al., 1997; Wallace et al., 1988); exoftalmoplejía externa progresiva crónica (Taniike et al., 1992); aterosclerosis (Bogliolo et al., 1999); carcinomas tiroideos papilares y tumores tiroideos (Yeh et al., 2000); así como otros (por ejemplo, Naviaux, 1997; Chinnery y Turnbull, 1999).

25 Las mutaciones en sitios específicos del genoma mitocondrial pueden asociarse con determinadas enfermedades. Por ejemplo, las mutaciones en las posiciones 4.216, 4.217 y 4.917 están asociadas con la Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON) (Mitochondrial Research Society; Huoponen (2001); MitoMap). Se encontró que una mutación en 15.452 en 5/5 pacientes estaba asociada con deficiencia en ubiquinol citocromo c reductasa (complejo III) (Valnot et al. 1999).

30 Específicamente, estas mutaciones o alteraciones incluyen mutaciones puntuales (transiciones, transversiones), delecciones (una base a miles de bases), inversiones, duplicaciones, (una base a miles de bases), recombinaciones e inserciones (una base a miles de bases). Además, se ha encontrado que alteraciones de pares de bases específicos, delecciones o combinaciones de éstas estaban asociadas con el inicio temprano de cáncer de próstata, piel y pulmón, así como envejecimiento (por ejemplo Polyak et al., 1998), envejecimiento prematuro, exposición a carcinógenos (Lee et al., 1998), etc.

35 Cáncer de próstata

El cáncer de próstata es un tumor sólido diagnosticado frecuentemente que lo más probablemente se origina en el epitelio de la próstata (Huang et al. 1999). En 1997, cerca de 10 millones de hombres americanos se cribaron para antígeno específico de la próstata (PSA), cuya presencia sugiere cáncer de próstata (Woodwell, 1999). De hecho, esto indica un número incluso mayor de hombres cribados por un examen rectal digital inicial (DRE). En el mismo 40 año, 31 millones de hombres se sometieron a un DRE (Woodwell, 1999). Además, se estima que el número anual de casos diagnosticados de nuevas de cáncer de próstata en los Estados Unidos es 179.000 (Landis et al., 1999). Es el segundo cáncer diagnosticado más comúnmente y la segunda causa principal de mortalidad por cáncer en los hombres canadienses. En 1997 el cáncer de próstata representó 19.800 de los cánceres diagnosticados de nuevas en los hombres canadienses (28%) (National Cancer Institute of Canada). Se estima que 30% a 40% de todos los 45 hombres por encima de la edad de cuarenta y nueve (49) tienen algunas células de la próstata cancerosas, pero sólo el 20% a 25% de estos hombres tienen una forma clínicamente significativa de cáncer de próstata (SpringNet - CE Connection, internet, www.springnet.com/ce/j803a.htm). El cáncer de próstata presenta una amplia variedad de comportamiento histológico que implica factores tanto endógenos como exógenos, es decir, situaciones socio-económicas, dieta, geografía, desequilibrio hormonal, historial familiar y constitución genética (Konishi et al. 1997; Hayward et al. 1998). Aunque determinadas alteraciones en el ADNmt se han asociado previamente con el cáncer 50 de próstata, existe la necesidad de marcadores adicionales para la detección del cáncer de próstata.

Delección de 3,4kb en el ADNmt y la detección del cáncer de próstata.

En la solicitud PCT en tramitación del solicitante que presenta el no. de publicación WO/06/111029 se identificó una delección de un segmento de 3.379 pb de ADNmt mediante la amplificación del genoma mitocondrial completo de tejido de próstata. Se determinó que la delección de 3.379 pb (referida como la delección de 3,4 kb) estaba localizada entre los nucleótidos 10.744-14.124 del genoma mitocondrial. Se determinó que la detección de esta delección podría usarse en el diagnóstico del cáncer de próstata cuando se ensayan muestras de tejido. WO 2006/111029 no enseña el uso de ADNmt que tiene la delección objeto en la detección de cánceres distintos del cáncer de próstata.

La delección de 3,4 kb elimina todo o parte de los genes siguientes del genoma de ADNmt: (i) subunidad 4L de la NADH deshidrogenasa, (ii) subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa, (iii) subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa, (iv) ARNt histidina, (v) ARNt serina2, y (vi) ARNt leucina2.

Cáncer de mama

El cáncer de mama es un cáncer del tejido glandular de la mama y es la quinta causa más común de muerte por cáncer. En 2005, el cáncer de mama causó 502.000 muertes (7% de las muertes por cáncer; casi 1% de todas las muertes) en el mundo (Organización Mundial de la Salud Cancer Fact Sheet No. 297). Entre las mujeres en el mundo, el cáncer de mama es el cáncer más común y la causa más común de muerte por cáncer (Organización Mundial de la Salud Cancer Fact Sheet No. 297). Las delecciones y mutaciones del genoma mitocondrial en el cáncer de mama se investigaron en Zhu et al. (2004, Cancer detection and prevention, 28(2):119-26), Tan Duan-Jun et al. (2002, Cancer Research, 62(4):972-6) y Parella et al. (2001, Cancer Research, 61(20):7623-6). Por ejemplo, Zhu et al. publica una relación entre el cáncer de mama y un ADNmt que comprende una delección de 4.576 pb en una delección denominada común de 4.977 pb. La publicación también describe que no se encontró que dos delecciones más en esta delección común, las delecciones de 3.938 pb y 4388 pb, se correlacionaran con cáncer de mama. Ninguno de estos documentos describe una delección de aproximadamente 3.379 pb como un marcador para cáncer de mama. Aunque determinadas alteraciones en el ADNmt se han asociado previamente con el cáncer de mama, por ejemplo en Parrella et al. (Cancer Research: 61, 2001), existe la necesidad de marcadores adicionales para la detección del cáncer de mama.

Resumen de la invención

En una realización, la presente invención proporciona un método para detectar un cáncer en un individuo que comprende:

- a) extraer ADN mitocondrial, ADNmt, de una muestra biológica del individuo;
- b) cuantificar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene una delección de aproximadamente 3.379 pares de bases en la secuencia de ácido nucleico que abarca aproximadamente los residuos 10.744 a 14.124 del genoma de ADNmt;
- c) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la delección con al menos un valor de referencia conocido; en el que el cáncer es cáncer de mama.

En una realización, el al menos un valor de referencia conocido es la cantidad de la delección en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal no canceroso conocido.

En una realización adicional, el al menos un valor de referencia conocido es la cantidad de la delección en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal canceroso conocido.

En otra realización, el valor de referencia conocido es la cantidad de la delección en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal no canceroso conocido, en el que una cantidad elevada de la delección en la muestra biológica comparada con la muestra de referencia es indicativa de cáncer. En esta realización, el método puede comprender además la etapa de comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la delección con la cantidad de la delección en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal canceroso conocido.

En una realización, el valor de referencia conocido es la cantidad de la delección en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal canceroso conocido, en el que un nivel similar de la delección en la muestra biológica comparado con la muestra de referencia es indicativo de cáncer. En esta realización, el método puede comprender además la etapa de comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la delección con la cantidad de la delección en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal no canceroso conocido.

La presente invención proporciona además un método para monitorizar a un individuo para el desarrollo de un cáncer que comprende:

- a) extraer ADNmt de una muestra biológica del individuo;

b) cuantificar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene una delección de aproximadamente 3.379 pares de bases en la secuencia de ácido nucleico que abarca aproximadamente los residuos 10.744 a 14.124 del genoma de ADNmt;

c) repetir las etapas a) a b) durante una duración de tiempo,

5 en el que un nivel incrementado de la delección durante la duración de tiempo es indicativo de cáncer, y en el que el cáncer es cáncer de mama.

En una realización, este método comprende además al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en: (a) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la delección con la cantidad de la delección en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal no canceroso conocido; y (b) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la delección con la cantidad de la delección en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal canceroso conocido.

10

En realizaciones adicionales, la delección tiene una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la secuencia identificada en SEQ ID NO: 1 en los métodos de la presente invención.

15 En otras realizaciones, la cuantificación de la delección en los métodos de la presente invención incluye en primer lugar amplificar una región diana de ADNmt que es indicativa de la delección, y cuantificar la cantidad de la región diana amplificada. En estas realizaciones, la amplificación de la región diana puede llevarse a cabo usando una pareja de cebadores de amplificación, uno de la pareja de cebadores de amplificación se superpone a un empalme que une regiones en los extremos opuestos de la delección.

20 En realizaciones adicionales, la etapa de cuantificación se lleva a cabo usando PCR en tiempo real en los métodos de la presente invención.

En una realización de la invención, la etapa de cuantificación se lleva a cabo usando PCR en tiempo real y el valor de referencia es un umbral de ciclo.

En otras realizaciones se usa un cebador de PCR que tiene una secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 2 como parte de una pareja de cebadores de amplificación para amplificar la región diana.

25 En realizaciones adicionales, uno de una pareja de cebadores de PCR usado en la amplificación de la región diana se superpone a una región con empalme de ADNmt después de la delección de la secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 1.

En realizaciones adicionales, la muestra biológica es un tejido corporal o fluido corporal. En otras realizaciones, la muestra biológica se selecciona de tejido de mama y orina.

30 **Descripción breve de los dibujos**

Se describirá ahora una realización de la invención sólo como ejemplo con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra el diseño y secuencia de un cebador útil para la detección de la delección de 3,4 kb.

35 La Figura 2 es un gráfico que muestra una comparación de umbral de ciclo entre participantes malignos y benignos sintomáticos en el estudio 3,4 kb.

La Figura 3 es un gráfico que muestra umbral de ciclo relacionado con el Ejemplo 1.

La Figura 4 muestra una curva ROC que ilustra la especificidad y sensibilidad de una realización de la presente invención.

40 La Figura 5 muestra una curva ROC que ilustra la especificidad y sensibilidad de otra realización de la presente invención.

La Figura 6 muestra datos de PCR en tiempo real relacionados con los niveles de la delección de 3,4kb en el ADNmt asociados con cáncer de mama.

45 La Figura 7 muestra una curva ROC que ilustra la especificidad y sensibilidad de otra realización de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Tal y como se usa en la presente memoria, "umbral de ciclo" (C_T) es el punto en el que la amplificación de la diana usando PCR en tiempo real sube por encima del fondo, como se indica por una señal tal como una señal fluorescente. El C_T es inversamente proporcional a la cantidad de la secuencia que se está investigando.

Tal y como se define en la presente memoria, "sensibilidad" se refiere a la fracción de resultados positivos verdaderos (proporción de positivos verdaderos) obtenida usando el método de la presente invención.

Tal y como se define en la presente memoria, "especificidad" se refiere a la fracción de resultados positivos falsos (proporción de positivos falsos) obtenida usando el método de la presente invención.

5 En una realización de la presente invención, se proporcionan métodos para monitorizar y diagnosticar cáncer a través de la detección y cuantificación de la deleción de 3,4 kb en el ADNmt mencionada anteriormente. Por ejemplo, la presente invención puede usarse para detectar la presencia de pre-neoplasia, neoplasia y progresión hacia malignidad potencial de cáncer de mama. En un aspecto, la presente invención implica la detección y cuantificación de la deleción de 3,4kb en el ADNmt (SEQ ID NO:1) para la detección, diagnóstico y/o monitorización de cáncer. En este método, el ADNmt se extrae de una muestra biológica (por ejemplo tejido corporal o fluidos corporales tales como orina, fluido por masaje de próstata). El ADNmt extraído se ensaya con el fin de determinar los niveles (es decir, cantidad) de la deleción de 3,4 kb en la muestra. En los ensayos realizados por los presentes inventores, se encontró que los niveles de la deleción estaban elevados en las muestras obtenidas de sujetos con cáncer cuando se comparó con las muestras obtenidas de sujetos sin cáncer. Tomando como base la información y datos suministrados más adelante, los inventores han concluido que los niveles elevados de la deleción de 3,4 kb en el ADNmt son indicativos de cáncer.

20 Como se describe en PCT WO/06/111029, la deleción de 3,4kb abarca aproximadamente los nucleótidos 10.744 a 14.124 del genoma de ADNmt. El genoma de ADNmt se lista como SEQ ID NO:8 (no. de registro Genbank AC_000021). Los inventores han determinado, como se proporciona en el ejemplo más adelante, que esta deleción también está asociada con cáncer y en particular cáncer de próstata y de mama. Por lo tanto, dicha deleción proporciona un biomarcador exacto y, por lo tanto, una herramienta valiosa para la detección, diagnóstico o monitorización de cáncer en al menos estos tejidos.

25 La deleción resulta en la creación de dos monómeros de deleción, uno con un tamaño de 3,4kb (sublimon pequeño) y otro con un tamaño de aproximadamente 12,6kb (sublimon grande). La aparición de la deleción puede detectarse bien identificando la presencia del sublimon pequeño o determinando que la secuencia de 3,4 kb se ha delecionado del sublimón grande.

Como se ha discutido anteriormente, la deleción es de aproximadamente 3.379 pb, y comprende genes que codifican la subunidad 4L de la NADH deshidrogenasa, subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa, subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa, ARNt histidina, ARNtserina2, y ARNt leucina2.

30 En una realización, se obtienen muestras, por ejemplo, de orina o tejido de mama, de un individuo y se ensayan durante un periodo de tiempo (por ejemplo, años) con el fin de monitorizar la génesis o progresión del cáncer. Los niveles incrementados de la deleción de 3,4 kb con el tiempo podrían ser indicativos del comienzo o progresión del cáncer.

35 La acumulación relacionada con la edad de la deleción de 3,4 kb en el ADNmt puede predisponer a un individuo, por ejemplo, a cáncer de próstata o cáncer de mama, que es predominante en hombres de mediana edad y mayores, y mujeres de mediana edad y mayores, respectivamente. Según un aspecto de la invención, se proporciona un método en el que puede tener lugar un cribado regular del cáncer mediante la monitorización con el tiempo de la cantidad de la deleción de 3,4 kb en tejidos corporales tales como tejido de mama o fluidos corporales tales como orina.

40 El sistema y método de la presente invención puede usarse para detectar cáncer en un estadio temprano, y antes de cualquier anomalía histológica. Por ejemplo, el sistema y método de la presente invención puede usarse para detectar pre-neoplasia en tejido de mama.

Se prefieren las secuencias de cebador siguientes para la detección de la deleción de 3,4 kb:

45 3,4 directo (se une a las bases 10.729-10.743/14.125-14.139 del genoma de ADNmt) 5'-TAGACTACGTACATACTAACCCTACTCCTA-3' (SEQ ID NO: 2);

3,4 inverso (se une a las bases 14.361-14.379 del genoma de ADNmt) 5'-GAGGTAGGATTGGTGCTGT-3' (SEQ ID NO: 3).

50 En una realización de la presente invención, se usa una pareja de cebadores de amplificación para amplificar una región diana indicativa de la presencia de la deleción de 3,4 kb. En esta realización, uno de la pareja de cebadores de amplificación se superpone con una región con empalme de ADNmt después de que haya ocurrido la deleción de la secuencia de 3,4 kb (es decir, un empalme en una posición entre 10.743 y 14.125 del genoma de ADNmt). Por lo tanto, la extensión del cebador que se superpone sólo puede ocurrir si la sección 3,4 kb está delecionada.

55 En otra realización de la presente invención, se usa una pareja de cebadores de amplificación para amplificar una región diana asociada con la secuencia de 3,4 kb delecionada. La secuencia de 3,4 kb delecionada, después de la deleción, puede reformarse como una molécula de ADNmt circular. En esta realización, uno de la pareja de

cebadores de amplificación se superpone con el sitio de reunión de los extremos de la secuencia de 3,4 kb. Así, un incremento en la cantidad de la molécula de 3,4 kb detectado en una muestra es indicativo de cáncer. Se prefiere la pareja de cebadores siguiente para la detección del ácido nucleico de 3,4 kb delecionado.

Directo 14.115/10.755 5'-CCCACTCATCACCTAACCTAC-3' (SEQ ID NO: 9)

5 Inverso 10.980R 5'-GGTAGGAGTCAGGTAGTTAG-3' (SEQ ID NO: 10).

En un aspecto de la invención, se proporciona un kit para diagnosticar cáncer, por ejemplo cáncer de mama, que comprende medios para la extracción de ADNmt, cebadores que tienen las secuencias de ácido nucleico recitadas en SEQ ID NOS: 2 y 3, o SEQ ID NOS: 9 y 10, reactivos e instrucciones.

10 Otro aspecto de la invención proporciona métodos para confirmar o refutar la presencia de un ensayo de biopsia de cáncer de una muestra de biopsia (por ejemplo, cáncer de mama), que comprende: obtener tejido no canceroso de una muestra de biopsia; y detectar y cuantificar la cantidad de la deleción de 3,4 kb en el ADNmt en el tejido no enfermo.

15 En una realización, la presente invención proporciona un método para cribar individuos para cáncer de mama a partir de una muestra de fluido corporal que comprende; obtener una muestra de fluido corporal, y detectar y cuantificar el nivel de la deleción de 3,4 kb en el ADNmt en el fluido corporal.

20 Aunque los métodos de PCR cuantitativa en tiempo real, como se describe en los ejemplos más adelante, representan el medio preferido para detectar y cuantificar la presencia o ausencia de la deleción de 3,4kb, también podrían utilizarse otros métodos que serán muy conocidos para un experto en la técnica. Por ejemplo, la cuantificación de la deleción podría hacerse usando la tecnología de Sistema Bioplex™ y Matriz de Suspensión de Bio-Rad. Generalmente, el método requiere la amplificación y cuantificación de secuencias usando cualquier método conocido.

Los ejemplos proporcionados más adelante ilustran que esta deleción puede usarse para detectar la presencia de cáncer en muestras biológicas, por ejemplo orina y tejido de mama. Tomando como base los descubrimientos en estos ejemplos, la deleción de 3,4 kb en el ADNmt puede usarse como un biomarcador para cáncer.

25 Los diferentes ejemplos proporcionados ilustran una diferencia en la cantidad de ADNmt que tiene la deleción de 3,4 kb entre las muestras obtenidas de sujetos que tienen cáncer, y los sujetos sin cáncer. Se encontró que la cantidad de la deleción de 3,4 kb era mayor en las muestras obtenidas de sujetos que tienen cáncer. Esta determinación se hizo comparando la cantidad de la deleción de 3,4 kb en las muestras de ensayo con las cantidades de células cancerosas conocidas y/o células no cancerosas conocidas.

30 **Ejemplo 1: Deleción de 3,4 kb en el ADNmt de Tejido de Próstata**

Se identificó una deleción de aproximadamente 3,4 kilobases (kb) mediante la amplificación del genoma mitocondrial completo de tejido de próstata fresco congelado. Usando regresión lineal, se estimó que el tamaño de la deleción era entre 3.000 pares de bases (pb) y 3.500 pb. Se identificaron dos posibles deleciones candidatas usando Mitomap™ (Brandon, M. C., Lott, M. T., Nguyen, K. C., Spolim, S., Navathe, S. B., Baldi, P. y Wallace, D. C., MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update. Nucleic Acids Research 33 (Database Issue):D611-613, 2005; www.mitomap.org), la deleción de 3.397 pb en 9.574-12.972, y la deleción de 3.379 pb en 10.744-14.124. Con el fin de determinar cuál de las dos deleciones estaba asociada con cáncer de próstata, si alguna, se desarrolló un cebador directo que conectaba la unión de la deleción para cada una de las dos candidatas, asegurando que el cebador se extendía más allá de las regiones repetidas que flanquean las deleciones. La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra el diseño y secuencia del cebador (es decir, SEQ ID NO: 2). Se obtuvieron resultados de amplificación positivos para el amplicón correspondiente a la deleción de 3.379 pb (referida como la deleción de 3,4 kb) en 10.744-14.124.

45 Como se ha indicado anteriormente, la deleción de 3,4 kb elimina todo o parte de los genes siguientes: (i) subunidad 4L de la NADH deshidrogenasa, (ii) subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa, (iii) subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa, (iv) ARNt histidina, (v) ARNt serina2, y (vi) ARNt leucina2.

Se determinó que la deleción de 3,4kb estaba presente en el 91% de 33 muestras de próstata frescas congeladas. Con los cebadores de deleción específicos, se ensayaron tejidos fijados con formalina con el fin de incrementar el valor de n.

50 Los presentes investigadores secuenciaron genomas mitocondriales completos de 32 muestras de tejido microdisecionadas por microdisección por captura láser y 12 biopsias con aguja de próstatas histológicamente normales. Se usaron secciones de tejido de archivo de cada una de estas muestras para el estudio siguiente. Se retiraron 1-2 secciones seriadas de cada muestra. Se extrajo el ADN de cada muestra en su totalidad en lugar de como una microdisección. Así, cada muestra consistió en una mezcla de tejido de la próstata glandular así como tejido de la próstata estromal. Esta extracción se realizó usando el Mini Kit de ADN QIAamp™ de Qiagen (No de Cat 51304). Después de la extracción, las muestras se cuantificaron usando un espectrofotómetro Nano-Drop™ y las

concentraciones se normalizaron posteriormente a 2ng/ul. Cada muestra se amplificó usando 20ng de ADN de entrada y un kit iQ™ SYBR Green Supermix™ (Bio-Rad Laboratories Inc.). Las reacciones se llevaron a cabo en un sistema de PCR en tiempo real con dos colores Opticon® (MJ Research).

5 Como se muestra en la Figura 2, se observó una diferencia marcada en el umbral del ciclo y, por extensión, en la cantidad de la delección entre las muestras de próstata malignas y las muestras de próstata benignas sintomáticas. Las muestras malignas presentaron un umbral de ciclo consistentemente antes que las muestras benignas.

Ejemplo 2: Estudio Ciego de la Delección de 3,4kb - Comparación de Umbral de Ciclo

10 Se seleccionaron 21 muestras adicionales de tejido de próstata, 10 de las cuales eran benignas y 11 de las cuales eran malignas. El estado patológico se determinó por biopsias con aguja llevadas a cabo por un patólogo cualificado. Las muestras se hicieron ciegas de manera que los presentes investigadores ignoraban su estado patológico cuando llevaron a cabo este ensayo. Los presentes investigadores fueron capaces de predecir el estado patológico correctamente en el 81% de los casos examinando el umbral de ciclo. De los 4 casos incorrectos, dos eran muestras malignas que se determinó que eran benignas y 2 eran muestras benignas que se determinó que eran malignas. El médico requirió la información clínica de seguimiento para los 2 individuos en el último escenario para determinar si se les había diagnosticado cáncer de próstata con posterioridad a los resultados de la biopsia con aguja usados para este estudio. Uno de los individuos que originalmente produjo una muestra benigna pero para el que se predijo por este estudio que tenía una malignidad produjo posteriormente una muestra maligna. Como resultado, uno de los positivos falsos se convirtió en un positivo verdadero. Por lo tanto, el estado patológico se predijo correctamente en el 86% de los casos examinados en este estudio. El valor predictivo positivo (PPV, en el que $PPV = \frac{\text{positivos verdaderos}}{\text{positivos verdaderos} + \text{positivos falsos}}$) final para este estudio fue 91% y el valor predictivo negativo (NPV, en el que $NPV = \frac{\text{negativos verdaderos}}{\text{negativos verdaderos} + \text{negativos falsos}}$) fue 80%.

Ejemplo 3: Estudio de la Delección de 3,4kb - Métodos (n=76)

25 En este estudio se examinaron setenta y seis muestras de tejido de próstata para la delección de 3,4 kb. Todas las muestras de tejido se fijaron con formalina, siendo 25 malignas, siendo 12 normales, y teniendo 39 enfermedad prostática benigna como se muestra histológicamente. Del último grupo, más de la mitad tenían hiperplasia. Todos los especímenes eran biopsias con aguja tomadas de los archivos de tejido de los investigadores.

Especímenes de Próstata

30 Se realizó una retirada de cinta adhesiva aplicada con presión en cada portaobjetos usando Prep-Strips (Número de Catálogo LCM0207) de Arcturus Bioscience Inc. Esto permitió la eliminación de toda materia particulada o tejido no adherente del portaobjetos antes de la extracción de ADN. Con el tejido todavía en los portaobjetos, los portaobjetos se lavaron con PBS (Disolución Salina Tamponada con Fosfato) para eliminar tanto fijador como fuera posible. Las 1-2 secciones de biopsia con aguja en los portaobjetos se rasparon en tubos de microcentrifuga estériles usando cuchillas quirúrgicas esterilizadas, envueltas individualmente. El ADN se aisló y purificó usando un Mini Kit de ADN QIAamp® (Qiagen, No. de Cat. 51304) según las especificaciones del fabricante. Se procesó un control de extracto negativo en paralelo con las extracciones de los portaobjetos como punto de evaluación de control de calidad. La concentración total de ADN y la proporción de pureza para cada muestra se determinaron por espectrofotometría (Nano-Drop™ ND-1000) y se prepararon diluciones de 2ng/μl para el propósito de la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR).

Cebadores (Oligonucleótidos)

40 Los cebadores oligonucleotídicos purificados fueron sintetizados químicamente por Invitrogen (California, EEUU). Las secuencias de los cebadores y los tamaños esperados de los productos de PCR amplificados se listan en la Tabla 1. Además, los análisis por PCR de las delecciones en el ADNmt incluyeron controles positivos (ADN de una fuente que se sabe que porta el ADNmt mutante). Cada conjunto de cebadores con la excepción de TNF (factor de necrosis tumoral) se evaluó frente a la línea celular rho 0 sin mitocondrias para confirmar la ausencia de coamplificación de pseudogenes.

Tabla 1 Cebadores de amplificación.

Pareja de Cebadores	Posición Amplificada 5'- 3'	Longitud del producto amplificado (pares de bases)
Delección 3,4 Tiempo Real	10.729-14.379 (menos de 3.379pb en 10.744-14.124)	273
12s ADNmt	708-945	238

Pareja de Cebadores	Posición Amplificada 5'- 3'	Longitud del producto amplificado (pares de bases)
TNF	3.756-3.886	131
3,4	directo (10.729-10.743 - 14.125-14.139) 5'TAGACTACGTACATACTAACCTACTCCTA-3' SEQ ID NO: 2	
3,4	inverso (14.361-14.379) 5'-GAGGTAGGATTGGTGCTGT-3' SEQ ID NO: 3	
12s	directo (708-728) 5'-CGTTCAGTGAGTTCACCCTC-3" SEQ ID NO: 4	
12s	inverso (923-945) 5'-CACTCTTTACGCCGGCTTCTATT-3' SEQ ID NO: 5	
TNF	directo (3.756-3.775) 5' -CCTGCCCAATCCCTTATT-3' SEQ ID NO: 6	
TNF	inverso (3.866-3.886) 5'-GGTTTCGAAGTGGTGGTCTTG-3' SEQ ID NO: 7	

Reacción en cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

5 Se realizaron tres PCR separadas en cada muestra. Cada reacción tuvo un volumen total de 25µl e incluyó ADN molde, una pareja de cebadores (12s o Deleción 3,4 o TNF), un kit iQ™ SYBR Green Supermix™ (Número de Catálogo 170-8882, Bio-Rad Laboratories Inc.) y agua desionizada destilada (ddH₂O). El TNF (factor de necrosis tumoral) comprendía cebadores de genes nucleares de copia única, y 12s comprendía cebadores de genoma mitocondrial total. El volumen y concentraciones para el ADN molde, cebadores y tampón de reacción se listan a continuación.

Tabla 2 Componentes de qPCR.

Reactivo	Concentración por Reacción	Volumen por Reacción
Tampón de Reacción	1X	12,5µl
Cebador (directo e inverso)	250nM	0,0625µl de cada preparación madre 100 umoles
ddH ₂ O	N/A	2,375.µl
ADN Molde	20ng	10,0µl
Total		25µl

10

Los parámetros de ciclado para cada amplicón se listan en la Tabla 3.

Tabla 3 Parámetros de Ciclado.

Etapas	Temperatura (°C)	Duración
1	95	3 min
2	95	30 seg
3	66 (cebadores de la deleción 3,4) o	30 seg
	61,5 (cebadores 12s) o	

Etapa	Temperatura (°C)	Duración
	61,5 (cebadores TNF)	
4	72	30 seg
5	Lectura de Placa	
6	72	10 min
7	Curva de Fusión 50°C - 110°C lectura cada 1°C	3 sec
Repetir las etapas 2-5, 44 veces para un total de 45 ciclos.		

5 El ciclado térmico, detección en tiempo real y análisis de las reacciones se llevó a cabo usando un Motor de ADN Opticon® 2 Sistema de Detección de Fluorescencia Continua equipado con software Intuitive Opticon Monitor™ (MJ Research Inc.). Se utilizó el método de la curva estándar para la cuantificación del ADN. Un conjunto de diluciones seriadas (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1) de los tres moldes generados por PCR purificados, un producto para la deleción de 3,4, uno para los cebadores 12s, y uno para TNF. A partir de esto, se generaron tres curvas estándar diferentes que muestran el número de copias de ADNmt total (amplicón 12s-cebadores de genoma mitocondrial total), la cantidad de ADNmt que tiene la deleción de 3,4 kb, o ADN nuclear total (TNF-cebadores de gen nuclear de copia única). Los valores C_T de las muestras se convirtieron en el número de copias de ADN comparando el C_T de la muestra con el de los estándares. Se consideró que la deleción de 3,4 estaba ausente o a niveles bajos si la detección no se detectó en 37 ciclos.

10 La determinación de malignidad se basa en la cantidad de la deleción de 3,4kb presente en la muestra normalizada como se indica por la localización del umbral de ciclo. Esta localización puede ser absoluta, como en más de 25 ciclos pero menos de 35 ciclos, o más probablemente una proporción entre el ADN mitocondrial total presente como se indica por el amplicón 12s, y la deleción de 3,4kb. Esto puede expresarse como un porcentaje del ADN mitocondrial total. El número de células, como se representa por el amplicón TNF, puede incorporarse para refinar la distinción entre tejidos benignos y malignos.

15 Con el fin de automatizar los análisis de estas muestras, se emplearon herramientas de bioinformática. Las tres variables que se consideraron para estos análisis fueron el umbral de ciclo C_T del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), especies totales de mitocondrias que contienen los sitios de cebador específicos, y las mitocondrias que portan la deleción de interés.

20 Análisis de Grupos

El agrupamiento no se normalizó ni se usaron funciones logarítmicas debido al intervalo similar y pequeño de datos.

25 La Figura 3 muestra el movimiento y tendencia real de los datos. El eje de las x es el número de paciente y el eje de las y es el umbral de ciclo obtenido a partir de PCR en tiempo real.

Es importante indicar que cuanto mayor es el umbral de ciclo, menor es la cantidad de la deleción que está presente.

30 La tendencia general mostrada en la Figura 3 se basa en las diferencias/proporciones entre las variables de Deleción, Total, y TNF. La deleción es baja a ausente para las muestras benignas/normales (lado derecho) y se incrementa (hacia la izquierda) con muestras benignas anormales y malignas. Las muestras benignas anormales y malignas empiezan a diferenciarse entre sí tomando como base la proporción de umbral de ciclo de Deleción a TNF.

Aprendizaje Supervisado

35 El aprendizaje supervisado se basa en el intento del sistema de predecir resultados para muestras conocidas. Se usó la mitad de los datos para entrenar y la otra mitad para ensayar el algoritmo. El aprendizaje supervisado compara sus predicciones con la respuesta diana y "aprende" de sus errores. Pero, si el resultado predicho es mayor o menor que el resultado real en los datos, el error se propaga a través del sistema y los pesos se ajustan de acuerdo con esto.

CONJUNTO de Datos: 5% a 35% - **Benigno**
 35% a 65% - **Hiperplasia**
 65% a 95% - **Maligno**

5 Algoritmo de Red Neuronal Artificial (ANN) (mostrado esquemáticamente más adelante):

La mitad del conjunto de datos usado para en el entrenamiento de ANN

La otra mitad se usó para comparar la exactitud Exactitud = Comparar conjunto de datos esperados con conjunto de datos obtenidos → 86,6%

Algoritmo de Red Neuronal Artificial



10

Aprendizaje supervisado de datos de delección usando la Red Neuronal Artificial (ANN)

Tres Clasificaciones:

- Benigno
- Hiperplasia
- Maligno

15

Se usaron tres variables para cada clasificación tomando como base el Umbral de ciclo de PCR en tiempo real C_T :

- Factor de necrosis tumoral (TNF) - Control de copia nuclear.
- Mitocondria total - control de copia mitocondrial
- Delección - Mitocondria en el estado delecionado.

20 Resultados:

La mitad del conjunto de datos se usa para entrenar el ANN, y la mitad remanente se usa para comparar la exactitud.

Exactitud de las Tres Clasificaciones = 86,6%

Valor Predictivo Positivo (PPV);

Benigno a Maligno = 88,2%

Valor Predictivo Negativo (NPV)

Benigno a Maligno = 76,5%

25

Ejemplo 4: Delección de 3.4 kb en el ADNmt Asociada con Cáncer de Mama

Se ensayaron 18 muestras de tejido de mama maligno y benigno, siendo 9 malignas y siendo 9 benignas, para la presencia de la delección de 3,4 kb mencionada anteriormente. Las muestras se clasificaron como malignas o benignas usando análisis histopatológico convencional.

30

Se aisló y se purificó el ADN de las muestras usando un Mini Kit de ADN QIAamp® (Qiagen, No. de Cat. 51304) según las especificaciones del fabricante.

5 Los cebadores oligonucleotídicos purificados fueron sintetizados químicamente por Invitrogen (California, EEUU). Las secuencias de los cebadores y los tamaños esperados de los productos de PCR amplificados se listan en la Tabla 1 anterior.

Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

10 Se realizaron tres PCR separadas en cada muestra. Cada reacción tuvo un volumen total de 25µl e incluyó ADN molde, una pareja de cebadores (12s o Delección 3,4 o TNF), un kit iQ™ SYBR Green Supermix™ (Número de Catálogo 170-8882, Bio-Rad Laboratories Inc.) y agua desionizada destilada (ddH₂O). El TNF (factor de necrosis tumoral) comprendía cebadores de genes nucleares de copia única, y 12s comprendía cebadores de genoma mitocondrial total. El volumen y concentraciones para el ADN molde, cebadores y tampón de reacción se listan a continuación:

Tabla 4 Componentes de qPCR.

Reactivo	Concentración por Reacción	Volumen por Reacción
Tampón de Reacción	1X	12,5µl
Cebador (directo e inverso)	250nM	0,0625µl de cada preparación madre de 100 µmoles
ddH ₂ O	N/A	2,375.µl
ADN Molde	20ng	10,0µl
Total		25µl

15 Los parámetros de ciclado para cada amplicón se listan en la Tabla 5.

Tabla 5 Parámetros de Ciclado.

Etapas	Temperatura (°C)	Duración
1	95	3 min
2	95	30 seg
3	66 (cebadores de delección de 3,4) o 61,5 (cebadores 12s) o 61,5 (cebadores TNF)	30 seg
4	72	30 seg
5	Lectura de Placa	
6	72	10 min
7	Curva de Fusión 50°C - 110°C lectura cada 1°C	3 seg
Repetir las etapas 2-5, 44 veces para un total de 45 ciclos.		

- 5 El ciclado térmico, detección en tiempo real y análisis de las reacciones se llevó a cabo usando un Motor de ADN Opticon® 2 Sistema de Detección de Fluorescencia Continua equipado con software Intuitive Opticon Monitor™ (MJ Research Inc.). Se utilizó el método de la curva estándar para la cuantificación del ADN. Se realizó un conjunto de diluciones seriadas (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1) de los tres moldes generados por PCR purificados, un producto para la delección de 3,4, uno para los cebadores 12s, y uno para TNF. A partir de esto, se generaron tres curvas estándar diferentes que muestran el número de copias de ADNmt total (amplicón 12s-cebadores de genoma mitocondrial total), la delección de 3,4 kb, o DNA nuclear total (TNF-cebadores de gen nuclear de copia única). Los valores C_T de las muestras se convirtieron en el número de copias de ADN comparando el C_T de la muestra con el de los estándares.
- 10 La determinación de malignidad se basó en la cantidad de la delección de 3,4kb presente en la muestra normalizada como se indica por la localización del umbral de ciclo. Esta localización puede ser absoluta, como en más de 25 ciclos pero menos de 30 ciclos, o más probablemente una proporción entre el ADN mitocondrial total presente como se indica por el amplicón 12s, y la delección de 3,4kb. Esto puede expresarse como un porcentaje del ADN mitocondrial total.
- 15 Con el fin de automatizar los análisis de estas muestras, se emplearon herramientas de bioinformática. Las tres variables que se consideraron para estos análisis fueron el umbral de ciclo C_T del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), especies totales de mitocondrias que contienen los sitios de cebador específicos, y las mitocondrias que portan la delección de interés.
- 20 La Tabla 6 y la figura 7 muestran la diferencia en las puntuaciones medias de C_T para muestras de tejido maligno y tejido benigno. El valor medio de C_T para tejido normal fue 30,5889, mientras el C_T medio para tejido maligno fue 27,8533 ilustrando de esta manera una diferencia en la cantidad de ADNmt que tiene la delección de 3,4 kb en tejido de mama maligno comparado con tejido de mama normal.

Tabla 6 Valores medios para puntuaciones de C_T

Estadísticas de Grupo

	GRP	N	Media	Desviación Estd.	Error Estd. de la Media
del3,4	normal	9	30,5889	2,53897	,84632
	maligno	9	27,8533	2,52253	,84084

- 25 La Figura 8 es una curva ROC que ilustra la especificidad y sensibilidad de la delección de 3,4 kb en el ADNmt como un marcador para cáncer de mama cuando se ensaya tejido de mama. Estos resultados se obtuvieron usando un punto de corte de C_T de 29,1900. La sensibilidad del marcador a este C_T fue 77,8%, mientras la especificidad fue 77,8%.
- 30 La Tabla 7 muestra el cálculo del área bajo la curva para el presente ejemplo. Como una medida de la exactitud del ensayo.

Tabla 7 Resultados que Muestran el Área Bajo la Curva

Área Bajo la Curva

Variable(s) Resultado del Ensayo: del3,4				
Área	Error Estd. ^a	Sig. Asintótica. ^b	Intervalo de Confianza de 95% Asintótico	
			Límite Inferior	Límite Superior
,790	,112	,038	,570	1,010

^a. Bajo asunción no paramétrica

- 35 ^b. Hipótesis nula: área real = 0,5

La determinación del punto de corte de C_T de 29,1900 se muestra en la tabla 8 siguiente. Los resultados listados en la tabla 8 muestran que un punto de corte de C_T de 29,1900 proporcionó la mayor sensibilidad y especificidad al 78% y 78% respectivamente.

Tabla 8: Determinación de punto de corte de C_T .**Coordenadas de la Curva**

Variable(s) Resultado del Ensayo: del3,4

Positivo si es Menor de o Igual a ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
24,6000	,000	,000
25,6800	,111	,000
25,7700	,222	,000
25,9250	,333	,000
26,2050	,444	,000
26,8400	,556	,000
27,4800	,556	,111
28,1600	,556	,222
28,8800	,667	,222
29,1900	,778	,222
29,4600	,778	,333
29,8750	,778	,444
30,5850	,778	,556
31,2200	,778	,667
31,5000	,889	,667
31,7650	,889	,778
32,9900	1,000	,778
34,3350	1,000	,889
35,6400	1,000	1,000

^a El valor de punto de corte más bajo es el valor de ensayo mínimo observado menos 1, y el valor de punto de corte más alto es el valor de ensayo máximo observado más 1. Todos los demás valores de punto de corte son los promedios de dos valores de ensayo ordenados consecutivos.

Ejemplo 5: La Deleción de 3,4kb en el Fluido por Masaje de Próstata de Individuos con Cáncer de Próstata Comparado con el Fluido de aquellos sin Evidencia Histológica de Cáncer de Próstata

Se recogieron cuarenta muestras de fluido de masaje de próstata por urólogos de pacientes a los que se diagnosticó posteriormente cáncer de próstata o que no mostraron evidencia histológica de cáncer de próstata después de un procedimiento de biopsia con aguja de próstata. La muestra se depositó en un IsoCode Card™ (Schleicher & Shuell), se secó y se extrajo según el protocolo del fabricante. Todos los extractos de ADN se cuantificaron usando un Espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000 y la concentración de ADN se normalizó a 2ng/ul. Cada muestra se amplificó según los parámetros siguientes:

1X iQ SYBR Green Supermix™ (Bio-Rad P/N 170-8880)
 150nmoles de cebador directo
 (5'-TAGACTACGTACATACTAACCCTACTCCTA-3') (SEQ ID NO: 2).
 150 nmoles de cebador inverso
 5 (5'-GAGGTAGGATTGGTGCTGT-3') (SEQ ID NO: 3)
 20 ng de ADN molde
 en una reacción de 25ul.

Las reacciones se sometieron a ciclado en un Motor de ADN Opticon™ 2 (Bio-Rad Canadá) según el protocolo siguiente:

- 10 1. 95°C durante 3 minutos
- 2. 95°C durante 30 segundos
- 3. 66°C durante 30 segundos
- 4. 72°C durante 30 segundos
- 5. Lectura de la Placa
- 15 6. Repetir las etapas 2-5 44 veces
- 7. 72°C durante 10 minutos
- 8. Curva de Fusión de 50°C a 105°C, lectura cada 1°C, espera durante 3 segundos
- 9. 10°C Espera

Tabla 9 Resultados que muestran los Valores medios de C_T para el Ensayo de Fluido por Masaje de Próstata

20 Estadísticas de Grupo

	Grupo	N	Media	Desviación Estd.	Error Estd. de la media
DEL3,4	benigno	25	37,1869	3,18495	,63699
	maligno	15	33,7712	3,98056	1,02778

Las Tablas 9 y 10 muestran una diferencia significativa entre los valores medios de C_T obtenidos para los grupos de muestra benigna y muestra maligna ($p=0,005$).

Tabla 10 Resultados que Muestran Diferencia ($p=0,005$) para los valores de C_T de las muestras.

25

Ensayo de Muestras Independiente

		Ensayo de Levene para Igualdad de Varianzas		ensayo t para Igualdad de medias						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2 colas)	Diferencia Media	Error Estd. de la Diferencia	Intervalo de Confianza de 95% de la Diferencia	
									Inferior	Superior

		Ensayo de Levene para Igualdad de Varianzas		ensayo t para Igualdad de medias						
				Intervalo de Confianza de 95% de la Diferencia						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2 colas)	Diferencia Media	Error Est. de la Diferencia	Inferior	Superior
DEL3,4	Asunción de Varianzas Iguales	1,251	,270	2.989	38	,005	3,41570	1,14283	1,10217	5,72923
	Sin asunción de varianzas iguales			2.825	24,696	,009	3,41570	1,20917	,92382	5,90758

5 La Figura 5 es una curva Característica Operativa del Receptor (ROC) que ilustra la especificidad y sensibilidad de la delección de 3,4 kb en el ADNmt como un marcador para cáncer de próstata cuando se ensaya fluido por masaje de próstata. Estos resultados se obtuvieron usando un punto de corte de C_T de 37,3683. La sensibilidad del marcador a este C_T es 87%, mientras la especificidad es 64%.

La exactitud del ensayo depende de cómo separe de bien el ensayo el grupo que se está ensayando en aquellos con y sin cáncer de próstata. La exactitud se mide por el área bajo la curva ROC. La Tabla 11 muestra el cálculo del área bajo la curva para el presente ejemplo.

Tabla 11 Resultados que Muestran el Área Bajo la Curva ROC

10

Área Bajo la Curva

Variable(s) de Resultado del Ensayo: DEL 3,4				
Área	Error Estd. ^a	Sig. Asintótica ^b	Intervalo de Confianza de 95% Asintótico	
			Límite Inferior	Límite Superior
,768	,074	,005	,622	,914

^a. Bajo la asunción no paramétrica

^b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Tabla 12 Determinación de Especificidad y Sensibilidad

15

Coordenadas de la Curva

Variable (s) de Resultado del Ensayo: DEL3,4

Positivo si es Menor de o Igual a ^a	Sensibilidad	1 -Especificidad
26,2992	,000	,000
27,3786	,067	,000

ES 2 484 044 T3

Positivo si es Menor de o Igual a ^a	Sensibilidad	1 -Especificidad
28,2484	,133	,000
29,5193	,200	,000
30,1757	,200	,040
30,4580	,200	,080
30,5980	,267	,080
31,5709	,333	,080
32,5712	,333	,120
32,9500	,333	,160
33,3314	,400	,160
33,6547	,467	,160
33,9247	,533	,160
34,3554	,633	,200
34,9056	,533	,240
35,4650	,533	,280
35,9172	,533	,320
36,0648	,600	,320
36,3616	,667	,320
36,6421	,733	,320
36,8531	,733	,360
37,1188	,800	,360
37,3683	,867	,380
37,5200	,867	,400
37,8341	,867	,440
38,2533	,867	,480
38,5198	,933	,480
38,6519	,933	,520

Positivo si es Menor de o Igual a ^a	Sensibilidad	1 -Especificidad
38,8552	,933	,580
39,1258	,933	,600
39,2734	,933	,640
39,4952	,933	,680
39,7323	1,000	,680
39,8956	1,000	,720
41,0000	1,000	1,000

El valor de punto de corte más bajo es el valor de ensayo mínimo observado -1, y el valor de punto de corte más alto es el valor de ensayo máximo observado más 1. Todos los demás valores de punto de corte son los promedios de dos valores de ensayo observados, ordenados consecutivos.

- 5 La determinación del punto de corte de C_T de 37,3683 se muestra en la tabla 12 anterior. Los resultados listados en la tabla 12 ilustran que un punto de corte de C_T de 37,3683 proporcionó la sensibilidad y especificidad más altas.

Ejemplo 6: La Deleción de 3,4kb en la Orina de Individuos con Cáncer de Próstata Comparada con el fluido de aquellos sin Evidencia Histológica de Cáncer de Próstata

- 10 Se recogieron muestras de orina de 5 pacientes a los que se había diagnosticado cáncer de próstata y 5 que se habían sometido a un procedimiento de biopsia con aguja que fue incapaz de detectar malignidad de próstata. Estas muestras se recogieron después de un examen rectal digital (DRE) para facilitar la recolección de células de la próstata.

- 15 Después de la recepción de las muestras, se retiró una alícuota de 5ml y se centrifugaron 2mls a 14.000 x g para formar un sedimento. El sobrenadante se retiró y desechó. Los sedimentos se resuspendieron en 200ul de disolución salina tamponada con fosfato. Tanto el sedimento resuspendido como la muestra de orina completa se sometieron a un procedimiento de extracción de ADN usando el Mini Kit de ADN QiaAMP™ (Qiagen P/N 51304) según las directrices del fabricante. Los extractos de ADN resultantes se cuantificaron usando un Espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000 y se normalizaron a una concentración de 0,1ng/ul.

- 20 Las muestras se analizaron por PCR cuantitativa en tiempo real con los cebadores específicos de la deleción de 3,4kb según lo siguiente:

- 1X iQ SYBR Green Supermix™ (Bio-Rad P/N 170-8880)
- 100 nmoles de cebador directo (5'-TAGACTACGTACATACTAACCCTACTCCTA-3') (SEQ ID NO: 2)
- 100 nmoles de cebador inverso (5'-GAGGTAGGATTGGTGTGT-3') (SEQ ID NO: 3)
- 1 ng de ADN molde
- 25 en una reacción de 25ul.

Las reacciones se sometieron a ciclado en un Motor de ADN Opticon™ 2 (Bio-Rad Canadá) según el protocolo siguiente:

- 1. 95°C durante 3 minutos
- 2. 95°C durante 30 segundos
- 30 3. 69°C durante 30 segundos
- 4. 72°C durante 30 segundos
- 5. Lectura de la Placa

6. Repetir las etapas 2-5 44 veces

7. 72°C durante 10 minutos

8. Curva de Fusión de 50°C a 105°C, lectura cada 1°C, espera durante 3 segundos

9. 10°C Espera

5 *Tabla 13 Valores medios para las puntuaciones C_T*

Estadísticas de Grupos

	GRPfluido38	N	Media	Desviación Estd.	Error Estd. de la Media
CTf3,4	Benigno	5	33,2780	1,10900	,49596
	Maligno	5	30,6980	2,55767	1,14382

Las Tablas 13 y 14 muestran una diferencia significativa entre los valores medios de C_T obtenidos para los grupos de muestra benigna y muestra maligna (p=0,005).

10 *Tabla 14 Resultados que Muestran Diferencia (p=0,005) para valores de C_T de las muestras.*

Ensayo de Muestras Independiente

		Ensayo de Levene para Igualdad de Varianzas		ensayo t para Igualdad de Medias						
				Intervalo de Confianza de 95% de la Diferencia						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2 colas)	Diferencia Media	Error Estd. de la Diferencia	Inferior	Superior
CTf	Asunción de varianzas iguales	1,272	,292	2.069	8	,072	258.000	1,24672	-,29494	5,45494
	Sin asunción de varianzas iguales			2.069	5,453	,089	258.000	1,24672	-,54639	5,70639

15 La Figura 6 es una curva Característica Operativa del Receptor (ROC) que ilustra la especificidad y sensibilidad de la delección de 3,4 kb en el ADNmt como un marcador para el cáncer de próstata cuando se ensaya orina. Estos resultados se obtuvieron usando un punto de corte de C_T de 31,575. La sensibilidad del marcador a este C_T es 80%, mientras la especificidad es 100%.

La determinación del punto de corte de C_T de 31,575 se muestra en la tabla 15. Los resultados listados en la tabla 15 muestran que un punto de corte de C_T de 31,575 proporcionó la sensibilidad y especificidad más altas.

Tabla 15: Determinación del punto de corte de C_T .

Coordenadas de la Curva

Variable(s) Resultado de Ensayo; CTf

Positivo si es Menor que o Igual a ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
26,2900	,000	,000
28,4950	,200	,000
30,3850	,400	,000
31,0800	,600	,000
31,5750	,800	,000
32,1400	,800	,200
32,8150	,800	,400
33,8700	,800	,600
34,3350	,800	,800
34,3550	1,000	,800
35,3700	1,000	1,000

- 5 a. El valor de punto de corte más bajo es el valor de ensayo mínimo observado -1, y el valor de punto de corte más alto es el valor de ensayo máximo observado más 1. Todos los demás valores de punto de corte son los promedios de dos valores de ensayo observados, ordenados consecutivos.

Ejemplo 7: Detección de la Secuencia de 3,4kb Delecionada Re-circularizada en Tejido de Próstata Maligno y Benigno

- 10 En este ejemplo, se ensayó la cantidad de moléculas de mtADN con deleción de 3,4 kb re-circularizadas en muestras como un indicador para cáncer de próstata. Como se ha mencionado anteriormente, la secuencia de 3,4 kb, después de la deleción, puede reformarse como una molécula de ADNmt circular. La amplificación de una región diana del sublimón de ADNmt con deleción de 3,4 kb se llevó a cabo usando una pareja de cebadores (SEQ ID NOS: 9 y 10). El cebador directo (SEQ ID NO: 9), se superpone con el sitio de reunión de los extremos de la secuencia de 3,4 kb.

- 15 El tejido de próstata era biopsias con aguja de tejido de próstata fijadas con formalina e incluidas en parafina.

La configuración de reactivos para este ejemplo fue como sigue:

250nmoles de cada cebador

12,5ul de 2X mezcla de reacción,

20ng (10ul de 2ng/ul) de molde en un volumen de reacción de 25 ul.

- 20 Los parámetros de ciclado fueron como sigue:

1. 95 grados Celsius durante 3 minutos
2. 95 grados Celsius durante 30 segundos
3. 62 grados Celsius durante 30 segundos
4. 72 grados Celsius durante 30 segundos

5. Lectura de la Placa
6. Repetir las etapas 2-5 44 veces
7. 72 grados durante 10 minutos
8. Curva de Fusión de 50-100 grados, lectura cada 1 grado durante 3 segundos
- 5 9. 4 grados ESPERA.

La amplificación de una región diana del sublimón de ADNmt con la deleción de 3,4 kb se llevó a cabo usando una pareja de cebadores (SEQ ID NOS: 9 y 10).

10 La Tabla 16 siguiente proporciona un resumen del ensayo llevado a cabo para la detección del 3,4 kb real delecionado en ADNmt obtenido a partir de tejido de próstata maligno y benigno. Usando una puntuación de C_T de 30,0, fue posible una identificación clara de tejido maligno y benigno. Como tal, un incremento en la cantidad de la molécula de 3,4 kb presente en una muestra fue indicativo de cáncer.

Tabla 16: Puntuaciones C_T para la Detección de Cáncer en Tejido de Próstata

Descripción	C_T
Muestra benigna 1	33,75
Muestra maligna 1	28,79
Muestra benigna 2	30,96
Muestra maligna 2	28,4
Muestra benigna 3	32,19
Muestra maligna 3	27,38

REFERENCIAS

- Birch-Machin MA, Online Conference Report (Sunburnt DNA), International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, New Scientist, 2000(a)
- Birch-Machin MA, Taylor RW, Cochran B, Ackrell BAC, Turnbull DM. *Ann Neurol* 48: 330-335, 2000(b)
- 5 Birch-Machin, M.A. (2000). Mitochondria and skin disease. *Clin Exp Dermatol*, 25, 141-6.
- Brown, M.D., et al., *Am J Humn Genet*, 60: 381-387, 1997
- Bogliolo, M, et al., *Mutagenesis*, 14: 77-82, 1999
- Chinnery PF y Turnbull DM., *Lancet* 354 (suplemento 1): 17-21, 1999
- 10 Huoponen, Kirsi, *Leber hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings*, *Neurogenetics* (2001) 3: 119-125.
- Hayward SW, Grossfeld GD, Tlsty TD, Cunha GR., *Int J Oncol* 13:35-47, 1998
- Huang GM, Ng WL, Farkas J, He L, Liang HA, Gordon D, Hood R., *Genomics* 59(2):178-86,1999
- Konishi N, Cho M, Yamamoto K, Hiasa Y. *Pathol. Int.* 47:735-747,1997
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. *Cancer J. Clin.* 49:8-31
- 15 Lee HC, Lu CY, Fahn HJ, Wei YHu. *Federation of European Biochemical Societies*, 441:292-296,1998
- Mitochondrial Research Society <http://www.mitoresearch.org/diseases.html>.
- MITOMAP: Una base de datos de genoma mt humano (www.gen.emory.edu/mitomap.html)
- Naviaux, RK., *Mitochondrial Disease- Primary Care Physican's Guide*. Psy-Ed. Corp D/B/A *Exceptional Parents Guide*: 3-10, 1997
- 20 Parrella P, Xiao Y, Fliss M, Sanchez-Cespedes M, Mazzarelli P, Rinaldi M, Nicol T, Gabrielson E, Cuomo C, Cohen D, Pandit S, Spencer M, Rabitti C, Fazio VM, Sidransky D: Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates. *Cancer Res* 2001, 61:7623-7626
- Polyak Y, et al., *Nature Genet.* 20 (3):291-293, 1998
- Seidman, M.D. et al., *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg.*, 123: 1039-1045, 1997
- 25 Sherrat EJ, Thomas AW, Alcolado JC., *Clin. Sci.* 92:225-235,1997
- Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Mirra SS, Beal MF, Yang C, Gearing M, Salvo R, Watts RL, Juncos JL, Hansen LA, Crain BJ, Fayad M, Reckford CL, y Wallace DC., *Genomics* 17: 171-184, 993
- SpringNet - CE Connection: Screening, Diagnosis: Improving Primary Care Outcomes. Sitio en internet: <http://www.springnet.com/ce/j803a.htm>
- 30 Tan Duan-Jun et al., *Cancer Research*, 62(4): 972-6, 2002
- Taniike, M. et al., *BioChem BioPhys Res Comun*, 186: 47-53, 1992
- Valnot, Isabelle, et al., A mitochondrial cytochrome b mutation but no mutations of nuclearly encoded subunits in ubiquinol cytochrome c reductase (complex III) deficiency, *Human Genetics* (1999) 104: 460-466
- von Wurmb, N, Oehmichen, M, Meissner, C., *Mutat Res.* 422:247-254, 1998
- 35 Wallace et al., Mitochondiral DNA MUTatio Assocated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy, *Science*, 1427-1429
- Wei YH. *Proceedings of the Nat. Sci. Council of the Republic of China* Abril 22(2):5567, 1998
- Woodwell DA. *National Ambulatory Medical Care Survey: 1997 Summary*. Advance data from vital and health statistics; no. 305. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics. 1999
- Yeh, J.J., et al., *Oncogene Journal*, 19: 2060-2066, 2000
- 40 Zhang et al., Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual, *FEBS Lett*, 297,34-38 1992
- Zhang, C., et al., *BioChem. BioPhys. Res. Comun.*, 195: 1104-1110, 1993

Zhu et al., Cancer detection and prevention, 28(2):119-26, 2004

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genesis Genomics Inc.

5 <120> Delección de 3,4 KB en el ADN Mitocondrial para Uso en la Detección de Cáncer

<130> 102222/00031

<160> 10

10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 3379

15

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

cctaaaccta ctccaatgct aaaactaatc gtcccaacaa ttatattact accactgaca      60
tgactttcca aaaaacacat aatttgaatc aacacaacca cccacagcct aattattagc      120
atcatccctc tactatTTTT taaccaaate aacaacaacc tatttagctg ttccccaacc      180
ttttcctccg accccctaac aacccccctc ctaataactaa ctacctgact cctaccctc      240
acaatcatgg caagccaacg ccacttatcc agtgaaccac tatcacgaaa aaaactctac      300
ctctctatac taatctccct acaaactctc ttaattataa cattcacagc cacagaacta      360
atcatatTTT atatcttctt cgaaaccaca cttatccccca ccttggctat catcaccgga      420
tgaggcaacc agccagaacg cctgaacgca ggcacatact tcctattcta caccctagta      480
ggctcccttc ccctactcat cgcactaatt tacactcaca acaccctagg ctactaaac      540
attctactac tcaactctac tgcccaagaa ctatcaaact cctgagccaa caacttaata      600
tgactagctt acacaatagc ttttatagta aagatacctc tttacggact ccacttatga      660
ctccctaaag ccatgtcga agcccccatc gctgggtcaa tagtacttgc cgcagtactc      720
ttaaactag gggctatgg tataatacgc ctcacactca ttctcaacc cctgacaaaa      780
cacatagcct accccttctt tgtactatcc ctatgaggca taattataac aagctccatc      840
tgcctacgac aaacagacct aaaatcgctc attgcatact cttcaatcag ccacatagcc      900
ctcgtagtaa cagccattct catccaaacc ccctgaagct tcaccggcgc agtcattctc      960
ataatcgccc acgggcttac atcctcatta ctattctgcc tagcaaactc aaactacgaa     1020
cgcactcaca gtcgcatcat aatcctctct caaggacttc aaactctact cccactaata     1080
gctTTTTgat gacttctagc aagcctcgtt aacctcgcct tccccccac tattaaccta     1140
ctgggagaac tctctgtgct agtaaccacg ttctcctgat caaatatcac tctcctactt     1200
acaggactca acatactagt cacagcccta tactccctct acatatttac cacaacacaa     1260
tggggctcac tcaccacca cattaacaac ataaaacctt cattcacagc agaaaacacc     1320
ctcatgttca tacacctatc cccattctc ctccatccc tcaaccccgga catcattacc     1380
gggTTTTcct cttgtaaata tagtttaacc aaaacatcag attgtgaatc tgacaacaga     1440
    
```

ES 2 484 044 T3

ggcttacgac cccttattta ccgagaaagc tcacaagaac tgctaactca tgcccccatg 1500
 tctaacaaca tggctttctc aactttttaa ggataacagc tatccattgg tcttaggccc 1560
 caaaaatttt ggtgcaactc caaataaaag taataacat gcacactact ataaccaccc 1620
 taaccctgac ttccctaatt cccccatcc ttaccaccc cgttaaccct aacaaaaaaaa 1680
 actcataccc ccattatgta aaatccattg tcgcatccac ctttattatc agtctcttcc 1740
 ccacaacaat attcatgtgc ctagaccaag aagttattat ctcgaactga cactgagcca 1800
 caacccaaac aaccagctc tccctaagct tcaaactaga ctacttctcc ataatttca 1860
 tccctgtagc attgttcggt acatgggtcca tcatagaatt ctactgtga tatataaact 1920
 cagacccaaa cattaatcag ttcttcaaat atctactcat ctctctaatt accatactaa 1980
 tcttagttac cgctaacaac ctattccaac tgttcatcgg ctgagagggc gtaggaatta 2040
 tatccttctt gctcatcagt tgatgatagc cccgagcaga tgccaacaca gcagccattc 2100
 aagcaatcct atacaaccgt atcggcgata tcggtttcat cctcgcctta gcatgattta 2160
 tctacactc caactcatga gaccacaac aaatagccct tctaaacgct aatccaagcc 2220
 tcacccact actaggcctc ctctagcag cagcaggcaa atcagcccaa ttaggtctcc 2280
 acccctgact ccctcagcc atagaaggcc ccacccagc ctcagcccta ctccactcaa 2340
 gcactatagt tgtagcagga atcttcttac tcatccgctt ccaccccta gcagaaaata 2400
 gccactaat ccaaactcta aactatgct taggcgctat caccactctg ttcgcagcag 2460
 tctgcgccct tacacaaaat gacatcaaaa aaatcgtagc cttctccact tcaagtcaac 2520
 taggactcat aatagttaca atcggcatca accaaccaca cctagcattc ctgcacatct 2580
 gtacccacgc cttcttcaaa gccatactat ttatgtgctc cgggtccatc atccacaacc 2640
 ttaacaatga acaagatatt cgaaaaatag gaggactact caaaaccata cctctcactt 2700
 caacctccct caccattggc agcctagcat tagcaggaat acctttctc acaggtttct 2760
 actccaaga ccacatcatc gaaaccgcaa acatatacata cacaaacgcc tgagccctat 2820
 ctattactct catcgctacc tcctgacaa gcgcctatag cactcgaata attcttctca 2880
 ccctaacagg tcaacctcgc ttccccacc ttactaacat taacgaaaat aacccaccc 2940
 tactaaaccc cattaaacgc ctggcagccg gaagcctatt cgcaggattt ctactacta 3000
 acaacatttc ccccgcatcc cccttcaaa caacaatccc cctctaccta aaactcacag 3060
 ccctcgctgt cactttcta ggacttctaa cagccctaga cctcaactac ctaaccaaca 3120
 aacttaaaat aaaatcccca ctatgcacat tttatttctc caacatactc ggattctacc 3180
 ctagcatcac acaccgcaca atcccctatc taggccttct tacgagccaa aacctgcccc 3240
 tactctcct agacctaacc tgactagaaa agctattacc taaaacaatt tcacagcacc 3300
 aaatctccac ctccatcatc acctcaacc aaaaaggcat aattaaactt tacttctct 3360

	ctttcttctt cccactcat	3379
	<210> 2	
	<211> 30	
5	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de detección de la deleción de 3,4 kb	
10	<400> 2	
	tagactacgt acataactaac cctactccta	30
	<210> 3	
15	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
20	<223> cebador inverso de detección de la deleción de 3,4 en el ADNmt	
	<400> 3	
	gaggtaggat tgggtgctgt	19
25	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
30	<220>	
	<223> cebador directo de genoma de ADNmt	
	<400> 4	
35	cgttccagtg agttcacccct c	21
	<210> 5	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
40	<220>	
	<223> cebador inverso de genoma de ADNmt	
	<400> 5	
45	cactctttac gccggcttct att	23
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de gen nuclear de TNF	
55	<400> 6	
	cctgccccaa tccctttatt	20
	<210> 7	
	<211> 21	
60	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
65	<223> cebador inverso de gen nuclear de TNF	

<400> 7
 ggtttcgaag tgggtggtctt g 21

5 <210> 8
 <211> 16569
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

10 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (3107)..(3107)
 <223> n es a, c, g, ó t

15 <300>
 <308> AC_000021
 <309> 07-03-2007
 <313> (1)..(16569)

<400> 8
 gatcacaggt ctatcacctt attaaccact cacgggagct ctccatgcat ttgggtatttt 60
 cgtctggggg gtatgcacgc gatagcattg cgagacgctg gagccggagc accctatgtc 120
 gcagtatctg tctttgattc ctgocctcct ctattattta tcgcacctac gttcaatatt 180
 acaggcgaac atacttacta aagtgtgta attaattaat gcttgtagga cataataata 240
 acaattgaat gtctgcacag ccactttcca cacagacatc ataacaaaaa atttccacca 300
 aacccccct cccccgcttc tggccacagc acttaaacac atctctgcca aacccccaaa 360
 acaaagaacc ctaacaccag cctaaccaga tttcaaattt tatcttttgg cggtagtcac 420
 ttttaacagt cccccccaa ctaacacatt attttcccct cccactccca tactactaat 480
 ctcatcaata caacccccgc ccactcctacc cagcacacac acaccgctgc taacccccata 540
 ccccgaacca accaaacccc aaagacacc cccacagttt atgtagctta cctcctcaaa 600
 gcaatacact gaaaatgttt agacgggctc acatcacccc ataaacaaat aggtttggtc 660
 cttagccttc tattagctct tagtaagatt acacatgcaa gcatccccgt tccagtgagt 720
 tcaccctcta aatcaccag atcaaaagga acaagcatca agcacgcagc aatgcagctc 780
 aaaacgctta gcctagccac acccccacgg gaaacagcag tgattaacct ttagcaataa 840
 acgaaagttt aactaagcta tactaacccc agggttggtc aatttcgtgc cagccaccgc 900
 ggtcacacga ttaacccaag tcaatagaag cggcgtaaa gagtgtttta gatcaccccc 960
 tccccataa agctaaaact cacctgagtt gtaaaaaact ccagttgaca caaatagac 1020
 tacgaaagtg gctttaacat atctgaacac acaatagcta agacccaaac tgggattaga 1080
 20 taccceacta tgcttagccc taaacctcaa cagttaaact aacaaaactg ctgcgccagaa 1140

ES 2 484 044 T3

cactacgagc cacagcttaa aactcaaagg acctggcggg gcttcatatc cctctagagg 1200
 agcctgttct gtaatcgata aaccccgatc aacctcacca cctcttgctc agcctatata 1260
 ccgccatctt cagcaaacc t gatgaaggc tacaagtaa gcgcaagtac ccacgtaaag 1320
 acgttaggtc aaggtgtagc ccatgagggt gcaagaaatg ggctacattt tctaccccag 1380
 aaaactacga tagcccttat gaaacttaag ggtcgaagggt ggatttagca gtaaactaag 1440
 agtagagtgc ttagttgaac agggccctga agcgcgtaca caccgcccgt caccctcctc 1500
 aagtatactt caaaggacat ttaactaaaa cccctacgca tttatataga ggagacaagt 1560
 cgtaacatgg taagtgtact ggaaagtgca cttggacgaa ccagagtgta gcttaacaca 1620
 aagcacccaa cttacactta ggagatttca acttaacttg accgctctga gctaaaccta 1680
 gccccaaacc cactccacct tactaccaga caaccttagc caaacattt acccaaataa 1740
 agtataggcg atagaaattg aaacctggcg caatagatat agtaccgcaa gggaaagatg 1800
 aaaaattata accaagcata atatagcaag gactaacccc tataccttct gcataatgaa 1860
 ttaactagaa ataactttgc aaggagagcc aaagctaaga cccccgaaac cagacgagct 1920
 acctaagaac agctaaaaga gcacaccctg ctatgtagca aaatagtggg aagatttata 1980
 ggtagaggcg acaaacctac cgagcctggg gatagctggg tgtccaagat agaactctag 2040
 ttcaacttta aatttgccca cagaaccctc taaatcccct tgtaaattta actgttagtc 2100
 caaagaggaa cagctctttg gacactagga aaaaaccttg tagagagagt aaaaaattta 2160
 acacccatag taggcctaaa agcagccacc aattaagaaa gcggtcaagc tcaacacca 2220
 ctacctaaaa aatcccaaac atataactga actcctcaca cccaattgga ccaatctatc 2280
 acctataga agaactaatg ttagtataag taacatgaaa acattctcct ccgcataagc 2340
 ctgcgtcaga ttaaaact gaactgacaa ttaacagccc aatatctaca atcaaccaac 2400
 aagtcattat taccctcact gtcaacccaa cacaggcatg ctcataagga aaggttaaaa 2460
 aaagtaaaag gaactcggca aatcttaccg cgctgttcta ccaaaaacat cacctctagc 2520
 atcaccagta ttagaggcac cgctgcca gtgacacatg tttaacggcc gcggtaccct 2580
 aaccgtgcaa aggtagcata atcacttgtt ccttaaataag ggacctgtat gaatggctcc 2640
 acgagggttc agctgtctct tacttttaac cagtgaaatt gacctgcccg tgaagaggcg 2700
 ggcataaacac agcaagacga gaagacccta tggagcttta atttattaat gcaaacagta 2760
 cctaacaaac ccacagggtcc taaactacca aacctgcatt aaaaatttcg gttggggcga 2820
 cctcggagca gaaccaacc tccgagcagt acatgctaag acttcaccag tcaaagcgaa 2880
 ctactatact caattgatcc aataacttga ccaacggaac aagttaccct agggataaca 2940
 gcgcaatcct attctagagt ccatatcaac aatagggttt acgacctcga tgttgatca 3000
 ggacatcccg atgggtgcagc cgctattaaa ggttcgtttg ttcaacgatt aaagtccctac 3060
 gtgatctgag ttcagaccgg agtaatccag gtcggtttct atctacnttc aaattcctcc 3120

ES 2 484 044 T3

ctgtacgaaa ggacaagaga aataaggcct acttcacaaa ggccttccc ccgtaaataga 3180
 tatcatctca acttagtatt ataccacac ccaccaaga acagggtttg ttaagatggc 3240
 agagcccggg aatcgcataa aacttaaaac tttacagtca gaggttcaat tcctcttctt 3300
 aacaacatac ccatggccaa cctcctactc ctcatgtac ccattctaata cgcaatggca 3360
 ttctaatagc ttaccgaacg aaaaattcta ggctatatac aactacgcaa aggcccaaac 3420
 gttgtaggcc cctacgggct actacaacc ttcgctgacg ccataaaact cttcaccaaa 3480
 gagcccctaa aaccggccac atctaccatc accctctaca tcaccgcccc gaccttagct 3540
 ctaccatcg ctcttctact atgaaccccc ctccccatac ccaacccctt ggtcaacctc 3600
 aacctaggcc tcctatttat tctagccacc tctagcctag ccgtttactc aatcctctga 3660
 tcagggtgag catcaaactc aaactacgcc ctgatcggcg cactgcgagc agtagcccaa 3720
 acaatctcat atgaagtac cctagccatc attctactat caacattact aataagtggc 3780
 tcctttaacc tctccaccct tatcacaaca caagaacacc tctgattact cctgccatca 3840
 tgacccttgg ccataatatg atttatctcc aactagcag agaccaaccg aacccttctc 3900
 gaccttgccg aaggggagtc cgaactagtc tcaggcttca acatcgaata cgccgcaggc 3960
 cccttggccc tattcttcat agccgaatac acaaacatta ttataataaa caccctcacc 4020
 actacaatct tcctaggaac aacatatgac gactctccc ctgaactcta cacaacatat 4080
 tttgtcacca agaccctact tctaacctcc ctgttcttat gaattcgaac agcatacccc 4140
 cgattccgct acgaccaact catacacctc ctatgaaaaa acttcctacc actcaccta 4200
 gcattactta tatgatatgt ctccataccc attacaatct ccagcattcc ccctcaaacc 4260
 taagaaatat gtctgataaa agagttactt tgatagagta aataatagga gcttaaacc 4320
 ccttatttct aggactatga gaatcgaacc catccctgag aatccaaaat tctccgtgcc 4380
 acctatcaca ccccatccta aagtaaggtc agctaaataa gctatcgggc ccatacccgc 4440
 aaaatggttg ttataccctt cccgtactaa ttaatccctt ggccaaccg gtcattctact 4500
 ctaccatctt tgcaggcaca ctcatcacag cgctaagctc gactgattt tttacctgag 4560
 taggcctaga aataaacatg ctagctttta ttccagttct aaccaaaaaa ataaaccctc 4620
 gttccacaga agctgccatc aagtatttcc tcacgcaagc aaccgcatcc ataatecttc 4680
 taatagctat cctcttcaac aatatactct ccggacaatg aaccataacc aatactacca 4740
 atcaatactc atcattaata atcataatag ctatagcaat aaaactagga atagcccctt 4800
 ttcacttctg agtcccagag gttacccaag gcaccctct gacatccggc ctgcttcttc 4860
 tcacatgaca aaaactagcc cccatctcaa tcatatacca aatctctccc tcaactaacg 4920
 taagccttct cctcactctc tcaatcttat ccacatagc aggcagttga ggtggattaa 4980
 accaaacca gctacgcaa atcttagcat actcctcaat taccacata ggatgaataa 5040

ES 2 484 044 T3

tagcagttct accgtacaac cctaacataa ccattcttaa tttaactatt tatattatcc 5100
taactactac cgcattccta ctactcaact taaactccag caccacgacc ctactactat 5160
ctcgcacctg aaacaagcta acatgactaa cacccttaat tccatccacc ctctctctcc 5220
taggaggcct gcccccgcta accggctttt tgcccaaagt ggccattatc gaagaattca 5280
caaaaaacaa tagcctcatc atccccacca tcatagccac catcaccctc cttaacctct 5340
acttctacct acgcctaate tactccacct caatcacact actccccata tctaacaacg 5400
taaaaataaa atgacagttt gaacatacaa aaccaccccc attcctcccc aactcatcgc 5460
cccttaccac gctactccta cctatctccc cttttatact aataatctta tagaaattta 5520
ggttaaatac agaccaagag ctttcaaagc cctcagtaag ttgcaatact taatttctgt 5580
aacagctaag gactgcaaaa cccactctg catcaactga acgcaaatca gccactttaa 5640
ttaagctaag cccttactag accaatggga cttaaacca caaacactta gttaacagct 5700
aagcaccta atcaactggc ttcaatctac ttctcccgcc gccgggaaaa aaggcgggag 5760
aagccccggc aggtttgaag ctgcttcttc gaatttgcaa ttcaatatga aaatcacctc 5820
ggagctggta aaaagaggcc taaccctgt ctttagattt acagtccaat gcttactca 5880
gccatthtac ctccccca ctgatgttcg ccgaccgttg actattctct acaaaccaca 5940
aagacattgg aacactatac ctattattcg gcgcattgagc tggagtcta ggcacagctc 6000
taagcctcct tattcgagcc gagctgggccc agccaggcaa ccttctaggt aacgaccaca 6060
tctacaacgt tatcgtcaca gcccatgcat ttgtaataat cttcttcata gtaataccca 6120
tcataatcgg aggttttggc aactgactag ttccccta atcgggtgcc cccgatatgg 6180
cgtttccccg cataaacaac ataagcttct gactcttacc tccctctctc ctactcctgc 6240
tcgcatctgc tatagtggag gccggagcag gaacagggtg aacagtctac cctcccttag 6300
caggaacta ctcccacct ggagcctccg tagacctaac catcttctcc ttacacctag 6360
caggtgtctc ctctatctta ggggccatca atttcatcac aacaattatc aatataaaac 6420
ccctgccat aocccaatac caaacgcccc tcttcgtctg atccgtcta atcacagcag 6480
tctacttct cctatctctc ccagtccctag ctgctggcat cactatacta ctaacagacc 6540
gcaacctcaa caccacctc ttcgaccccg ccggaggagg agacccatt ctataccaac 6600
acctattctg atttttcggc caccctgaag tttatattct tatcctacca ggcttcggaa 6660
taatctccca tattgtaact tactactccg gaaaaaaaga accatttggga tacataggta 6720
tggctctgagc tatgatatac attggcttcc tagggtttat cgtgtgagca caccatatac 6780
ttacagtagg aatagacgta gacacacgag catatttcac ctccgctacc ataactcatc 6840
ctatccccac cggcgtcaaa gtatttagct gactcgccac actccacgga agcaatatga 6900
aatgatctgc tgcagtgtc tgagccctag gattcatctt tcttttcacc gtaggtggcc 6960
tgactggcat tgtattagca aactcatcac tagacatcgt actacacgac acgtactacg 7020

ES 2 484 044 T3

ttgtagccca cttccactat gtcctatcaa taggagctgt atttgccatc ataggaggct 7080
 tcattcactg atttccccta ttctcaggct acaccctaga ccaaacctac gccaaaatcc 7140
 atttcactat catattcadc ggcgtaaate taactttctt cccacaacac tttctcggcc 7200
 tatccggaat gccccgacgt tactcggact accccgatgc atacaccaca tgaaacatcc 7260
 tatcatctgt aggcctcattc atttctctaa cagcagtaat attaataatt ttcattgattt 7320
 gagaagcctt cgcttcgaag cgaaaagtcc taatagtaga agaaccctcc ataaacctgg 7380
 agtgactata tggatgcccc ccaccctacc acacattcga agaaccctga tacataaaat 7440
 ctagacaaaa aaggaaggaa tcgaaccccc caaagctggt ttcaagccaa ccccatggcc 7500
 tccatgactt tttcaaaaag gtattagaaa aaccatttca taactttgtc aaagttaaatt 7560
 tataggctaa atcctatata tcttaattggc acatgcagcg caagtaggtc tacaagacgc 7620
 tacttcccc atcatagaag agcttatcac ctttcatgat cacgccctca taatcatttt 7680
 ccttatctgc ttccatgtcc tgtatgcctt tttcctaaca ctcaacaaca aactaactaa 7740
 tactaacatc tcagacgctc aggaaataga aaccgtctga actatcctgc ccgccatcat 7800
 cctagtcttc atcgccctcc catccctacg catcctttac ataacagacg aggtcaacga 7860
 tccctccctt accatcaaat caattggcca ccaatggtac tgaacctacg agtacaccga 7920
 ctacggcgga ctaatcttca actcctacat acttccccca ttattcctag aaccaggcga 7980
 cctgcgactc cttgacgctg acaatcgagt agtactcccg attgaagccc ccattcgtat 8040
 aataattaca tcacaagacg tcttgactc atgagctgtc cccacattag gcttaaaaac 8100
 agatgcaatt cccggacgctc taaaccaaac cactttcacc gctacacgac cgggggtata 8160
 ctacgggcaa tgctctgaaa tctgtggagc aaaccacagt ttcattgcca tcgtcctaga 8220
 attaattccc ctaaaaatct ttgaaatagg gcccgattt accctatagc acccctcta 8280
 cccctctag agcccactgt aaagctaact tagcattaac cttttaagtt aaagattaag 8340
 agaaccaaca cctctttaca gtgaaatgcc ccaactaaat actaccgtat ggcccacat 8400
 aattaccccc atactoctta cactattcct catcacccea ctaaaaatat taaacacaaa 8460
 ctaccaccta cctccctcac caaagcccat aaaaataaaa aattataaca aaccctgaga 8520
 accaaaatga acgaaaatct gttcgcttca ttcatgccc ccacaatcct aggcctaccc 8580
 gccgcagtac tgatcattct atttccccct ctattgatcc ccacctcaa atatctcadc 8640
 aacaaccgac taatcaccac ccaacaatga ctaatcaaac taacctcaa acaaatgata 8700
 accatacaca aactaaagg acgaaactga tctottatac tagtatcctt aatcattttt 8760
 attgccacaa ctaacctcct cggactcctg cctcactcat ttacaccaac cacccaacta 8820
 tctataaacc tagccatggc catcccctta tgagcgggca cagtgattat aggccttcgc 8880
 tctaagatta aaaatgcct agcccacttc ttaccacaag gcacacctac accccttatc 8940

ES 2 484 044 T3

cccatactag ttattatcga aaccatcagc ctactcattc aaccaatagc cctggccgta 9000
 cgcctaaccg ctaacattac tgcaggccac ctactcatgc acctaattgg aagegccacc 9060
 ctagcaatat caaccattaa ccttcctctt acacttatca tcttcacaat tctaattcta 9120
 ctgactatcc tagaaatcgc tgtcgcctta atccaagcct acgttttcac acttctagta 9180
 agcctctacc tgcacgacaa cacataatga cccaccaatc acatgcctat catatagtaa 9240
 aaccagccc atgacccta acagggccc tctcagcctt cctaagacc tccggcctag 9300
 ccatgtgatt tcaactccac tccataacgc tctcactact aggctacta accaacacac 9360
 taaccatata ccaatgatgg cgcgatgtaa cagagaaag cacataccaa ggccaccaca 9420
 caccacctgt ccaaaaaggc cttegatacg ggataatcct atttattacc tcagaagttt 9480
 ttttcttcgc aggatttttc tgagcctttt accactccag cctagcccct acccccctaat 9540
 taggagggca ctggcccccac acaggcatca ccccgctaaa tcccctagaa gtcccactcc 9600
 taaacacatc cgtattactc gcatcaggag tatcaatcac ctgagctcac catagtctaa 9660
 tagaaaacaa ccgaaaccaa ataattcaag cactgcttat tacaatttta ctgggtctct 9720
 attttaccct cctacaagcc tcagagtact tcgagtctcc cttcaccatt tccgacggca 9780
 tctacggctc aacatttttt gtagccacag gcttccacgg acttcacgtc attattggct 9840
 caactttcct cactatctgc ttcacccgcc aactaatatt tcactttaca tccaaacatc 9900
 actttggctt cgaagccgcc gcctgatact ggcattttgt agatgtgggt tgactatttc 9960
 tgtatgtctc catctattga tgagggtctt actcttttag tataaatagt accgtaact 10020
 tccaattaac tagttttgac aacattcaaa aaagagtaat aaacttcgcc ttaattttaa 10080
 taatcaacac cctcctagcc ttactactaa taattattac attttgacta ccacaactca 10140
 acggctacat agaaaaatcc accccttacg agtgcggtt cgaccctata tccccgcc 10200
 gcgctccctt ctccataaaa ttcttcttag tagctattac cttcttatta tttgatctag 10260
 aaattgcctt ccttttacc cttaccatgag ccctacaaac aactaacctg ccaactaatag 10320
 ttatgtcatc cctcttatta atcatcatcc tagccctaag tctggcctat gagtgactac 10380
 aaaaaggatt agactgaacc gaattggtat atagttaaa caaaacgaat gatttcgact 10440
 cattaaatta tgataatcat attacaaa tgcccctcat ttacataaat attatactag 10500
 catttaccat ctcaacttcta ggaatactag tatatcgtc acacctcata tccctccctac 10560
 tatgcctaga aggaataata ctatcgtgtt tcattatagc tactctcata accctcaaca 10620
 cccactcctt cttagccaat attgtgccta ttgccactact agtctttgcc gcctgcgaag 10680
 cagcgggtggg cctagcccta ctagtctcaa tctccaacac atatggccta gactacgtac 10740
 ataacctaaa cctactccaa tgctaaaact aatcgtcca acaattatat tactaccact 10800
 gacatgactt tccaaaaaac acataatttg aatcaacaca accaccaca gcctaattat 10860
 tagcatcatc cctctactat tttttaacca aatcaacaac aacctattta gctgttcccc 10920

ES 2 484 044 T3

aaccttttcc tccgaccccc taacaacccc cctcctaata ctaactacct gactcctacc 10980
cctcacaatc atggcaagcc aacgccactt atccagtgaa ccactatcac gaaaaaaact 11040
ctacctctct atactaatct ccctacaaat ctccttaatt ataacattca cagccacaga 11100
actaatcata ttttatatct tcttcgaaac cacacttate cccaccttgg ctatcatcac 11160
ccgatgaggc aaccagccag aacgcctgaa cgcaggcaca tacttcctat tctacaccct 11220
agtaggctcc cttcccctac tcatcgcact aatttacact cacaacaccc taggctcact 11280
aacatttcta ctactcactc tcaactgcca agaactatca aactcctgag ccaacaactt 11340
aatatgacta gcttacacaa tagcttttat agtaaagata cctctttacg gactccactt 11400
atgactccct aaagcccatg tcgaagcccc catcgcctggg tcaatagtag ttgccgcagt 11460
actcttaaaa ctaggcggct atgggtataat acgcctcaca ctcatctca accccctgac 11520
aaaacacata gcctaccctc tccttgctact atccctatga ggcataatta taacaagctc 11580
catctgccta cgacaaacag acctaaaatc gctcattgca tactcttcaa tcagccacat 11640
agccctcgta gtaacagcca ttctcatcca aacccccctga agcttcaccg gcgcagtcac 11700
tctcataatc gccacggggc ttacatcctc attactatct tgccctagcaa actcaaacta 11760
cgaacgcact cacagtcgca tcataatcct ctctcaagga cttcaaactc tactcccact 11820
aatagctttt tgatgacttc tagcaagcct cgctaacctc gccttaccct cactattaa 11880
cctactggga gaactctctg tgctagtaac caogttctcc tgatcaaata tcactctcct 11940
acttacagga ctcaacatac tagtcacagc cctatactcc ctctacatat ttaccacaac 12000
acaatggggc tcactcacc accacattaa caacataaaa ccctcattca cagagaaaa 12060
cacctcatg tcatacacc tatccccat tctcctccta tccctcaacc ccgacatcat 12120
taccgggttt tcctcttgta aatatagttt aaccaaaca tcagattgtg aatctgacaa 12180
cagaggctta cgaccctta tttaccgaga aagctcacia gaactgctaa ctcatgcccc 12240
catgtctaac aacatggctt tctcaacttt taaaggataa cagctatcca ttggctcttag 12300
gccccaaaa ttttggtgca actccaaata aaagtaataa ccatgcacac tactataacc 12360
accctaacc tgacttcctc aattcccccc atccttacca ccctcgtaa ccctaacaaa 12420
aaaaactcat accccatta tgtaaaatcc attgtgcgat ccactttat tatcagtctc 12480
ttccccacaa caatattcat gtgcctagac caagaagtta ttatctcgaa ctgacactga 12540
gccacaacc aaacaacca gctctcccta agcttcaaac tagactactt ctccataata 12600
ttcatccctg tagcattggt cgttacatgg tccatcatag aattctcact gtgatata 12660
aactcagacc caaacattaa tcagttcttc aaatatctac tcactctcct aattaccata 12720
ctaattctag ttaccgctaa caacctatc caactgttca tcggctgaga gggcgtagga 12780
attatatcct tcttgctcat cagttgatga tacgcccag cagatgcaa cacagcagcc 12840

ES 2 484 044 T3

attcaagcaa tcctatacaa cegtacggc gatatcgggt tcatectcgc cttagcatga 12900
 tttatcctac actccaactc atgagacca caacaaatag cccttctaaa cgctaatacca 12960
 agcctcacc cactactagg cctcctccta gcagcagcag gcaaatcagc ccaattaggt 13020
 ctccaccct gactcccctc agccatagaa ggccccaccc cagtctcagc cctactccac 13080
 tcaagcacta tagttgtagc aggaatcttc ttactcatcc gcttccaccc cctagcagaa 13140
 aatagcccac taatccaaac tctaacta tgcttaggcg ctatcaccac tctgttcgca 13200
 gcagtctgcg cccttacaca aatgacatc aaaaaatcg tagccttctc cacttcaagt 13260
 caactaggac tcataatagt tacaatcggc atcaaccaac cacacctagc attcctgcac 13320
 atctgtacc acgccttctt caaagccata ctatttatgt gctccgggtc catcatccac 13380
 aaccttaaca atgaacaaga tattcgaaaa ataggaggac tactcaaac catacctctc 13440
 acttcaacct ccctcacatc tggcagccta gcattagcag gaataccttt cctcacaggt 13500
 ttctactcca aagaccacat catcgaaacc gcaaacatat catacacaaa cgctgagcc 13560
 ctatctatta ctctcatcgc tacctcctg acaagcgcct atagcactcg aataattctt 13620
 ctccacctaa caggtcaacc tcgcttccc acccttacta acattaacga aaataacccc 13680
 accctactaa acccattaa acgcctggca gccggaagcc tattcgagc atttctcatt 13740
 actaacaaca tttccccgc atccccctc caaacaaca tccccctta cctaaaactc 13800
 acagccctcg ctgtcacttt cctaggactt ctaacagccc tagacctca ctacctaacc 13860
 aacaaactta aaataaaatc ccactatgc acattttatt tctccaacat actcggattc 13920
 taccctagca tcacacaccg cacaatccc tatctaggcc ttcttacgag ccaaaacctg 13980
 cccctactcc tcctagacct aacctgacta gaaaagctat tacctaaaac aatttcacag 14040
 caccaaactc ccacctccat catcacctca acccaaaaag gcataattaa actttacttc 14100
 ctctctttct tcttcccact catcctaacc ctactcctaa tcacataacc tattcccccg 14160
 agcaatctca attacaatat atacaccaac aaacaatggt caaccagtaa ctactactaa 14220
 tcaacgcca taatcataca aagccccgc accaatagga tctcccga tcaacctga 14280
 cccctctcct tcataaatta ttcagcttc tacactatta aagtttacca caaccaccac 14340
 cccatcatac tctttcaccc acagaccaa tcctacctcc atcgctaacc ccactaaaac 14400
 actaccaag acctcaacc ctgacccca tgctcagga tactcctcaa tagccatcgc 14460
 tgtagtatat ccaaagacaa ccatcattcc ccctaaataa attaaaaaaa ctattaaacc 14520
 catataacct cccccaaat tcagaataat aacacaccgc accacaccgc taacaatcaa 14580
 tactaaacc ccataaatag gagaaggctt agaagaaaac cccacaaacc ccattactaa 14640
 acccacactc aacagaaaca aagcatacat cattattctc gcacggacta caaccacgac 14700
 caatgatatg aaaaaccatc gttgtatttc aactacaaga acaccaatga cccaatagc 14760
 caaaactaac ccctaataa aattaataa ccactcattc atcgacctcc ccacccatc 14820

ES 2 484 044 T3

caacatctcc gcatgatgaa acttcggctc actccttggc gcctgcctga tcctccaaat 14880
caccacagga ctattcctag ccatgcacta ctcaccagac gcctcaaccg ccttttcac 14940
aatcgccac atcactcgag acgtaaatta tggctgaatc atccgctacc ttcacgcaa 15000
tggcgctca atattcttta tctgcctctt cctacacatc gggcgaggcc tatattacgg 15060
atcatttctc tactcagaaa cctgaaacat cggcattatc ctctgcttg caactatagc 15120
aacagccttc ataggctatg tcctcccgtg aggccaaata tcattctgag gggccacagt 15180
aattacaaac ttactatccg ccatcccata cattgggaca gacctagttc aatgaatctg 15240
aggaggctac tcagtagaca gtcccaccct cacacgattc tttaccttc acttcatctt 15300
gcccttcatt attgcagccc tagcaaacct ccacctccta ttcttgacg aaacgggatc 15360
aaacaacccc ctaggaatca cctcccattc cgataaaatc acctccacc cttactacac 15420
aatcaaagac gccctcggct tacttctctt ccttctctcc ttaatgacat taacactatt 15480
ctcaccagac ctcttaggcg acccagacaa ttataccta gccaacccct taaacacccc 15540
tccccacatc aagcccgaat gatatttctt attgcctac acaattctcc gatccgtccc 15600
taacaaacta ggaggcgtcc ttgccctatt actatccatc ctcatcctag caataatccc 15660
catcctccat atatccaaac aacaaagcat aatatttcgc ccactaagcc aatcacttta 15720
ttgactccta gccgcagacc tcctcattct aacctgaatc ggaggacaac cagtaagcta 15780
cccttttacc atcattggac aagtagcatc cgtactatac ttcacaacia tcctaatacct 15840
aataccaact atctccctaa ttgaaaacia aatactcaa tgggcctgtc cttgtagtat 15900
aaactaatac accagtcttg taaaccggag atgaaaacct tttccaagg acaaatcaga 15960
gaaaaagtct ttaactccac cattagcacc caaagctaag attctaattt aaactattct 16020
ctgttctttc atggggaagc agatttgggt accaccaag tattgactca cccatcaaca 16080
accgctatgt atttcgtaca ttactgccag ccaccatgaa tattgtacgg taccataaat 16140
acttgaccac ctgtagtaca taaaaacca atccacatca aaaccccctc cccatgctta 16200
caagcaagta cagcaatcaa ccctcaacta tcacacatca actgcaactc caaagccacc 16260
cctcaccac taggatacca acaaacctac ccacccttaa cagtacatag tacataaagc 16320
catttaccgt acatagcaca ttacagtcaa atcccttctc gtcccctatgg atgaccccc 16380
tcagataggg gtccttgac caccatctc cgtgaaatca atatcccga caagagtgt 16440
actctctcg ctccgggcc ataacacttg ggggtagcta aagtgaactg tatccgacat 16500
ctggttccta cttcagggtc ataaagccta aatagcccac acgttcccct taaataagac 16560
atcacgatg 16569

<210> 9
<211> 22
<212> ADN
<213> artificial

5

ES 2 484 044 T3

<220>

<223> Cebador directo para la detección de la secuencia de 3,4 kb delecionada en el ADNmt

<400> 9

5 **cccactcacc acctaacct ac**

22

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

10 <213> artificial

<220>

<223> Cebador inverso para la secuencia de 3,4 kb delecionada.

<400> 10

15 **ggtaggagtc aggtagttag**

20

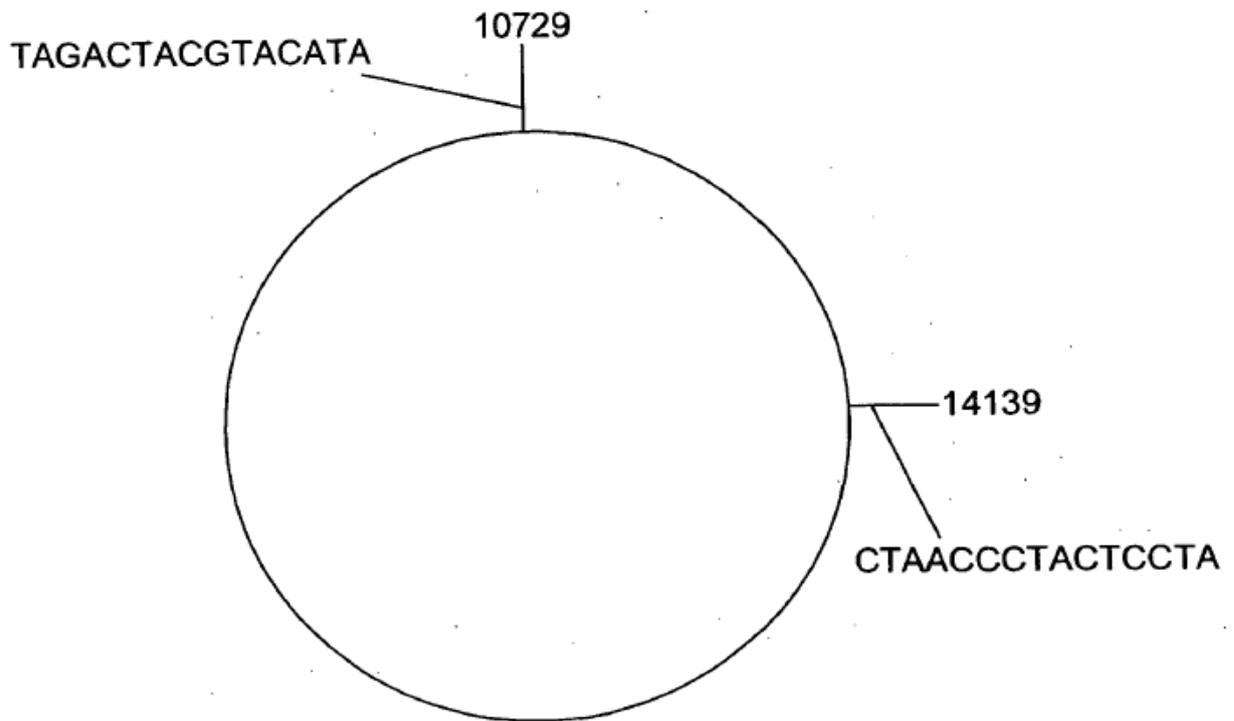
REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un cáncer en un individuo que comprende:
- a) extraer ADN mitocondrial, ADNmt, de una muestra biológica del individuo;
 - 5 b) cuantificar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene una deleción de aproximadamente 3.379 pares de bases en la secuencia de ácido nucleico que abarca aproximadamente los residuos 10.744 a 14.124 del genoma de ADNmt;
 - c) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la deleción con al menos un valor de referencia conocido;
- en el que el cáncer es cáncer de mama.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que el al menos un valor de referencia conocido es la cantidad de la deleción en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal no canceroso conocido.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el al menos un valor de referencia conocido es la cantidad de la deleción en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal canceroso conocido.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en el que el valor de referencia conocido es la cantidad de la deleción en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal no canceroso conocido,
- en el que una cantidad elevada de la deleción en la muestra biológica comparada con la muestra de referencia es indicativa de cáncer.
5. El método de la reivindicación 4, que comprende además la etapa de comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la deleción con la cantidad de la deleción en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal canceroso conocido.
- 20 6. El método de la reivindicación 1, en el que el valor de referencia conocido es la cantidad de la deleción en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal canceroso conocido,
- en el que un nivel similar de la deleción en la muestra biológica comparado con la muestra de referencia es indicativo de cáncer.
- 25 7. El método de la reivindicación 6, que comprende además la etapa de comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la deleción con la cantidad de la deleción en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal no canceroso conocido.
8. Un método para monitorizar a un individuo para el desarrollo de un cáncer que comprende:
- a) extraer ADNmt de una muestra biológica del individuo;
 - 30 b) cuantificar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene una deleción de aproximadamente 3.379 pares de bases en la secuencia de ácido nucleico que abarca aproximadamente los residuos 10.744 a 14.124 del genoma de ADNmt;
 - c) repetir las etapas a) a b) durante una duración de tiempo,
- en el que un nivel incrementado de la deleción durante la duración de tiempo es indicativo de cáncer;
- 35 en el que el cáncer es cáncer de mama.
9. El método de la reivindicación 8, que comprende además al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en: (a) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la deleción con la cantidad de la deleción en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal no canceroso conocido; y (b) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la deleción con la cantidad de la deleción en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal canceroso conocido.
- 40 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la deleción tiene una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la secuencia identificada en SEQ ID NO: 1.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cuantificación de la deleción incluye en primer lugar amplificar una región diana de ADNmt que es indicativa de la deleción, y cuantificar la cantidad de la región diana amplificada.
- 45

12. El método según la reivindicación 11, en el que la amplificación de la región diana se lleva a cabo usando una pareja de cebadores de amplificación, uno de la pareja de cebadores de amplificación que se superpone con un empalme que une las regiones en extremos opuestos de la delección.
- 5 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de cuantificación se lleva a cabo usando PCR en tiempo real.
14. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de cuantificación se lleva a cabo usando PCR en tiempo real y en el que el valor de referencia es un umbral de ciclo.
15. El método de la reivindicación 11 ó 14, en el que se usa un cebador de PCR que tiene una secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 2 como parte de una pareja de cebadores de amplificación para amplificar la región diana.
- 10 16. El método de la reivindicación 11 ó 14, en el que uno de una pareja de cebadores de PCR usado en la amplificación de la región diana se superpone con una región con empalme de ADNmt después de la delección de la secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 1.
- 15 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica es un tejido corporal o fluido corporal.
18. El método de la reivindicación 17, en el que la muestra biológica se selecciona de tejido de mama y orina.

Figura 1

Diseño de Cebador para la Delección de 3,4kb



CEBADOR FINAL: TAGACTACGTACATACTAACCCTACTCCTA

Figura 2

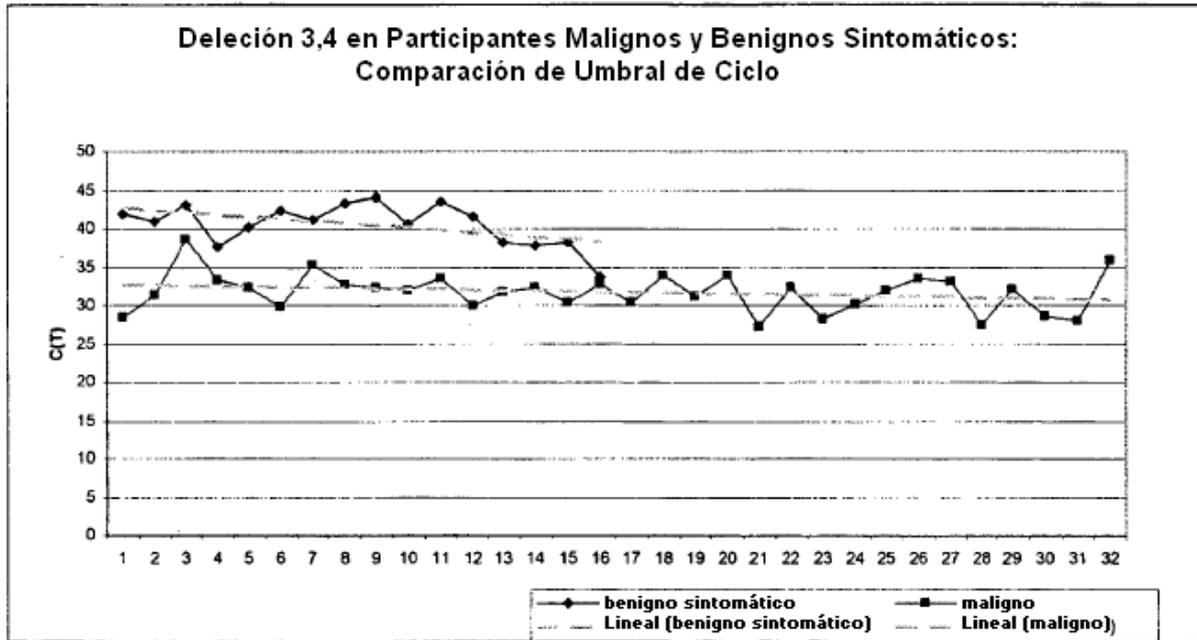


Figura 3

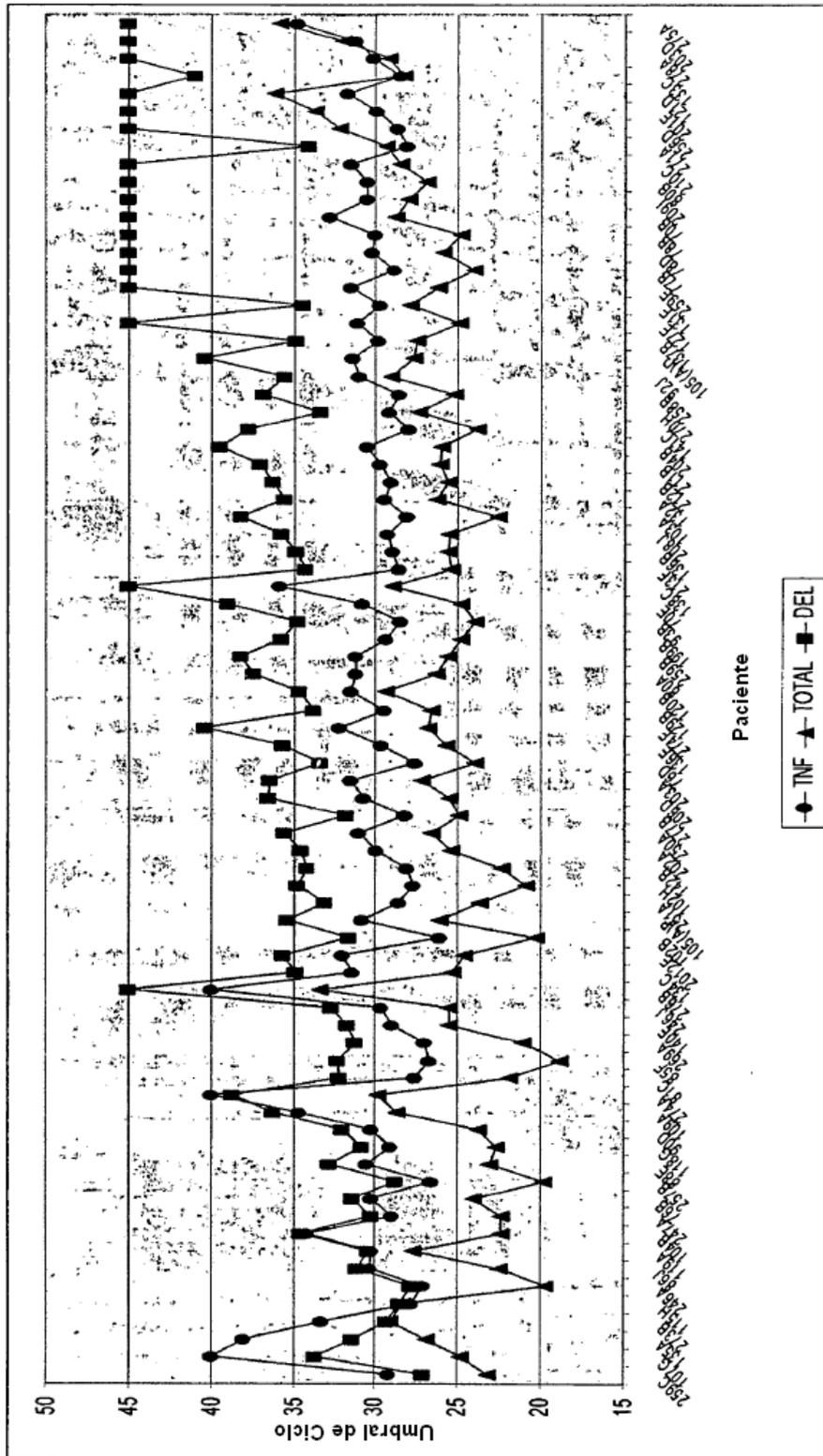


Figura 4

Curva ROC

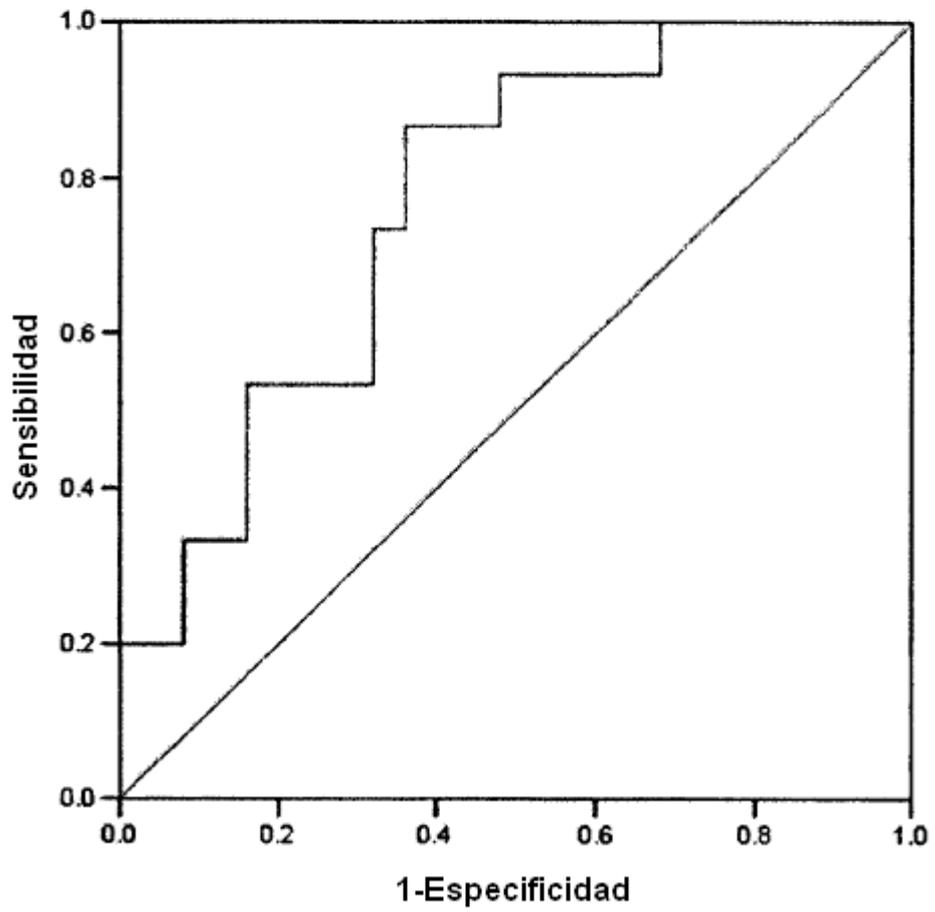


Figura 5

Curva ROC

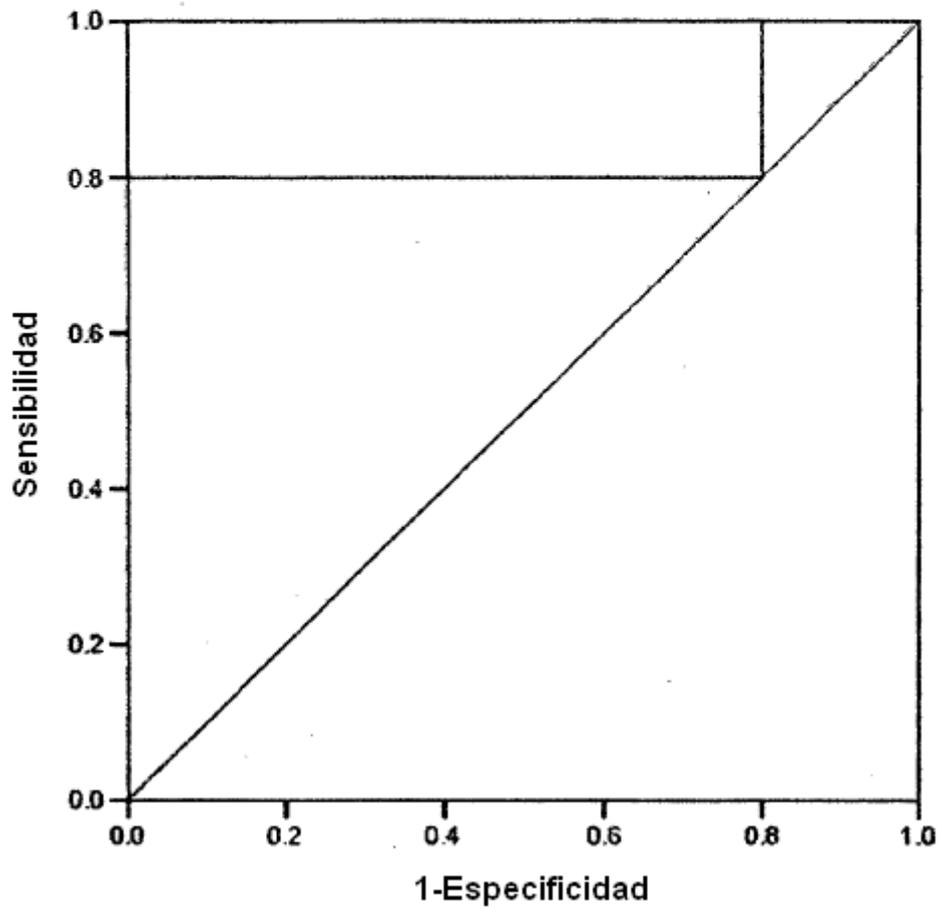


Figura 6

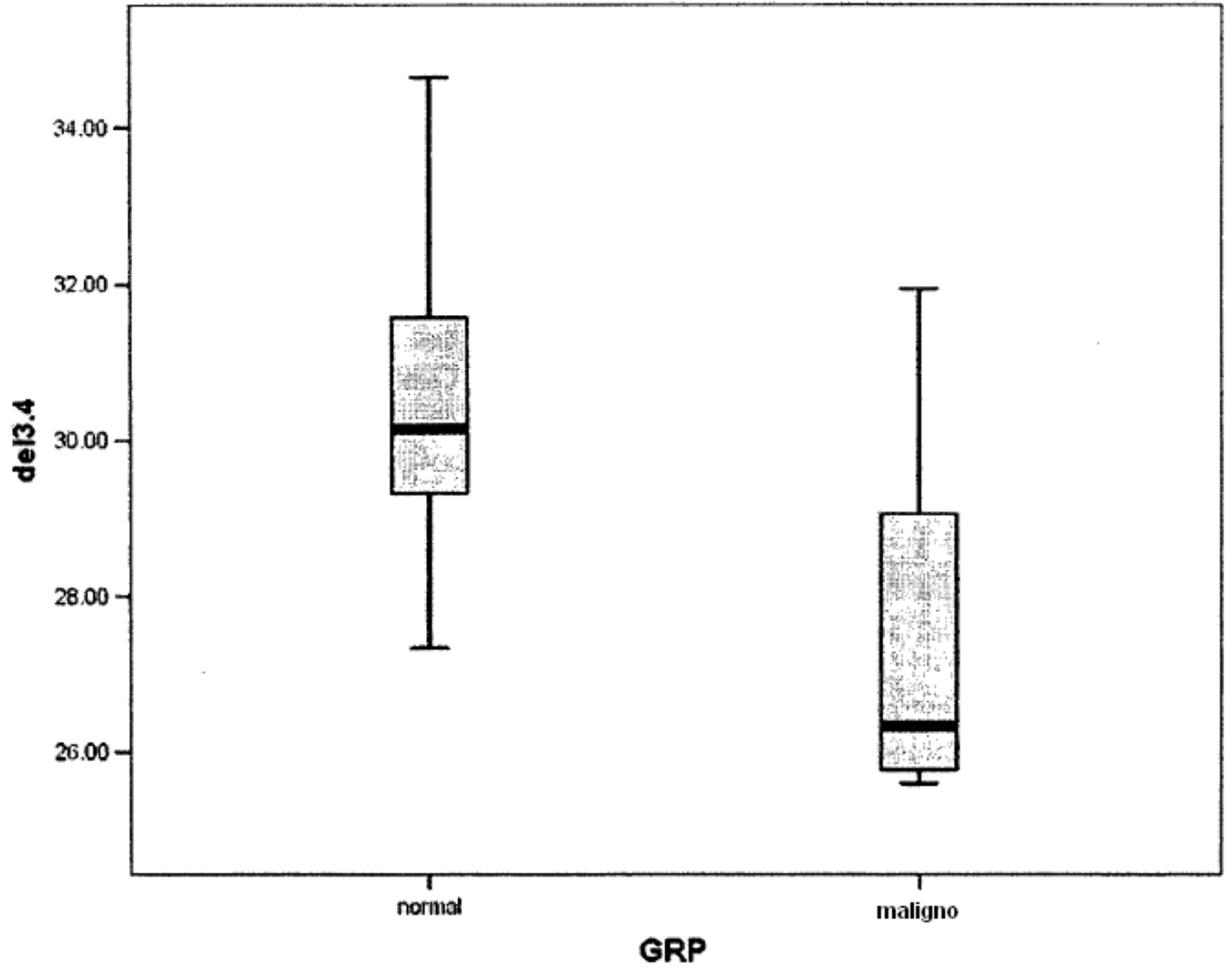


Figura 7

Curva ROC

