

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 542**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2009** **E 11189541 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014** **EP 2474626**

54 Título: **Detección de neoplasia a partir de una muestra de heces**

30 Prioridad:

15.02.2008 US 29221 P

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

17.11.2014

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905, US**

72 Inventor/es:

**TAYLOR, WILLIAM R.;
HARRINGTON, JONATHAN J.;
QUINT, PATRICK S.;
HONGZHI, ZOU;
BERGEN, HAROLD R., III y
SMITH, DAVID I.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 522 542 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

Detección de neoplasia a partir de una muestra de heces

Antecedentes**1. Campo técnico**

- 5 Este documento se refiere a procedimientos y materiales implicados en la detección de neoplasias premalignas y malignas (por ejemplo, cáncer colorrectal y pancreático).

2. Información sobre antecedente

- 10 Aproximadamente la mitad de todas las muertes por cáncer en los Estados Unidos resulta de cáncer del tracto aerodigestivo. Por ejemplo, de las muertes anuales estimadas por cáncer, aproximadamente el 25 por ciento resultan de cáncer de pulmón; aproximadamente el 10 por ciento resultan de cáncer colorrectal; aproximadamente el 6 por ciento resultan de cáncer de páncreas; aproximadamente el 3 por ciento resultan de cáncer de estómago; y aproximadamente el 3 por ciento resultan de cáncer de esófago. Además, más del 7 por ciento de las muertes anuales por cáncer resultan de otros cánceres del tracto aerodigestivo, tales como cánceres naso-oro-faríngeo, del conducto biliar, de vesícula biliar, e intestino delgado.

Sumario

- 15 El presente documento se refiere a procedimientos y materiales para detectar neoplasias premalignas y malignas (por ejemplo, cáncer colorrectal y pancreático). Por ejemplo, el presente documento proporciona procedimientos y materiales que pueden usarse para determinar si una muestra (por ejemplo, una muestra de heces) de un mamífero
20 contiene un marcador para una neoplasia premaligna y maligna, tal como un marcador de una neoplasia colónica o supracolónica del tracto aerodigestivo localizada en el mamífero. La detección de dicho marcador en una muestra de un mamífero puede permitir a un médico diagnosticar cáncer en una fase temprana. Además, el análisis de una muestra tal como una muestra de heces puede ser mucho menos invasivo que otros tipos de técnicas de diagnóstico tales como endoscopia.

- 25 El presente documento se basa, en parte, en el descubrimiento de que marcadores particulares de ácido nucleico, marcadores polipeptídicos, y combinaciones de marcadores presentes en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de heces) que puede usarse para detectar una neoplasia localizada, por ejemplo, en el intestino delgado de un mamífero, la vesícula biliar, el conducto biliar, el páncreas, el hígado, el estómago, el esófago, el pulmón, o las vías respiratorias naso-oro-faríngeas. Por ejemplo, como se describe en el presente documento, pueden analizarse
30 las deposiciones para identificar mamíferos que tienen cáncer. Una vez se ha determinado que un mamífero particular tiene heces que contienen un marcador o conjunto de marcadores específicos de neoplasia, pueden usarse técnicas adicionales de exploración para cáncer para identificar la localización y naturaleza de la neoplasia. Por ejemplo, puede analizarse una muestra de heces para determinar que el paciente tiene una neoplasia, mientras que pueden usarse técnicas de imágenes por resonancia magnética (MRI), análisis endoscópico, y biopsia tisular para identificar la localización y naturaleza de la neoplasia. En algunos casos, puede usarse una combinación de
35 marcadores para identificar la localización y naturaleza de la neoplasia sin técnicas adicionales de exploración para cáncer tales como técnicas de MRI, análisis endoscópico, y biopsia tisular.

- 40 En general, un aspecto del presente documento presenta un procedimiento para detectar cáncer pancreático en un mamífero. El procedimiento comprende, o consiste esencialmente en determinar la proporción de un polipéptido elastasa 3A a un polipéptido pancreático alfa-amilasa presente dentro de una muestra de heces. La presencia de una proporción mayor de aproximadamente 0,5 indica que el mamífero tiene cáncer pancreático. La presencia de una proporción menor de aproximadamente 0,5 indica que el mamífero no tiene cáncer pancreático.

- 45 En otro aspecto, el presente documento presenta un procedimiento para detectar cáncer pancreático en un mamífero. El procedimiento comprende o consiste esencialmente en determinar el nivel de un polipéptido elastasa 3A en una muestra de heces del mamífero. La presencia de un nivel aumentado de un polipéptido elastasa 3A, en comparación con un nivel de control normal, es indicativa de cáncer pancreático en el mamífero.

- 50 En otro aspecto, el presente documento presenta un procedimiento para detectar cáncer pancreático en un mamífero. El procedimiento comprende, o consiste esencialmente en determinar el nivel de un polipéptido carboxipeptidasa B en una muestra de heces del mamífero. Un aumento en el nivel de un polipéptido carboxipeptidasa B, en comparación con un nivel de control normal, es indicativo de cáncer pancreático en el mamífero.

- 55 En otro aspecto, el presente documento presenta un procedimiento para detectar cáncer pancreático en un mamífero. El procedimiento comprende o consiste esencialmente en determinar si una muestra de heces del mamífero comprende o no una proporción de un polipéptido carboxipeptidasa B a un polipéptido carboxipeptidasa A2 que es mayor de aproximadamente 0,5. La presencia de la proporción mayor de aproximadamente 0,5 indica que el mamífero tiene cáncer pancreático.

En otro aspecto, el presente documento presenta un procedimiento para detectar cáncer o precáncer en un mamífero. El procedimiento comprende o consiste esencialmente en determinar si una muestra de heces del mamífero tiene o no un aumento en la cantidad de fragmentos de ADN menores de 200 pares de bases de longitud, en comparación con un control normal. La presencia del aumento en la cantidad de fragmentos de ADN menores de 200 pares de bases de longitud indica que el mamífero tiene cáncer o precáncer. Los fragmentos de ADN pueden ser menores de 70 pares de bases de longitud.

En otro aspecto, el presente documento presenta un procedimiento para detectar cáncer o precáncer colorrectal en un mamífero. El procedimiento comprende o consiste esencialmente en determinar si una muestra de heces del mamífero tiene o no un valor de mutación elevado de K-ras (homólogo del oncogén viral de sarcoma-2 de rata de Kirsten (v-Ki-ras2) (nº de acceso a GenBank NM_033360; gi|34485724)), un estado de metilación elevado de BMP3 (proteína morfogenética ósea 3 (nº de acceso a GenBank M22491; gi|179505)), y un nivel elevado de ADN humano en comparación con un control normal. La presencia de un valor de mutación elevado de K-ras, un estado de metilación elevado de BMP3, y un nivel elevado de ADN humano indica que el mamífero tiene cáncer o precáncer colorrectal. El valor de mutación de K-ras puede medirse por análisis digital de curvas de fusión. El valor de mutación de K-ras puede medirse por PCR cuantitativa específica de alelo.

En otro aspecto, el presente documento presenta un procedimiento para detectar cáncer o precáncer del tracto aerodigestivo en un mamífero. El procedimiento comprende o consiste esencialmente en determinar si una muestra de heces del mamífero tiene o no un valor de mutación elevado de K-ras, un estado de metilación elevado de BMP3, y un nivel elevado de ADN humano en comparación con un control normal. La presencia del valor de mutación elevado de K-ras, el estado de metilación elevado de BMP3, y el nivel elevado de ADN humano indica que el mamífero tiene cáncer o precáncer del tracto aerodigestivo. El valor de mutación de K-ras puede medirse por análisis digital de curvas de fusión. El valor de mutación de K-ras puede medirse por PCR cuantitativa específica de alelo. El procedimiento puede comprender adicionalmente determinar si una muestra de heces del mamífero tiene o no un valor de mutación elevado de APC. El valor de mutación de APC puede medirse por análisis digital de curvas de fusión.

En otro aspecto, el presente documento presenta un procedimiento para detectar cáncer o precáncer del tracto aerodigestivo en un mamífero. El procedimiento comprende o consiste esencialmente en determinar si el mamífero tiene o no al menos una mutación en seis ácidos nucleicos seleccionados entre el grupo que consiste en los ácidos nucleicos p16, p53, k-ras, APC (supresor tumoral de adenomatosis poliposis coli (nº de acceso a GenBank N_000038; gi|1189011564)), SMAD4 (miembro de la familia SMAD 4 (nº de acceso a GenBank N_005359; gi|195963400)), EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico (nº de acceso a GenBank NM_005228; gi|41327737)), CTNNB1 (catenina (proteína asociada a cadherina), beta 1 (88kD) (nº de acceso a GenBank X87838; gi|154853)), y BRAF (serina/treonina-proteína quinasa del proto-oncogén B-Raf (p94) (nº de acceso a GenBank NM_004333; gi|187608632)). La presencia de al menos una mutación en cada uno de los seis ácidos nucleicos indica que el mamífero tiene cáncer o precáncer del tracto aerodigestivo. El procedimiento puede comprender adicionalmente determinar si una muestra de heces del mamífero tiene o no un nivel elevado de un polipéptido carboxipeptidasa B en comparación con un control normal. La presencia del nivel elevado de un polipéptido carboxipeptidasa B indica que el mamífero tiene cáncer o precáncer del tracto aerodigestivo en el mamífero. El procedimiento puede comprender adicionalmente determinar si una muestra de heces del mamífero tiene o no una cantidad elevada de fragmentos de ADN menores de 70 pares de bases de longitud en comparación con un control normal. La presencia de una cantidad elevada de fragmentos de ADN menores de 70 pares de bases de longitud indica que el mamífero tiene cáncer o precáncer del tracto aerodigestivo. El procedimiento puede comprender adicionalmente determinar si una muestra de heces del mamífero tiene o no una cantidad elevada de fragmentos de ADN mayores de 100 pares de bases de longitud en comparación con controles normales. La presencia de la cantidad elevada de fragmentos de ADN mayores de 100 pares de bases de longitud indica que el mamífero tiene cáncer o precáncer del tracto aerodigestivo. El procedimiento puede comprender adicionalmente determinar si una muestra de heces del mamífero tiene o no un estado de metilación elevado de BMP3. El estado de metilación elevado de BMP3 indica que el mamífero tiene cáncer o precáncer del tracto aerodigestivo. La etapa de determinación puede comprender el uso de análisis digital de curvas de fusión.

En otro aspecto, el presente documento presenta un procedimiento para detectar cáncer o precáncer del tracto aerodigestivo en un mamífero. El procedimiento comprende o consiste esencialmente en medir mutaciones en un panel de matriz de marcadores en una muestra de heces. El panel de marcadores puede comprender medir mutaciones de ADN en ácidos nucleicos p16, p53, k-ras, APC, SMAD4, EGFR, CTNNB1, y BRAF. La presencia de una mutación en cada uno de los ácidos nucleicos es indicativa de la presencia de cáncer o precáncer del tracto aerodigestivo en un mamífero.

En otro aspecto, el presente documento presenta un procedimiento para detectar cáncer del tracto aerodigestivo en un mamífero. El procedimiento comprende o consiste esencialmente en determinar si un estado de metilación de un ácido nucleico ALX4 (homeobox 4 tipo aristaless (nº de acceso a GenBank AF294629; gi|10863748)) en una muestra de heces del mamífero está elevado o no, en comparación con un control normal. La presencia de un estado de metilación elevado de ALX4 indica la presencia de cáncer del tracto aerodigestivo en el mamífero.

En otro aspecto, el presente documento presenta un procedimiento para diagnosticar cáncer pancreático en un

mamífero. El procedimiento comprende o consiste esencialmente en obtener una muestra de heces del mamífero, determinar la proporción de un polipéptido elastasa 3A a un polipéptido pancreático alfa-amilasa presente dentro de una muestra de heces, y comunicar un diagnóstico de cáncer pancreático si la proporción es mayor de aproximadamente 0,5, diagnosticando de este modo al mamífero con cáncer pancreático.

5 En otro aspecto, el presente documento presenta un procedimiento para diagnosticar a un mamífero con cáncer pancreático. El procedimiento comprende o consiste esencialmente en obtener una muestra de heces del mamífero, medir mutaciones en un panel de matriz de marcadores de ácidos nucleicos presentes en la muestra, determinar la proporción de un polipéptido carboxipeptidasa B a un polipéptido carboxipeptidasa A2 presente dentro de la muestra, y comunicar un diagnóstico de cáncer o precáncer pancreático si se detecta una mutación en cada uno de los ácidos nucleicos del panel de marcadores y la proporción es mayor de 0,5, diagnosticando de este modo al mamífero. El panel de matriz de marcadores comprende o consiste esencialmente en ácidos nucleicos p16, p53, k-ras, APC, SMAD4, EGFR, CTNNB1, y BRAF.

15 En otro aspecto, el presente documento presenta un procedimiento para diagnosticar a un mamífero con cáncer colorrectal. El procedimiento comprende o consiste esencialmente en obtener una muestra de heces del mamífero, detectar mutaciones en un panel de matriz de marcadores que comprende ácidos nucleicos p16, p53, k-ras, APC, SMAD4, EGFR, CTNNB1, y BRAF en ADN presente dentro de la muestra, medir el nivel de polipéptido serotransferrina presente dentro de la muestra, y comunicar un diagnóstico de cáncer o precáncer colorrectal si se detecta una mutación en cada uno de los ácidos nucleicos y el nivel de un polipéptido serotransferrina está elevado en comparación con un nivel de referencia, diagnosticando de este modo al mamífero.

20 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un especialista en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto predominará la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, procedimientos, y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la siguiente descripción. Otras características, objetos, y ventajas de la invención serán evidentes por la descripción y de las reivindicaciones.

30 **La presente invención frente a la técnica anterior**

En el documento US-A-2007/172823 el patrón de mutaciones en APC se considera junto con K-ras, B-raf y beta-catenina en el diagnóstico de cáncer colorrectal a partir de muestras de heces. El documento WO-A-01/42781 describe la determinación de si una muestra de heces de un mamífero contiene un marcador específico de neoplasia de neoplasia supracolónica del tracto aerodigestivo y que dicho marcador puede incluir un ácido nucleico que tiene una mutación puntual, que puede localizarse en un gen K-ras, APC, o p53, y ácido nucleico que refleja la inestabilidad del microsatélite, que puede localizarse en el segmento BAT-26 del gen de reparación de desapareamientos MSH2. ZOU HONGZHI y col. "Highly methylated genes in colorectal neoplasia: implications for screening", CANCER EPIDEMIOLOGY, BIOMARKERS AND PREVENTION, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 16, n° 12, 1 de diciembre de 2007, páginas 2686-2696] describe patrones de elevada metilación para los genes BMP3, EYA2, ALX4 y vimentina en muestras de cáncer colorrectal y la asociación de K-ras mutante con metilación de al menos dos de estos genes en la mayoría de cánceres y adicionalmente sugiere que estos marcadores de metilación pueden usarse para explorar cáncer colorrectal en muestras de heces. H. ZOU: A Sensitive Method to Quantify Human Long DNA in Stool: Relevance to Colorectal Cancer Screening", CANCER EPIDEMIOLOGY, BIOMARKERS AND PREVENTION, vol. 15, n° 6, 1 de junio de 2006, páginas 1115-1119 describe elevados niveles de ADN largo humano en muestras de heces de pacientes con cáncer colorrectal por amplificación de una secuencia de repetición Alu de 245 pb.

En contraste a dicha técnica anterior, el procedimiento de la presente invención definido en las reivindicaciones detecta cáncer colorrectal a través del uso de una combinación específica de tres marcadores que consiste en un valor de mutación elevado de K-ras, un estado de metilación elevado de BMP3, y un nivel elevado de ADN humano en comparación con un control normal.

Una limitación principal de los procedimientos de la técnica anterior es la insuficiencia de sensibilidad para detectar cáncer colorrectal para dichos marcadores solos entre el 42% y el 65% (véase por ejemplo la Tabla 1 de la memoria descriptiva). Usando una combinación específica de tres marcadores que consiste en un valor de mutación elevado de K-ras en combinación con un estado de metilación elevado de BMP3, y un nivel elevado de ADN humano se provocó una sensibilidad sorprendentemente elevada para detectar cáncer colorrectal del 90% como se resume en la Tabla 1 de la memoria descriptiva y no se conoce a partir de la anterior técnica anterior citada.

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no están dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente

invención.

Descripción de los dibujos

5 Figura 1: Niveles de corte ajustados con marcadores cuantitativos de heces para conseguir especificidad del 95% a través de la edad y el género usando el modelo Q-LEAD. La línea sólida para mujeres, la línea de puntos para hombres.

Figura 2: Detección sensible y específica de cáncer pancreático por proporción fecal de carboxipeptidasa B:carboxipeptidasa A2. Obsérvese que la proporción en deposiciones de pacientes con cáncer colorrectal no es diferente de las proporciones con controles sanos.

10 Figura 3: Niveles de elastasa cuantificados en deposiciones de pacientes con cáncer pancreático, pacientes con cáncer colorrectal, y controles sanos.

Figura 4: La proporción de elastasa 3A:alfa amilasa pancreática diferencia pacientes con cáncer pancreático de pacientes con cáncer colorrectal y de controles sanos.

15 Figura 5: Curva de fusión digital para detectar mutaciones por examen de genes diana (temperatura (eje x) frente a fluorescencia normalizada a la temperatura (eje y)). Se usaron ocho pares de cebadores, que amplifican fragmentos génicos de 100-350 pb, para examinar los genes K-ras y APC y detectar mutaciones (mutaciones de sustitución y delección, respectivamente) a proporción mutante/tipo silvestre del 1%.

Figura 6: Detección cuantitativa de mutaciones de baja abundancia por ensayo digital de curvas de fusión. Variando las proporciones mutante:tipo silvestre del gen K-ras y APC se prepararon mezclas y se ensayaron de forma ciega por curva de fusión digital.

20 Figura 7: Elevada sensibilidad analítica por curva de fusión digital (temperatura (eje x) frente a fluorescencia normalizada a la temperatura (eje y)). Para ensayar el límite de detección del ensayo digital de curvas de fusión (DMC), se hicieron adiciones de copias mutantes en copias de tipo silvestre a diluciones del 0,1, 0,5, 1, 5, y 10%. DMC pudo detectar hasta un 0,1% de nivel mutante/tipo silvestre cuando se dispersaron 1000 copias en una placa de 96 pocillos. Las cantidades de pocillos positivos aumentaron proporcionalmente cuando se aumentaban las copias mutantes con adiciones. Se usó un par de cebadores que amplifican un fragmento del gen K-ras de 248 pb como ejemplo aquí. Los cebadores que amplifican el gen K-ras de 119 pb, el gen APC de 162 pb, y el gen APC de 346 pb también se usaron para ensayar el límite de detección y la propiedad cuantitativa de DMC.

25 Figura 8: Detección de exploración superior de pólipos precancerosos colorrectales por curva de fusión digital (DMC). El histograma compara la sensibilidad por DMC con la de ensayos comunes de sangre oculta fecal (Hemoccult y HemoccultSENSA) y por el ensayo comercial de ADN en deposiciones (PreGenPlus, Exact Sciences). La detección por DMC fue significativamente mejor que por cualquier otro ensayo ($p < 0,05$).

30 Figura 9: Distribuciones de ADN humano de fragmento corto (ADN corto) y ADN humano de fragmento largo (ADN largo) en deposiciones de pacientes con colonoscopia normal, adenomas precanceroso grandes, y cáncer colorrectal. El ADN humano se cuantificó por un ensayo de repeticiones Alu. El ADN corto representa productos de amplificación de fragmento de 45 pb, y el ADN largo representa productos de amplificación de 245 pb.

35 Figura 10: Distribuciones en deposiciones de ADN corto y largo en pacientes con cáncer pancreático y en controles sanos. El ADN corto representa productos de amplificación de fragmento de 45 pb, y el ADN largo representa productos de amplificación de 245 pb.

40 Figura 11: Gen BMP3 metilado en deposiciones para la detección de neoplasia colorrectal. El BMP3 metilado se cuantificó de forma ciega en deposiciones de pacientes con cánceres colorrectales, adenomas precancerosos, e individuos normales con PCR específica de metilación a tiempo real. Cada círculo representa una muestra de heces.

Figura 12: Frecuencia de cambios de bases específicas en tumores colorrectales.

Descripción detallada

45 La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no están dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención. El presente documento proporciona procedimientos y materiales referidos a la detección de una neoplasia en un mamífero (por ejemplo, un ser humano). Por ejemplo, el presente documento proporciona procedimientos y materiales para usar marcadores de ácido nucleico, marcadores polipeptídicos, y combinaciones de marcadores
50 presentes en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de heces) para detectar una neoplasia en un mamífero. Dicha neoplasia puede ser un cáncer o precáncer en la cabeza y cuello, pulmones y vías respiratorias, esófago, estómago, páncreas, conductos biliares, intestino delgado, o recto del colon. Se apreciará que los procedimientos y materiales proporcionados en el presente documento pueden usarse para detectar marcadores de neoplasia en un mamífero que tiene una combinación de diferentes neoplasias. Por ejemplo, los procedimientos y

materiales proporcionados en el presente documento pueden usarse para detectar marcadores de ácido nucleico polipeptídicos en un ser humano que tiene neoplasias de pulmón y estómago.

En algunos casos, los procedimientos y materiales proporcionados en el presente documento pueden usarse para cuantificar múltiples marcadores en muestras biológicas (por ejemplo, heces) para producir alta sensibilidad para la detección de lesiones (por ejemplo, neoplasias), conservando al mismo tiempo una elevada especificidad. Dichos procedimientos pueden incluir, por ejemplo, un modelo lógico que ajusta los límites de especificidad en base a la edad, el género, u otras variables en una población diana a ensayar o explorar.

En algunos casos, los procedimientos y materiales proporcionados en el presente documento pueden usarse para determinar si un mamífero (por ejemplo, un ser humano) tiene cáncer colorrectal o cáncer pancreático. Por ejemplo, pueden usarse los marcadores serotransferrina, BMP3 metilado, y BRAF mutante en deposiciones para identificar a un mamífero que probablemente tiene cáncer colorrectal, mientras que pueden usarse los marcadores p16 mutante, carboxipeptidasa B/A, y elastasa 2A para identificar a un mamífero que probablemente tiene cáncer pancreático.

Puede usarse cualquier procedimiento adecuado para detectar un marcador de ácido nucleico en una muestra de heces de mamífero. Por ejemplo, dichos procedimientos pueden implicar aislar ADN de una muestra de heces, separar uno o más ADN particulares del ADN total, someter los ADN a tratamiento con bisulfito, y determina si los ADN separados están anormalmente metilados (por ejemplo, hipermetilados o hipometilados). En algunos casos, dichos procedimientos pueden implicar aislar ADN de una muestra de heces y determinar la presencia o ausencia de ADN que tiene un tamaño particular (por ejemplo, ADN corto). Se aprecia que una única muestra de heces puede analizarse para un marcador de ácido nucleico o para múltiples marcadores de ácido nucleico. Por ejemplo, una muestra de heces puede analizarse usando ensayos que detectan un panel de diferentes marcadores de ácido nucleico. Además, pueden recogerse múltiples muestras de heces de un único mamífero y analizarse como se describe en el presente documento.

El ácido nucleico puede aislarse de una muestra de heces usando, por ejemplo, un kit tal como el QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA). Además, el ácido nucleico puede aislarse de una muestra de heces usando el siguiente procedimiento: (1) homogeneizar las muestras en un volumen en exceso (>1:7 p:v) de un tampón de estabilidad de heces (Tris 0,5 M pH 9,0, EDTA 150 mM, NaCl 10 mM) agitando o mezclando de forma mecánica; (2) centrifugar 10 gramos de heces equivalentes de cada muestra para retirar toda la materia particulada; (3) añadir 1 µl de 100 µg/µl de RNasa A al sobrenadante e incubar a 37°C durante 1 hora; (4) precipitar el ácido nucleico total con un volumen 1/10 de NaAc 3 M y un volumen igual de isopropanol; y (5) centrifugar y después resuspender el sedimento de ADN en TE (Tris 0,01 M pH 7,4, EDTA 0,001 M). Las patentes de Estados Unidos 5.670.325; 5.741.650; 5.928.870; 5.952.178, y 6.020.137 también describen diversos procedimientos que pueden usarse para preparar y analizar muestras de heces.

Puede purificarse uno o más fragmentos específicos de ácido nucleico a partir de una preparación de ácido nucleico usando, por ejemplo, una técnica modificada de captura de híbridos específica de secuencia (véase, por ejemplo, Ahlquist y col. (2000) *Gastroenterology*, 119:1219-1227). Dicho protocolo puede implicar: (1) añadir 300 µl de preparación de muestra a un volumen igual de una solución de isotiocianato de guanidina 6 M que contiene 20 pmol de oligonucleótidos biotinilados (obtenidos de, por ejemplo, Midland Certified Reagent Co., Midland, TX) con secuencias específicas para los fragmentos de ADN a analizar; (2) incubar durante dos horas a 25°C; (3) añadir perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina a la solución e incubar durante una hora adicional a temperatura ambiente; (4) lavar los complejos de captura perla/híbrido cuatro veces con tampón B+W 1X (NaCl 1 M, Tris-HCl 0,01 M pH 7,2, EDTA 0,001 M, Tween 20 al 0,1%); y (5) eluir el ADN capturado específico de secuencia en 35 µl de L-TE (Tris 1 mM pH 7,4, EDTA 0,1 M) por desnaturalización con calor de los complejos de captura perla/híbrido. También puede usarse cualquier otra técnica adecuada para aislar fragmentos específicos de ácido nucleico.

El ácido nucleico puede someterse a tratamiento con bisulfito para convertir los restos no metilados de citosina en restos de uracilo, dejando al mismo tiempo cualquier restos de 5-metilcitosina inalterado. Puede realizarse una reacción con bisulfito usando, por ejemplo, técnicas convencionales: (1) desnaturalización de aproximadamente 1 µg de ADN genómico (la cantidad de ADN puede ser menor cuando se usan muestras de ADN micro-disecionadas) durante 15 minutos a 45°C con NaOH 2 N; (2) incubación con hidroquinona 0,1 M y bisulfito sódico 3,6 M (pH 5,0) a 55°C durante 4-12 horas; (3) purificación del ADN de la mezcla de reacción usando columnas convencionales (por ejemplo, disponibles en el mercado) miniprep de ADN u otras técnicas convencionales para la purificación de ADN; (4) resuspensión de la muestra purificada de ADN en 55 µl de agua y adición de 5 µl de NaOH N para una reacción de desulfonación que típicamente se realiza a 40°C durante 5-10 minutos; (5) precipitación de la muestra de ADN con etanol, lavado del ADN, y resuspensión del ADN en un volumen apropiado de agua. La conversión con bisulfito de restos de citosina en uracilo también puede conseguirse usando otros procedimientos (por ejemplo, el kit de modificación de ADN CpGenome™ de Serologicals Corp., Norcross, GA).

Puede usarse cualquier procedimiento apropiado para determinar si un ADN particular está hipermetilado o hipometilado. Pueden usarse técnicas convencionales de PCR, por ejemplo, para determinar los restos que están metilados, ya que las citosinas no metiladas convertidas en uracilo se reemplazan por restos de timidina durante la PCR. Las reacciones de PCR pueden contener, por ejemplo, 10 µl de ADN capturado que se ha tratado o no con bisulfito sódico, tampón de PCR 1X, dNTP 0,2 mM, cebadores específicos de secuencia 0,5 mM (por ejemplo,

cebadores que flanquean una isla CpG dentro del ADN capturado), y 5 unidades de ADN polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa Amplitaq de PE Applied Biosystems, Norwalk, CT) en un volumen total de 50 µl. Un protocolo típico de PCR puede incluir, por ejemplo, una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min., 40 ciclos de amplificación que consisten en 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C, y 1 minuto a 72°C, y una etapa de extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Para analizar los restos dentro de un ADN capturado que están metilados, pueden compararse las secuencias de productos de PCR correspondientes a muestras tratadas con y sin bisulfito sódico. La secuencia el ADN no tratado revelará las posiciones de todos los restos de citosina dentro del producto de PCR. Las citosinas que se mutilaron se convertirán en restos de timidina en la secuencia del ADN tratado con bisulfito, mientras que los restos que no se metilaron quedarán sin afectar por el tratamiento con bisulfito.

Los fragmentos purificados de ácido nucleico de una muestra o muestras de heces pueden analizarse para determinar la presencia o ausencia de una o más mutaciones somáticas. Las mutaciones pueden ser cambios de una única base, inserciones/deleciones cortas, o combinaciones de los mismos. Los métodos de análisis pueden incluir secuenciación basada en Sanger convencional, pirosecuenciación, secuenciación de siguiente generación, secuenciación de una única molécula, y secuenciación por síntesis. En algunos casos, el estado mutacional puede determinarse por PCR digital seguida de análisis de curvas de fusión de alta resolución. En otros casos, pueden usarse cebadores o sondas específicas de alelo junto con procedimientos de amplificación para detectar mutaciones específicas en ADN de deposiciones. La firma mutacional puede comprender no solamente el evento de un cambio de base o secuencia en un gen específico, sino también la localización del cambio dentro del gen, ya sea codificante, no codificante, sinónima o no sinónima, una transversión o transición, y esté la secuencia dinucleotídica cadena arriba y cadena abajo de la alteración.

En algunos casos, una muestra puede evaluarse para la presencia o ausencia de un marcador polipeptídico. Por ejemplo, puede usarse cualquier procedimiento apropiado para evaluar una muestra de heces para un marcador polipeptídico indicativo de una neoplasia. Por ejemplo, puede usarse una muestra de heces en ensayos diseñados para detectar uno o más marcadores polipeptídicos. Pueden adaptarse o diseñarse procedimientos apropiados tales como los descritos en otra parte (Aebersold y Mann, Nature, 422:198-207 (2003) y McDonald y Yates, Dis. Markers, 18:99-105 (2002)) para detectar polipéptidos en una deposición. Por ejemplo, el control de reacción individual usando un espectrómetro de masas TSQ puede abordar específicamente polipéptidos en una muestra de heces. Pueden usarse instrumentos de alta resolución como el LTQ-FT o LTQ orbitrap para detectar polipéptidos presentes en una muestra de heces.

La expresión "nivel aumentado" como se usa en el presente documento con respecto al nivel de un polipéptido elastasa 3A es cualquier nivel que esté por encima de un nivel medio de polipéptido elastasa 3A en una muestra de heces de una población aleatoria de mamíferos (por ejemplo, una población aleatoria de 10, 20, 30, 40, 50, 100, ó 500 mamíferos) que no tienen un cáncer del tracto aerodigestivo. Los niveles elevados de polipéptido de un polipéptido elastasa 3A pueden ser cualquier nivel con la condición de que el nivel sea mayor de un nivel de referencia correspondiente. Por ejemplo, un nivel elevado de un polipéptido elastasa 3A puede ser 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más veces mayor que el nivel de referencia de polipéptido elastasa 3A en una muestra normal. Se aprecia que un nivel de referencia puede ser cualquier cantidad. Por ejemplo, un nivel de referencia para un polipéptido elastasa 3A puede ser cero. En algunos casos, un nivel aumentado de un polipéptido elastasa 3A puede ser cualquier nivel detectable de un polipéptido elastasa 3A en una muestra de heces.

La expresión "nivel aumentado" como se usa en el presente documento con respecto al nivel de un polipéptido carboxipeptidasa B es cualquier nivel que esté por encima de un nivel medio de polipéptido carboxipeptidasa B en una muestra de heces de una población aleatoria de mamíferos (por ejemplo, una población aleatoria de 10, 20, 30, 40, 50, 100, ó 500 mamíferos) que no tienen un cáncer del tracto aerodigestivo. Los niveles elevados de polipéptido de polipéptido carboxipeptidasa B pueden ser cualquier nivel con la condición de que el nivel sea mayor de un nivel de referencia correspondiente. Por ejemplo, un nivel elevado de polipéptido carboxipeptidasa B puede ser 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más veces mayor que el nivel de referencia de polipéptido carboxipeptidasa B observado en una muestra normal de heces. Se aprecia que un nivel de referencia puede ser cualquier cantidad. Por ejemplo, un nivel de referencia para un polipéptido carboxipeptidasa B puede ser cero. En algunos casos, un nivel aumentado de un polipéptido carboxipeptidasa B puede ser cualquier nivel detectable de un polipéptido carboxipeptidasa B en una muestra de heces.

La expresión "nivel aumentado" como se usa en el presente documento con respecto al nivel de fragmentos de ADN menores de aproximadamente 200 o menos de aproximadamente 70 pares de bases de longitud es cualquier nivel que esté por encima de un nivel medio de fragmentos de ADN menores de aproximadamente 200 o menores de aproximadamente 70 pares de bases de longitud en una muestra de heces de una población aleatoria de mamíferos (por ejemplo, una población aleatoria de 10, 20, 30, 40, 50, 100, ó 500 mamíferos) que no tienen un cáncer del tracto aerodigestivo. En algunos casos, un nivel aumentado de fragmentos de ADN menores de aproximadamente 200 o menores de aproximadamente 70 pares de bases de longitud puede ser cualquier nivel detectable de fragmentos de ADN menores de aproximadamente 200 o menores de aproximadamente 70 pares de bases de longitud en una muestra de heces.

La expresión "metilación elevada" como se usa en el presente documento con respecto al estado de metilación de un ácido nucleico BMP3 o ALX es cualquier nivel de metilación que esté por encima de un nivel medio de metilación en una muestra de heces de una población aleatoria de mamíferos (por ejemplo, una población aleatoria de 10, 20, 30, 40, 50, 100, ó 500 mamíferos) que no tienen un cáncer del tracto aerodigestivo. Los elevados niveles de metilación de BMP3 o ALX pueden ser cualquier nivel con la condición de que el nivel sea mayor de un nivel de referencia correspondiente. Por ejemplo, un nivel elevado de metilación de BMP3 o ALX puede ser 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más veces mayor que el nivel metilación de referencia observado en una muestra normal de heces. Se aprecia que un nivel de referencia puede ser cualquier cantidad.

La expresión "valor elevado de mutación" como se usa en el presente documento con respecto a mutaciones detectadas en un panel de matriz de marcadores particulares de ácido nucleico es cualquier valor de mutación que esté por encima de un valor medio de mutación en una muestra de heces de una población aleatoria de mamíferos (por ejemplo, una población aleatoria de 10, 20, 30, 40, 50, 100, ó 500 mamíferos) que no tienen un cáncer del tracto aerodigestivo. Un valor elevado de mutación en un panel de matriz de marcadores particulares de ácido nucleico puede ser cualquier valor con la condición de que el valor sea mayor de un valor de referencia correspondiente. Por ejemplo, un valor elevado de mutaciones de K-ras o APC puede ser 0,5, 1, 2, 3,4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más veces mayor que el valor de referencia de mutaciones de K-ras o APC observado en una muestra normal de heces. Se aprecia que un valor de referencia puede ser cualquier cantidad.

En algunos casos, puede determinarse una proporción de marcadores polipeptídicos particulares y usarse para identificar a un mamífero que tiene un cáncer del tracto aerodigestivo (por ejemplo, un cáncer colorrectal o un cáncer pancreático). Por ejemplo, puede usarse una proporción proporcionada en el presente documento (por ejemplo, la proporción de niveles de polipéptido carboxipeptidasa B a niveles de polipéptido carboxipeptidasa A2) como se describe en el presente documento para identificar a un mamífero que tiene una neoplasia particular (por ejemplo, cáncer pancreático).

En algunos casos, puede usarse un panel de matriz de marcadores para identificar a mamíferos que tienen un cáncer del tracto aerodigestivo (por ejemplo, un cáncer colorrectal o un cáncer pancreático). En algunos casos, dicho panel también puede identificar la localización del cáncer del tracto aerodigestivo. Dicho panel puede incluir marcadores de ácido nucleico, marcadores polipeptídicos, y combinaciones de los mismos y puede proporcionar información acerca del gen marcador mutado, la región mutada del gen marcador, y/o el tipo de mutación. Por ejemplo, los datos pueden analizarse usando un modelo estadístico para predecir el sitio de tumor (por ejemplo, la localización anatómica o el tejido de origen) en base a lo introducido desde los datos de secuenciación (tal como por ácido nucleico específico o combinación de ácidos nucleicos mutados, localización específica de mutación en un ácido nucleico, y naturaleza de la mutación (por ejemplo, inserción, delección, transición, o transversión) o por cualquier combinación de los mismos) y/o los datos del polipéptido u otros tipos de marcadores. Por ejemplo, puede usarse un modelo de estimación del sitio de tumor (SITE) para predecir el sitio del tumor usando un panel de matriz de marcadores que están presentes en grado variable entre los tumores.

En algunos casos, los datos pueden analizarse usando marcadores cuantificados para crear un modelo lógico, que puede tener tanto elevada sensibilidad como elevada especificidad. Por ejemplo, un modelo lógico puede también incorporar variables de población como género y edad para ajustar los niveles límite para ensayar la positividad y optimizar de este modo el rendimiento del ensayo en una configuración de exploración. En algunos casos, puede usarse un modelo lógico cuantitativo para potenciar la detección precisa (Q-LEAD) con cualquier clase de marcador o combinación de marcadores siempre que puedan cuantificarse.

El presente documento también proporciona procedimientos y materiales para ayudar a los profesionales médicos o de investigación a determinar si un mamífero tiene o no un cáncer del tracto aerodigestivo. Los profesionales médicos pueden ser, por ejemplo, doctores, enfermeras, técnicos de laboratorio médico, y farmacéuticos. Los profesionales de investigación pueden ser, por ejemplo, investigadores principales, técnicos de investigación, becarios postdoctorales, y estudiantes graduados. Un profesional puede verse ayudado por (1) la determinación de la proporción de marcadores polipeptídicos particulares en una muestra de heces, y (2) la comunicación a ese profesional de información acerca de la proporción, por ejemplo. En algunos casos, un profesional puede verse ayudado por (1) la determinación del nivel de ADN humano, el estado de metilación de genes tales como BMP3, y el valor de mutación de genes tales como APC y K-ras, y (2) la comunicación al profesional de información acerca del nivel de ADN, el estado de metilación de genes particulares, y el valor de mutación de genes particulares. En algunos casos, un profesional puede verse ayudado por (1) la detección de mutaciones en genes relacionados con cáncer tales como K-ras, p53, APC, p16, EGFR, CTNNB1, BRAF, y SMAD4, como un panel de matriz de marcadores, y (2) la comunicación al profesional de información respecto a las mutaciones.

Después de presentar la proporción de marcadores polipeptídicos particulares, o la presencia de marcadores particulares de ácido nucleico en una muestra de heces, un profesional médico puede tomar una o más acciones que pueden afectar a los cuidados del paciente. Por ejemplo, un profesional médico puede registrar los resultados en un registro médico del paciente. En algunos casos, un profesional médico puede registrar un diagnóstico de un cáncer del tracto aerodigestivo, o transformar de otro modo el registro médico del paciente, para reflejar el estado médico del paciente. En algunos casos, un profesional médico puede revisar y evaluar un registro médico completo del paciente, y evaluar múltiples estrategias de tratamiento, para intervención clínica de la afección de un paciente.

5 En algunos casos, un profesional médico puede registrar una predicción de sitio de tumor con las mutaciones presentadas. En algunos casos, un profesional médico puede pedir una determinación de la proporción de marcadores polipeptídicos particulares para predecir el sitio de tumor. En algunos casos, un profesional médico puede revisar y evaluar el registro médico completo de un paciente y evaluar múltiples estrategias de tratamiento, para intervención clínica de la afección de un paciente.

10 Un profesional médico puede iniciar o modificar el tratamiento de un cáncer del tracto aerodigestivo después de recibir información respecto a una proporción de marcadores polipeptídicos particulares o la presencia de marcadores de ácido nucleico en una muestra de heces del paciente. En algunos casos, un profesional médico puede comparar informes previos y la proporción recientemente comunicada de marcadores polipeptídicos particulares, o la presencia de marcadores de ácido nucleico, y recomendar un cambio en la terapia. En algunos casos, un profesional médico puede incluir a un paciente en un ensayo clínico para nueva intervención terapéutica de un cáncer del tracto aerodigestivo. En algunos casos, un profesional médico puede decidir esperar para comenzar la terapia hasta que los síntomas del paciente requieran intervención clínica.

15 Un profesional médico puede comunicar la proporción de marcadores polipeptídicos particulares a un paciente o la familia de un paciente. En algunos casos, un profesional médico puede proporcionar a un paciente y/o la familia de un paciente información respecto a cánceres del tracto aerodigestivo, incluyendo opciones de tratamiento, pronóstico, y referencias a especialistas, por ejemplo, oncólogos y/o radiólogos. En algunos casos, un profesional médico puede proporcionar una copia de los registros médicos de un paciente para comunicar la proporción de marcadores polipeptídicos particulares a un especialista.

20 Un profesional de investigación puede solicitar información respecto a la proporción de marcadores polipeptídicos particulares de un sujeto para avanzar en la investigación del cáncer del tracto aerodigestivo. Por ejemplo, un investigador puede compilar datos sobre la proporción de marcadores polipeptídicos particulares, y/o la presencia de marcadores particulares de ácido nucleico, con información respecto a la eficacia de un fármaco para el tratamiento de cáncer del tracto aerodigestivo para identificar un tratamiento eficaz. En algunos casos, un profesional de investigación puede obtener la proporción de marcadores polipeptídicos particulares de un sujeto, y/o determinar la presencia de marcadores particulares de ácido nucleico para evaluar la inclusión, o la participación continuada de un sujeto en un estudio de investigación o ensayo clínico. En algunos casos, un profesional de investigación puede clasificar la gravedad del estado de un paciente, en base a la proporción de marcadores polipeptídicos particulares y/o los niveles de marcadores particulares de ácido nucleico. En algunos casos, un profesional de investigación puede comunicar a un profesional médico la proporción de marcadores polipeptídicos particulares de un sujeto, y/o la presencia de marcadores particulares de ácido nucleico. En algunos casos, un profesional de investigación puede remitir a un sujeto a un profesional médico para evaluación clínica de un cáncer del tracto aerodigestivo, y tratamiento de un cáncer del tracto aerodigestivo.

35 Puede usarse cualquier procedimiento apropiado para comunicar información a otra persona (por ejemplo, un profesional). Por ejemplo, puede darse información directa o indirectamente a un profesional. Por ejemplo, un técnico de laboratorio puede introducir la proporción de marcadores polipeptídicos particulares y/o marcadores particulares de ácido nucleico en un registro de base informática. En algunos casos, la información se comunica haciendo alteraciones físicas en los registros médicos o de investigación. Por ejemplo, un profesional médico puede hacer una anotación permanente o marca en un registro médico para comunicar un diagnóstico a otros profesionales médicos que revisen el registro. Además, puede usarse cualquier tipo de comunicación para comunicar la información. Por ejemplo, puede usarse correo postal, correo electrónico, teléfono, e interacciones cara a cara. La información también puede comunicarse a un profesional haciendo que la información esté electrónicamente disponible para el profesional. Por ejemplo, la información puede comunicarse a un profesional colocando la información en una base de datos informática de modo que el profesional pueda acceder a la información. Además, la información puede comunicarse a un hospital, clínica, o instalación de investigación que sirva como agente para el profesional.

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no están dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

50 Ejemplos

Ejemplo 1 - Cuantificación multi-marcador y un modelo Q-LEAD

55 La mayoría de los enfoques en detección de marcadores en deposiciones ha sido cualitativa. Cuando dichos enfoques cualitativos se aplica para ensayar múltiples marcadores (es necesario abordar múltiples marcadores con detección de neoplasias debido a la heterogeneidad molecular), se consigue sensibilidad a expensas de ausencia de especificidad compuesta. La ausencia de especificidad puede conducir a costes de programación prohibitivos con exploración de poblaciones debido a las caras e innecesarias evaluaciones de ensayos falsos-positivos. Sin embargo, si los marcadores se cuantifican, entonces puede crearse un modelo lógico para conseguir tanto elevada sensibilidad como elevada especificidad. Dicho modelo lógico también puede incorporar variables de población como género y edad para ajustar los niveles límite para ensayar la positividad y optimizar de este modo el

rendimiento del ensayo en una configuración de exploración (Figura 1). Este modelo lógico cuantitativo para potenciar la detección precisa (Q-LEAD) puede usarse con cualquier clase de marcador o combinación de marcadores siempre que puedan cuantificarse.

5 Se emprendió una combinación de más de un marcador para conseguir la sensibilidad y especificidad deseadas para la detección de cáncer. Los procedimientos binarios de regresión que predicen enfermedad como una función de ensayos de diagnóstico estiman la combinación óptima de los ensayos para clasificar a un sujeto como con enfermedad o no. McIntosh y Pepe, *Biometrics* 58, 657-664 (2002). Un modelo lógico de regresión puede evaluar la relación entre una variable de respuesta dependiente binaria tal como la presencia o ausencia de enfermedad y una o más variables indicadoras independientes. Los indicadores independientes pueden ser cualitativos (por ejemplo, binarios) o cuantitativos (por ejemplo, un dato final continuo). En el modelo Q-LEAD, los indicadores independientes pueden incluir marcadores biológicos tales como K-ras, BMP3 y concentración de ADN, y otros. De forma importante, el modelo incorpora las variables demográficas de género y edad, ya que se ha observado que tanto la edad como el género influyen en los niveles de marcadores moleculares en deposiciones. Como los niveles promedio de marcadores en deposiciones aumentan con la edad y el género masculino, no lo lograr ajustarse a estas variables produciría especificidad subóptima en hombres y personas ancianas ensayadas. Los coeficientes se estiman a partir de los datos de la muestra para cada término en el modelo. El resultado del modelo es un valor de riesgo para cada sujeto. Los límites para predecir el estado de enfermedad a partir de este valor de riesgo pueden determinarse para maximizar la sensibilidad y especificidad de las combinaciones de marcadores para predecir enfermedad según se desee. La inclusión de variables demográficas permite determinar estos límites como una función de la edad y el género.

Como una aplicación del modelo Q-LEAD, se realizó lo siguiente para evaluar un enfoque de ensayo cuantitativo de ADN en heces que aborda tres marcadores informativos para la detección de neoplasia colorrectal. Los sujetos incluían 34 con cáncer colorrectal, 20 con adenomas >1 cm, y 26 con colonoscopia normal. Los sujetos aportaron deposiciones con tampón de estabilización de ADN añadido, y las heces se congelaron a -80°C en 72 horas. A partir de alicuotas de heces descongeladas, se extrajo el ADN en bruto por procedimientos convencionales, y se enriquecieron los genes diana por captura de secuencia. Se cuantificaron respectivamente el valor de mutación de K-ras, la metilación del gen BMP3, y la concentración de ADN humano (245 pb de longitud) por un ensayo digital de curvas de fusión, PCR específica de metilación a tiempo real, y PCR de Alu a tiempo real, respectivamente. Los ensayos de realizaron de forma ciega. Se construyó un modelo lógico, que incorpora tres marcadores y género, para analizar la discriminación por marcadores combinados.

Las medias de edad fueron 60 para pacientes con cáncer colorrectal, 66 para aquellos con adenomas, y 61 para controles normales; y las distribuciones hombre/mujer fueron 23/11, 9/11, y 10/16, respectivamente. Las tasas de detección de neoplasias colorrectales se determinaron por marcadores cuantitativos individuales a límites de especificidad del 96 por ciento y por marcadores combinados (Tabla 1). La discriminación por marcadores combinados se calculó usando un procedimiento binomial cualitativo (cada marcador considerado como positivo o negativo en base a la especificidad individual del 96 por ciento) y por el modelo Q-LEAD (datos de sensibilidad mostrados en especificidad global del 96 por ciento).

Tabla 1. Especificidad y sensibilidad de marcadores cancerosos

Especificidad	Sensibilidad			
	Cánceres	Adenomas	Ambos	
Marcadores individuales				
mutación de k-ras	96%	42%	32%	38%
metilación de BMP3	96%	45%	32%	40%
concentración de ADN	96%	65%	40%	56%
Marcadores combinados				
Método cuantitativo	88%	90%	58%	78%
Modelo Q-LEAD	96%	90%	47%	76%

40 Por ensayo cuantitativo y análisis de múltiples variables de un panel de marcadores informativos, en ensayo del ADN en heces puede conseguir alta sensibilidad conservando al mismo tiempo elevada especificidad para la detección de neoplasia colorrectal. La combinación particular de tres marcadores de K-ras mutante, metilación de BMP3, y concentración de ADN humano representa un panel complementario de alto rendimiento.

La serie anterior de datos y los datos adicionales se analizaron del siguiente modo. Se evaluó un enfoque de ensayo cuantitativo de ADN en heces que aborda cuatro marcadores informativos para su uso en la detección de cáncer colorrectal y adenoma avanzado. Los sujetos comprendían 74 pacientes con cáncer colorrectal, 27 con un adenoma > 1 cm, y 100 con colonoscopia normal. Se recogieron deposiciones con un tampón de estabilización antes o >1 semana después de la colonoscopia y se congelaron a -80°C en 24 horas desde la recogida. A partir de alícuotas de heces descongeladas, se extrajo el ADN en bruto como se ha descrito anteriormente, y los genes diana se enriquecieron por captura específica de secuencia. Se cuantificaron de forma sensible la concentración de ADN humano, los valores de mutación de K-ras y APC, y la metilación de BMP3 por PCR de Alu a tiempo real, un ensayo digital de curvas de fusión (Zou y col., Gastroenterology, "High Detection Rates of Colorectal Neoplasia by Stool DNA Testing With a Novel Digital Melt Curve Assay," (2008)), y PCR específica de metilación a tiempo real, respectivamente. Los ensayos se realizaron de forma ciega. Se analizaron las sensibilidades y especificidades de marcadores individuales y sus combinaciones.

Las medias de edad fueron 61 para pacientes con cáncer colorrectal, 67 para aquellos con adenomas, y 59 para controles normales; y, las proporciones hombre/mujer fueron 52/22, 15/12, y 37/63, respectivamente. La tabla muestra las tasas de detección de neoplasias colorrectales por marcadores cuantitativos individuales a especificidades del 90% y por marcadores combinados a dos especificidades. (Tabla 2) Los datos de esta tabla representan una serie de preparación y no se han ajustado para la edad y el género. Además, está claro que el panel completo de Alu, K-ras, APC, y BMP3 detectó más neoplasias que cualquier marcador individual, p<0,05. Al 90% de especificidad, el panel completo detecta más adenomas >3 cm (90%, 9/10) que ≤3 cm (47%, 8/17), p<0,05, y más cánceres colorrectales en las fases III-IV (89%, 40/45) que en las fases I-II (69%, 20/29) p<0,05. Las tasas de detección de neoplasia no se vieron afectadas por la localización del tumor.

Tabla 2. Especificidad y sensibilidad de un panel de cuatro marcadores

Especificidad		Sensibilidad			
		Cánceres colorrectales		Adenomas	
		I-II	III-IV	≤ 3 cm	> 3 cm
Marcadores individuales					
mutación de APC	90%	38%	40%	47%	50%
mutación de k-ras	90%	46%	42%	24%	50%
metilación de BMP3	90%	36%	38%	12%	30%
concentración de ADN	90%	52%	76%	41%	50%
Marcadores combinados					
	90%	69%	89%	47%	90%

En conclusión, un sistema de ensayo cuantitativo de ADN en heces que incorpora un tampón de estabilización con la recogida de muestras, alta sensibilidad analítica, y un panel de marcadores ampliamente informativos puede conseguir elevadas tasas de detección tanto de cánceres colorrectales como de adenoma avanzado.

Ejemplo 2 - Modelo SITE y panel de matriz de marcadores

Puede usarse un modelo estadístico (estimación del sitio de tumor (SITE)) para predecir el sitio de tumor (por ejemplo, localización anatómica o tejido de origen) en base a las introducciones de datos de secuenciación (tal como por ácido nucleico específico o combinación de ácidos nucleicos mutados, localización específica de mutación en un ácido nucleico, y naturaleza de la mutación (por ejemplo, inserción, delección, transición, o transversión) o por cualquier combinación de los mismos) y/o los datos del polipéptido u otros tipos de marcadores.

Se desarrolló un panel de matriz de marcadores para incluir ocho genes relacionados con cáncer: K-ras, p53, APC, p16, EGFR, CTNNB1, BRAF, y SMAD4. Las frecuencias de mutación de estos genes se tabularon frente a los seis cánceres principales del tracto aerodigestivo en base a la bibliografía o las revisiones de bases de datos públicas y a las observaciones reales de secuenciación (Tabla 3). Las frecuencias de la bibliografía se obtuvieron de la base de datos de mutaciones somáticas COSMIC, artículos revisados, y textos.

Tabla 3. Panel de matriz de marcadores por sitio tumoral

Sitio de cáncer AD	p16	p53	K-ras	APC	SMAD4	EGFR	CTNNB1	BRAF
--------------------	-----	-----	-------	-----	-------	------	--------	------

Literatura

Colorrectal	<5%	50-75%	40%	85%	14%	NA	13%	20%
Pancreático	85-100%	50-60%	80-90%	10-40%	30%	NA	3-8%	<5%
Pulmón	15-25%	25-75%	20-40%	5%	7%	30%	6%	<5%
Conducto biliar	15-60%	30-60%	40%	30-40%	17%	NA	1%	14%
Gástrico	5-30%	20-50%	10%	20-60%	NA	<1%	30-50%	<5%
Esofágico	5-90%	40-90%	5-12%	5-60%	NA	NA	1%	<5%

Real (sin-dbSNP)	N									Único Total
Colorrectal	57	5%	47%	26%	75%	25%	12%	2%	30%	98%
Pancreático	24	29%	17%	62%	54%	8%	8%	4%	8%	83%
Pulmón	56	9%	57%	9%	16%	14%	14%	2%	4%	77%
Conducto biliar	15	13%	27%	13%	20%	13%	0	0	7%	67%
Gástrico	23	17%	22%	4%	35%	17%	4%	4%	0	65%
Esofágico	24	4%	46%	4%	33%	17%	4%	0	4%	79%

5 Algunas de las frecuencias incluyen otras alteraciones genéticas diferentes a simples cambios de una base y pequeñas inserciones/delecciones tales como eventos de metilación, grandes deleciones homocigóticas, y cambios en el número de copias. Dichas alteraciones no se reflejarían en la tabla de frecuencias reales. Las frecuencias reales se obtienen secuenciando regiones génicas codificantes y flanqueantes de 245 muestras tisulares de pacientes que reflejan el espectro de cánceres del tracto aerodigestivo. Solamente se tabularon las alteraciones no sinónimas y de sitio de corte y ajuste. Cuando se podía identificar sitios calientes de mutación específica para genes particulares, se analizaron solamente esos sitios.

10 El panel de matriz incluye marcadores que están presente en grados variables a través de estos tumores de modo que su uso agregado consigue una elevada sensibilidad global y permite la predicción del sitio de tumor usando el modelo SITE. El 70% de los tumores albergaban una o más mutaciones del panel de ocho genes. Algunas mutaciones génicas, como aquellas asociadas con p16, son comunes en tumores por encima del colon pero raras

para aquellos dentro del colon. K-ras mutante es frecuente con cánceres colorrectales y pancreáticos pero infrecuente en los otros cánceres. Las mutaciones en EGFR se agruparon con tumores de pulmón y colorrectales y las mutaciones en SMAD4 se agruparon con tumores de estómago y colorrectales. Genes tales como p53, están habitualmente mutados a través de diferentes tipos de cánceres, pero las localizaciones específicas de mutación o tipos de mutaciones dentro de p53 y otros genes difieren entre el sitio del tumor (por ejemplo, Greenman y col., Nature, 446(7132): 153-8 (2007); Soussi y Lozano, Biochem. Biophys. Res. Commun., 331 (3):834-42 (2005); Stephens y col., Nat. Genet., 37(6):590-2 (2005); Sjoblom y col., Science, 314(5797):268-74 (2006); Wood y col., Science, 318(5853). 1108-13 (2007); y Davies, Cancer Res., 65(17):7591-5 (2005)) y pueden tenerse en cuenta en el modelo SITE para predecir el sitio del tumor. Las sustituciones de una única base son el tipo más común de mutación en todo el panel y aquellas que predijeron tumores colorrectal incluían transversiones C-G y A-T (Figura 12). Otros sitios de tumor tenían de forma similar perfiles de cambio de base únicos. (Tabla 4) Las mutaciones de inserción/delección son las más comunes con tumores colorrectales, particularmente adenomas.

Tabla 4. Fracciones de cambio de base específica en tumores AD

TUMOR	C>T (G>A)	T>C (A>G)	G>C (C>G)	A>T (T>A)	G>T (C>A)	T>G (A>C)
Cabeza y cuello	0,38	0,12		0,38		0,12
Esofágico	0,8	0,07			0,13	
Pulmón	0,3	0,11	0,02	0,13	0,34	0,09
Estómago	0,5	0,25		0,17	0,08	
Páncreas	0,41	0,15	0,04	0,07	0,33	
Conducto biliar	0,5		0,12	0,25	0,12	
CRA	0,34	0,05	0,11	0,11	0,34	0,03
CRC	0,4	0,05	0,02	0,24	0,26	0,03

Los marcadores polipeptídicos encontrados en deposiciones, tal como por enfoques proteómicos, también pueden usarse para detectar neoplasias del tracto aerodigestivo y predecir el sitio del tumor. Se realizó lo siguiente para identificar y explorar marcadores polipeptídicos candidatos en heces para la detección discriminada de cáncer pancreático. Los sujetos incluían 16 casos con cáncer pancreático, 10 controles de enfermedad (cáncer colorrectal), y 24 controles sanos. Se recogieron deposiciones completas y se congelaron rápidamente en alícuotas a -80°C. Las alícuotas descongeladas se centrifugaron, y se analizó el sobrenadante acuoso de cada una. Los polipéptidos se separaron por electroforesis 1-D, se escindieron de los geles, y se digirieron para análisis espectrofotométrico de masas usando un LTQ-Orbitrap. Los datos de salida se buscaron usando los programas Mascot, Sequest, y XITandem frente a la base de datos Swissprot actualizada que incluía todas las especies catalogadas. Los recuentos de péptido único y los cálculos de proporción se realizaron usando el software Scaffold.

La edad media para los casos de cáncer pancreático fue 67, para controles de cáncer colorrectal 63, y para controles sanos 62; y las distribuciones hombre/mujer fueron 9/7,6/4, y 9/15, respectivamente. Usando técnicas de pistola-proteómica sobre heces, dos enzimas pancreáticas (carboxipeptidasas B y A2) fueron visibles, ya que los recuentos espectrales únicos de la primera estaban habitualmente elevados con cáncer pancreático y de la última habitualmente disminuidos. Considerados juntos como la proporción de carboxipeptidasa B/carboxipeptidasa A2, los casos de cáncer pancreático se separaron casi completamente de los grupos de cáncer colorrectal y de control sano. Las proporciones medias fueron 0,9, 0,2, y 0,3, respectivamente. A un límite de especificidad para la proporción carboxipeptidasa B/A2 al 100% (es decir, proporciones de las deposiciones de normal control y cáncer colorrectal todas por debajo del punto de corte), la sensibilidad para cáncer pancreático fue del 86 por ciento (Figura 2). Solamente dos cánceres pancreáticos se clasificaron mal.

Estos resultados demuestran que un ensayo en deposiciones de marcadores polipeptídicos puede ser un enfoque no invasivo factible para la detección de cáncer pancreático. Estos resultados también demuestran que puede usarse el análisis de múltiples variables de proporciones de polipéptidos específicos.

Además, se identificaron marcadores polipeptídicos únicos para neoplasias colorrectales (Tabla 5). Por ejemplo, se encontró serotransferrina en deposiciones de pacientes con cáncer colorrectal pero no en aquellos con cáncer pancreático. Estos marcadores cuando se consideran como parte de un panel de matriz contribuyen a la sensibilidad global para la detección de tumores y también ayudan a discriminar cáncer colorrectal de pancreático.

Tabla 5. Hallazgos positivos en deposiciones

	Carboxipeptidasa B/A2*	Serotransferrina
Cáncer colorrectal	0	60%
Cáncer pancreático	86%	0
Controles normales	0	0
*proporción > 0,75 considerados positivos		

Otro polipéptido en deposiciones que es específico de cáncer pancreático es elastasa 3A. Los procedimientos y resultados que demuestran esto son los siguientes:

5 *Preparación de heces*

Las muestras se recogieron en solución salina tamponada con fosfato y se entregaron en clínica o se enviaron en depósito de recogida. Las muestras se homogeneizaron y se congelaron en 72 horas después de recibirlas. Las heces congeladas se diluyeron 1,3 p:v en PBS (Roche, n° Cat 1666789). Las heces diluidas se mantuvieron en un bolsa de filtración (Brinkman, BA6041/STR 177 x 305 mm) durante 60 segundos en entorno de control y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30 minutos. Después de 10 minutos adicionales de centrifugación a 14.000 rpm, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm y se analizó. Se cuantificó la proteína total presente en las heces usando un kit de ensayo de proteínas de Bradford (Pierce).

Electroforesis 1-dimensional

Los sobrenadantes de las heces se diluyeron 1:1 en tampón de Leammli-BME y se procesaron en un gel de gradiente al 10,5-14%. Se cortaron lonchas verticales de 250 kDa a 15 kDa y se digirieron en gel usando procedimientos descritos en otra parte (por ejemplo, Wilm y col., Nature, 379:466-469 (1996)). Las bandas se destiñeron, se deshidrataron, se digirieron en tripsina, se extrajeron, y se liofilizaron para análisis MS.

Espectrometría de masas

Las muestras liofilizadas se reconstituyeron e inyectaron con un flujo de 500 nl/min y un gradiente de 75 minutos de acetonitrilo del al 98% 5-90%. Se realizó MS en modo dependiente de datos para cambiar automáticamente entre adquisición MS y MS² sobre los tres iones más abundantes. Se adquirieron exámenes de estudio con resolución r = 60.000 a 40 m/z usando FWHM con una acumulación diana de 10⁶ recuentos. Se aplicó una anchura de aislamiento de 2,5 m/z. La anchura de masa de exclusión fue de 0,6 m/z en el extremo inferior y de 1,5 m/x en el extremo superior. Todo el desarrollo de adquisición y procedimiento se realizó usando Xcaliber versión 2.0.

25 *Búsqueda de bases de datos todo ms/ms*

Las muestras se analizaron usando Mascot (Matrix Science, Londres, RU; versión 2.1.03), Sequest (ThermoFinnigan, San Jose, CA; versión 27, rev. 12) y X! Tandem (World Wide Web en "thegpm.org"; versión 2006.09.15.3). Mascot y X! Tandem se buscaron con una tolerancia de masa de iones del fragmento de 0,80 Da y una tolerancia de iones precursores de 10,0 PPM. Sequest se buscó con una tolerancia de masa de iones del fragmento de 1,00 Da. La nitración de tirosina se especificó en Mascot como una modificación variable.

Criterios para identificación de polipéptidos

Scaffold (versión Scaffold-01_06_06, Proteome Software Inc., Portland, OR) se usó para validar las identificaciones de polipéptidos basadas en MS/MS. Las identificaciones de péptidos se aceptaron su podían establecerse a más del 95,0% de probabilidad especificada por el algoritmo Peptide Prophet (Keller y col., Anal. Chem., 74(20):5383-92 (2002)). Las identificaciones de polipéptido se aceptaron su podían establecerse a más del 99,0 por ciento de probabilidad y contenían al menos dos péptidos identificados. Las probabilidades de polipéptido se asignaron por el algoritmo Protein Prophet (Nesvizhskii, Anal. Chem., 75(17):4646-58 (2003)). Los polipéptidos que contenían péptidos similares y no pudieron diferenciarse en base al análisis MS/MS solo se agruparon para satisfacer los principios de parsimonia.

40 *Determinación de proporción específica para elastasa 3A*

Las proporciones de elastasa 3A se determinaron usando recuentos espectrales para cada polipéptido. Las proporciones se determinaron dividiendo la cantidad de péptidos únicos de elastasa 3A (determinada usando una ID de compuesto de los módulos de búsqueda de bases de datos Mascot, XTandem, y Sequest y compilada en Scaffold) por la cantidad de péptidos únicos procedentes de otro polipéptido tal como alfa-amilasa pancreática.

Resultados

Se descubrió de forma coherente que la concentración de una enzima pancreática específica, elastasa 3A, estaba elevada en el sobrenadante fecal de pacientes con cáncer pancreático en comparación con controles normales o pacientes sin cáncer pancreático (Figura 3). Estos hallazgos indican que la concentración fecal de elastasa 3A es un marcador preciso para cáncer pancreático. Además, se descubrió que la proporción de elastasa 3A frente a otras enzimas pancreáticas (u otros polipéptidos fecales estableces) era especialmente discriminante para cáncer pancreático y obvia la necesidad de determinar las concentraciones absolutas de elastasa 3A (Figura 4). Aunque se usó espectrometría de masas para hacer estas observaciones, los niveles de elastasa 3A y las proporciones que incluyen elastasa 3A pueden medirse usando otros procedimientos también.

Ejemplo 3 - Ensayo digital de curvas de fusión para examinar mutaciones

Se desarrolló un procedimiento sensible, rápido, y asequible para examinar mutaciones en fluidos corporales a alto rendimiento. Un ensayo de curvas de fusión es una técnica post-PCR que puede usarse para examinar mutaciones en amplicones de PCR. Las mutaciones en productos de PCR pueden detectarse por cambios en la forma de la curva de fusión (heterocigoto de muestra mutante) en comparación con una muestra de referencia (homocigoto de muestra de tipo silvestre) (Figura 5). El ensayo de curvas de fusión puede examinar todas las mutaciones en un fragmento de ADN <400 pb en menos de 10 minutos, en lugar de abordar individualmente mutaciones individuales. Los ensayos de curvas de fusión regulares puede detectar mutaciones por debajo de un límite del 5% de mutante:tipo silvestre y, por tanto, no son suficientemente sensibles para detectar mutaciones en muchas muestras biológicas. Por ejemplo, en heces, se requiere una sensibilidad analítica del 1% o menos para detectar pólipos precancerosos o pequeños cánceres en fase temprana. De forma importante, puede darse un valor cuantitativo a la densidad de las mutaciones diana (Figura 6).

La PCR digital puede aumentar la sensibilidad de PCR para detectar mutaciones de baja abundancia. Las copias de genes pueden diluirse y distribuirse en 96 pocillos de una placa para aumentar el porcentaje de copias mutantes a copias de tipo silvestre en ciertos pocillos. Por ejemplo, si una muestra de ADN de heces contiene solamente un 1% de copias de BRAF mutante en comparación con copias de tipo silvestre, distribuir 300 copias de gen BRAF en una placa de 96 pocillos puede conducir a tres pocillos con una proporción mutante promedio del 33 por ciento (1:3). Después de amplificación por PCR, estos tres pocillos con copias mutantes pueden detectarse por secuenciación u otros enfoques. Como la PCR digital requiere PCR sobre una placa completa de 96 pocillos y 96 secuenciaciones (u otros enfoques) para cada diana, puede ser lenta y costosa.

El concepto de ensayo digital de curvas de fusión es combinar la capacidad de examen y la velocidad del ensayo de curvas de fusión de alta resolución con la sensibilidad de PCR digital. Miniaturizar y automatizar esta tecnología disminuye drásticamente por coste de ensayo y consigue un alto rendimiento necesario para exploración de poblaciones.

Se usó el siguiente procedimiento para realizar un ensayo digital de curvas de fusión. Para preparar una muestra de ADN, se capturaron fragmentos génicos diana (por ejemplo, BRAF, K-ras, APC, p16, etc.) de ADN fecal usando un procedimiento captura específica de secuencia y se cuantificaron con PCR a tiempo real. Se mezclaron aproximadamente 200 a 2000 copias de gen en tubo con todos los reactivos de PCR. Se distribuyó un promedio de 2 a 20 copias (variable) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. La amplificación de PCR se realizó usando cebadores específicos sobre la placa (por ejemplo, una diana por placa). Las concentraciones finales de la mezcla maestra de PCR para ensayos digitales de curvas de fusión en una placa de 96 pocillos (500 µl dispersados en 96 pocillos conteniendo cada pocillo 5 µl) fueron las siguientes: tampón de amplificación pfx 2X (Invitrogen), 0,3 mM de cada dNTP, cebador directo 200 nM, cebador inverso 200 nM, MgSO₄ 1 mM, 0,02 unidades/µl de polimerasa pfx Platinum® (Invitrogen), y 0,1 unidad/µl de colorante LcGreen+ (Idaho Tech). Se usó un ensayo de curvas de fusión de alta resolución para identificar los pocillos con copias mutantes. Opcionalmente se realizó secuenciación para confirmar 1 a 2 pocillos representativos.

En algunos casos, puede usarse PCR en emulsión en lugar de PCR digital. En dichos casos, cada gota de lípido puede convertirse en un diminuto reactor de PCR de una única molécula de gen.

Tabla 6: Sondas de captura y cebadores de ADN específicos de secuencia

Gen	Región diana	Sonda/cebador de captura	Secuencia oligo (5'→3')	SEC ID N°
KRAS	Codones 12/13	Sonda	GTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTTAAATCTTG	1
	Codones 12/13	Cebador 1	AGGCCTGCTGAAAATGACTG	2
			TTGTTGGATCATATTCGTCCAC	3

ES 2 522 542 T3

(continuación)

Gen	Región diana	Sonda/cebador de captura	Secuencia oligo (5'→3')	SEC ID N°
	Codones 12/13	Cebador 2	TAAGGCCTGCTGAAAATGAC	4
			ATCAAAGAATGGTCCTGCAC	5
	Codones 12/13	Cebador 3	CGTCTGCAGTCAACTGGAATTT	6
			TGTATCGTCAAGGCACTCTTGC	7
	Codones12/13	Cebador 4	CTTAAGCGTCGATGGAGGAG	8
			TTGTTGGATCATATTCGTCCAC	3
<i>BRAF</i>	V600E	Sonda	CCAGACAACACTGTTCAAACCTGATGGGACCCCACTCCATC	9
	V600E	Cebador	CCACAAAATGGATCCAGACA	10
			TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG	11
<i>APC</i>	MCR	Sonda 1	CAGATAGCCCTGGACAAACCATGCCACCAAGCAGAAG	12
	MCR	Sonda 2	TTCCAGCAGTGTACAGCACCTAG AAC CAAATCCAG	13
	MCR	Sonda 3	ATGACAATGGGAATGAAACAGAATCAGAGCAGCCTAAAG	14
	Codones 1286-1346	Cebador 1	TTCATTATCATCTTTGTCATCAGC	15
			CGCTCCTGAAGAAAATTCAA	16
	Codones 1346-1367	Cebador 2	TGCAGGGTTCTAGTTTATCTTCA	17
			CTGGCAATCGAACGACTCTC	18
	Codones 1394-1480	Cebador 3	CAGGAGACCCCACTCATGTT	19
			TGGCAAAATGTAATAAAGTATCAGC	20
	Codones 1450-1489	Cebador 4	CATGCCACCAAGCAGAAGTA	21
			CACTCAGGCTG GATGAACAA	22
	Codón 1554	Cebador 5	GAGCCTCGATGAGCCATTTA	23
			TCAATATCATCATCATCTGAATCATC	24
	102457delC	Cebador 6	GTGAACCATGCAGTGGAATG	25
			ACTTCTCGCTTGTTTTGAGC	26
	102457delC	Cebador 7	CAGGAGACCCCACTCATGTT	19
			CATGGTTTGTCCAGGGCTAT	27
	102457delC	Cebador 8	GTGAACCATGCAGTGGAATG	25
			AGCATCTGGAAGAAC CTGGA	28

(continuación)

Gen	Región diana	Sonda/cebador de captura	Secuencia oligo (5'→3')	SEC ID N°
TP53	Exón 4	Sonda	AAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGA	29
	Exón 4	Cebador	CCCTTCCCAGAAAACCTACC	30
			GCCAGGCATTGAAGTCTCAT	31
	Exón 5	Sonda	CATGGCCATCTACAAGCAG TCACAG CACATGACGGAG	32
	Exón 5	Cebador	CACTTGTGCCCTGACTTTCA	33
			AACCAGCCCTGTCTCTCT	34
	Exón 6	Sonda	AGTGGAAG GAAATTTGCGTG TGGAGTATTG GATGAC	35
	Exón 6	Cebador	CAGGCCTCTGATTCTACT	36
			CTTAACCCCTCTCCCAGAG	37
	Exón 7	Sonda	ATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGA	38
	Exón 7	Cebador	CTTGGGCCTGTGTTATCTCC	39
			GGGTCAGAGGCAAGCAGA	40
	Exón 8	Sonda	CGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGC	41
	Exón 8	Cebador	GGGAGTAGATGGAGCCTGGT	42
			GCTTCTTGTCCTGCTTGCTT	43

Ejemplo 4 - Detección sensible de mutaciones usando un ensayo digital de curvas de fusión

Se realizó lo siguiente para desarrollar un procedimiento cuantitativo para examinar mutaciones génicas y para evaluar la sensibilidad del procedimiento cuantitativo para detectar mutaciones diana en heces. Se diseñó un ensayo digital de curvas de fusión combinando PCR digital con un ensayo modificado de curvas de fusión. Los genes diana en baja concentración se amplificaron por PCR con un colorante de ADN saturado, LcGreen+, en una placa de 96 pocillos. Cada pocillo contenía una pequeña cantidad de copias de genes, que permitió proporciones elevadas de mutación/tipo silvestre en algunos pocillos que después se detectaron por examen de curvas de fusión usando un LightScanner. Las mutaciones se valoraron en base a la cantidad de pocillos que contenían copias mutantes en una placa de 96 pocillos. Para ensayar la sensibilidad, se hicieron adiciones de genes mutantes en una combinación de tipo silvestre a diluciones del 0,1, 0,5, 1, 5, y 10%, y se analizaron usando ensayo digital de curvas de fusión con 250-1000 copias de genes por placa de 96 pocillos. Este procedimiento se aplicó después en la detección en heces de mutaciones de APC, p53, K-ras, y BRAF de 48 pacientes que se sabe que tienen mutaciones en uno de estos genes en tejido tumoral coincidente. Los sujetos incluían 9 pacientes con cáncer pancreático, 31 con cáncer colorrectal, y 8 con adenoma colorrectal >1 cm. Todas las mutaciones detectadas por curvas de fusión digitales se confirmaron adicionalmente por secuenciación de Sanger.

El ensayo digital de curvas de fusión detectó tan poco como un 0,1% de copias mutantes para amplicones <350 pb usando una placa de 96 pocillos (Figura 7), en comparación con el límite de detección para una curva normal de fusión de ≥ 5 por ciento. Cada examen de mutación llevó 8-10 minutos con este enfoque manual. Las mutaciones de los genes APC, p53, K-ras, y BRAF se examinaron todas satisfactoriamente con curva de fusión digital de forma cuantitativa. Se detectaron mutaciones confirmadas por tejido de heces coincidentes en el 88 por ciento (42/48) de los pacientes con neoplasias gastrointestinales, incluyendo el 89 por ciento con cáncer pancreático, el 90 por ciento con cáncer colorrectal, y el 75 por ciento con adenoma colorrectal >1 cm.

Estos resultados demuestran que un ensayo digital de curvas de fusión puede ser un enfoque altamente sensible para detectar mutaciones en heces, y que tiene potencial para aplicación de diagnóstico con neoplasias gastrointestinales tanto superiores como inferiores.

Ejemplo 5 - Uso de un ensayo digital de curvas de fusión para detectar adenomas

Se usaron deposiciones archivadas para evaluar un ensayo digital de curvas de fusión de marcadores de ADN para la detección de adenomas avanzados y para comparar la precisión del ensayo digital de curvas de fusión con la de

ensayo de sangre oculta y un procedimiento de ensayo comercial de marcadores de ADN (EXACT Sciences). Los sujetos de riesgo promedio recogieron deposiciones sin un tampón conservante y las enviaron a laboratorios centrales de procesamiento para su depósito y ensayo ciego de heces por Hemocult, HemocultSENSA, y ensayo de marcadores de ADN. Todos los sujetos experimentaron una colonoscopia, y se archivó tejido de adenomas avanzados. Se seleccionaron las deposiciones de archivo de los 27 pacientes con un adenoma colorrectal >1 cm que se descubrió que albergaban K-ras mutante en análisis tisulares y de los primero 25 sujetos de edad y género coincidentes con colonoscopia normal. Se usaron procedimientos convencionales para extraer ADN en bruto de alicuotas fecales, y se enriqueció el gen K-ras por captura de secuencia. Se cuantificaron las mutaciones en el gen K-ras por un ensayo digital de curvas de fusión basado en la cantidad de pocillos que contenían copias génicas mutantes en una placa de 96 pocillos y se confirmaron por secuenciación.

La edad media con adenomas fue 67 y los controles 71; y hombres/mujeres fue 12/15 y 13/14, respectivamente. El tamaño medio del adenoma fue 1,5 cm (intervalo 1-3 cm). En base a un límite de >3 pocillos con K-ras mutante, el ensayo digital de curvas de fusión produjo una sensibilidad global del 59 por ciento para adenomas con una especificidad del 92 por ciento; la sensibilidad para adenomas >2 cm fue del 80 por ciento (8/10) y para aquellos <2 cm fue del 47 por ciento (8/17), $p=0,1$. En estas mismas deposiciones, las tasas de detección global de adenoma fueron del 7 por ciento por Hemocult, el 15 por ciento por HemocultSENSA, y el 26 por ciento por el ensayo de K-ras EXACT Sciences ($p<0,05$ para cada uno frente a la curva de fusión digital) (Figura 8). Las especificidades respectivas fueron del 92 por ciento, el 92 por ciento, y el 100 por cien.

Estos resultados demuestran que puede usarse un procedimiento de ensayo digital de curvas de fusión analíticamente sensible para detectar una mayoría de adenomas colorrectales avanzados y mejorar el rendimiento sobre los actuales enfoques de ensayo en deposiciones.

Ejemplo 6 - ADN corto como marcador de canceroso

ADN humano libre está presente en todas las deposiciones humana y surge de células desprendidas (exfoliadas) de la superficie normal (mucosa) del tracto aerodigestivo (boca/garganta, pulmones, y todos los órganos digestivos) y de tumores u otras lesiones que pueden estar presentes. Se ha aceptado generalmente que "ADN largo" en deposiciones refleja la presencia de tumores colorrectales y otros tumores del tracto aerodigestivo, porque las células exfoliadas de cánceres no experimentan muerte celular típica (apoptosis) lo que acortaría el ADN. Específicamente, como el ADN de células apoptóticas se descompondría para fragmentar longitudes más cortas a 100 pb, el ADN largo se define como más largo de 100 pb. De hecho, los niveles de ADN largo estaban elevados en deposiciones de pacientes con cánceres colorrectales y otros cánceres en comparación con aquellas de controles sanos (Zou y col., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 15:115 (2006); Ahlquist y col., *Gastroenterology*, 119:1219 (2000); y Boynton y col., *Clin. Chem.*, 49:1058 (2003)). Por tanto, el ADN largo en deposiciones puede servir como marcador para tumores colorrectales y otros tumores.

Se descubrió, sin embargo, que el "ADN corto" (es decir, <100 pb de longitud) es igual o más discriminante que el ADN largo como marcador tumoral en deposiciones para la detección tanto de neoplasia colorrectal (Figura 9) como pancreática (Figura 10).

En resumen, se usaron procedimientos y materiales similares a los descritos en otra parte para detectar ADN corto presente en muestras de heces (Zou y col., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 15(6):1115 (2006)). Se extrajo el ADN total por precipitación con isopropanol de 19 muestras de heces ciegas: 9 de adenocarcinoma pancreático, y 10 normales de edad/género coincidentes. Los sedimentos de ADN se recogieron en 8 ml de TE diluido 10 veces, pH 8. La secuencia Alu consiste en regiones conservadas y regiones variables. En la secuencia Alu consenso putativa, las regiones conservadas son el tramo de 25 pb entre las posiciones de nucleótidos 23 y 47 y el tramo de 16 pb entre las posiciones de nucleótidos 245 y 260. Aunque pueden diseñarse cebadores en cualquier parte de las secuencias Alu, para amplificar de forma más eficaz las secuencias Alu, los cebadores de PCR se localizan preferentemente de forma completa o parcial (al menos las regiones 3' de los cebadores) en las regiones conservadas. Se usaron cebadores específicos para las secuencias Alu humanas para amplificar fragmentos de diferentes longitudes dentro de las repeticiones Alu. Las secuencias fueron las siguientes:

Tamaño del amplicón	Secuencias cebadores
245 pb	Cebador directo: 5'-ACGCCTGTAATCCCAGCACTT-3' (SEC ID N° 44) Cebador inverso: 5'-TCGCCAGGCTGGAGTGCA-3' (SEC ID N° 45)
130 pb	Cebador directo: 5'-TGGTGAAACCCCGTCTCTAC-3' (SEC ID N° 46) Cebador inverso: 5'-CTCACTGCAACCTCCACCTC-3' (SEC ID N° 47)
45 pb	Cebador directo: 5'-TGGTGAAACCCCGTCTCAC-3' (SEC ID N° 46) Cebador inverso: 5'-CGCCGGCTAATTMGAT-3' (SEC ID N° 48)

El ADN de las heces se diluyó 1:5 con tampón Tris-EDTA 1x (pH 7,5) para amplificación por PCR. El ADN de heces

diluido en tampón Tris-EDTA (1 µl) se amplificó en un volumen total de 25 µl que contenía iQ SYBR Green Supermix 1x (Bio-Rad, Hercules, CA), 200 nmol/l de cada cebador en las siguientes condiciones: 95°C durante 3 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C, 60°C, y 72°C durante 30 segundos cada uno. Se creó una curva patrón para cada placa amplificando muestras diluidas en serie de factor 10 de ADN genómico humano (Novagen, Madison, WI). Se hizo análisis de curvas de fusión después de cada PCR para garantizar que solamente se amplificó un producto para todas las muestras.

La amplificación se realizó en placas de 96 pocillos en un iCycler (Bio-Rad). Cada placa consistía en muestras de ADN fecal y múltiples controles positivos y negativos. Cada ensayo se hizo por duplicado.

Se realizó lo siguiente para comparar el ADN largo (245 pb) y ADN corto (45 pb) humano en deposiciones para la detección de neoplasias del GI superior e inferior, y para evaluar el efecto del sitio del tumor del GI sobre los niveles de ADN humano en deposiciones. Los sujetos incluían 33 pacientes con cáncer colorrectal, 20 con adenomas colorrectales >1 cm, 13 con cáncer pancreático, y 33 controles colonoscópicamente normales. Los sujetos añadieron un tampón conservante a las deposiciones en el momento de la recogida para evitar el metabolismo bacteriano post-defecación del ADN, y las deposiciones se congelaron en 8 horas a -80°C. Usando un ensayo cuantitativo validado para ADN humano (Zou y col., *Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 15:1115 (2006)), se amplificaron secuencias Alu de 245 pb y 45 pb de todas las deposiciones de modo ciego. Las sensibilidades para el ADN largo y corto se basaron en límites de especificidad del 97 por ciento.

Las medias de edad fueron 60, 66, 69, y 62 para cáncer colorrectal, adenoma colorrectal, cáncer pancreático, y grupos de control, respectivamente; y las distribuciones hombre/mujer fueron 22/11, 9/11, 9/4, 11/21, respectivamente. En deposiciones de grupos con neoplasia y control, los productos de amplificación fueron cuantitativamente mayores para ADN corto frente a ADN largo. Las sensibilidades respectivas por ADN largo y corto fueron del 66 por ciento y el 62 por ciento con las 29 neoplasias colorrectales distales, el 46 por ciento y el 46 por ciento con las 24 neoplasias colorrectales proximales, y el 15 por ciento y el 31 por ciento ($p=0,16$) con los 13 cánceres pancreáticos. Por ensayo de suma de rango de Wilcoxon, el efecto del sitio de neoplasia sobre las tasas de detección fue significativo tanto para ADN largo ($p=0,004$) como para ADN corto ($p=0,02$). Entre las neoplasias colorrectales, las sensibilidades respectivas por ADN largo y corto fueron del 48 por ciento y el 52 por ciento con lesiones <3 cm, el 63 por ciento y el 63 por ciento con aquellas >3 cm, el 64 por ciento y el 61 por ciento con cánceres, y el 35 por ciento y el 45 por ciento con adenomas.

Estos resultados demuestran que el ADN corto y largo pueden ser comparablemente sensibles para la detección en heces de neoplasias del GI. Sin embargo, las tasas de detección varían con el sitio del tumor, siendo las mayores con las lesiones más distales y las inferiores con las más proximales. Estos resultados fueron coherentes con la degradación luminal sustancial del ADN exfoliado de neoplasias más proximales del GI.

También se demostró que pueden detectarse marcadores de genes mutantes en deposiciones hasta un grado mayor si el tamaño del amplicón es menor de 70 pb, coherente con la degradación luminal. Por tanto, el ADN corto puede servir como marcador per se y como tamaño diana para la detección de mutaciones.

Ejemplo 7 - Uso de BMP3 metilado fecal como marcador de neoplasia

Se encontró que las deposiciones de pacientes con tumores colorrectales contenían cantidades significativamente elevadas de copias del gen BMP3 metilado, pero se descubrió que aquellas de individuos normales no contenían ninguna o solamente cantidades traza. Cuando se ensayó el BMP3 metilado fecal con un procedimiento de amplificación apropiado, se detectaron de forma específica cánceres colorrectales y adenomas premalignos (Figura 11). El BMP3 metilado fecal detectó un porcentaje mayor de tumores proximales de colon que tumores distales, de modo que puede combinarse con marcadores para tumores colorrectales distales para crear paneles de marcadores complementarios. El BMP3 metilado fecal fue muy específico con pocas reacciones falsas-positivas.

Pueden obtenerse resultados similares usando otros genes y procedimientos tales como los descritos en otra parte (Zou y col., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 16(12):2686 (2007)).

Ejemplo 8 - Detección de cánceres del tracto aerodigestivo por ensayo de ADN en deposiciones

Se extrajeron muestras tisulares de pacientes con tumores confirmados del tracto aerodigestivo y se secuenciaron para evaluar la presencia o ausencia de alteraciones génicas somáticas. Se usó el ADN de la línea germinal de los mismos pacientes como controles. Una vez se confirmó una alteración, se ensayó una muestra de heces coincidente para esa alteración. Se utilizaron dos procedimientos diferentes para detectar la mutación en deposiciones: PCR específica de alelo y análisis digital de curvas de fusión. Para ambos procedimientos, nos centramos en la amplificación de los fragmentos más cortos posibles (> 100 pb) que han demostrado contener niveles mayores de secuencia mutante.

Curva de fusión digital (DMC)

Se estudiaron 138 pacientes (69 casos con una neoplasia en el GI y 69 controles asintomáticos con edad/sexo

coincidente con colonoscopia normal) por, primero, identificación de una mutación en tejido de neoplasia, y después determinación de si esa mutación específica podría detectar en heces de ese individuo. Se recogieron deposiciones con un tampón de estabilidad y se congelaron a -80C hasta ensayarse.

- 5 Los genes habitualmente mutados en neoplasias en el GI (TP53, KRAS, APC, CDH1, CTNNB1, BRAF, SMAD4, y P16) se secuenciaron a partir de ADN extraído de tejido tumoral, para identificar una mutación diana para cada caso. Los genes diana se aislaron por captura de híbridos (Tabla 7) y las mutaciones somáticas confirmadas por tejido se ensayaron en deposiciones por el procedimiento de curvas de fusión digitales, como se ha descrito en el Ejemplo 1. Las mutaciones detectadas en deposiciones se confirmaron por secuenciación. Se realizaron ensayos ciegos.

Tabla 7: Sondas de captura y cebadores específicos de secuencia para la detección de mutaciones de cáncer AD

MUTACIÓN EN TEJIDO	SONDA DE CAPTURA	SEC ID N°	CEBADOR CON SENTIDO 1 (5' A 3')	SEC ID N°	CEBADOR ANTISENTIDO 2(5' A 3')	SEC ID N°
12487C>CT:167Q>QX	ATGGCCATCTACAAGCAGTCATAGCACATGACGGAG-GTTGT	49	AGTACTCCCTGCCCTCAAC	128	CTCACAACTCCGTCATGTG	169
102447_102450het_delTGGT	AGAGTGAACCATGCAGTGGAAAAGTGGCATTATA-AGCCC	50	TTTGAGAGTCGTTCCGATTGC	129	CATGGTTTGTCCAGGGCTAT	27
12410G>GA,141C>CY	TTGGCCAACTGGCCAAAGACCTACCCTGTGCAG-CTGTG	51	AGTACTCCCTGCCCTCAAC	128	CTCCGTCATGTGCTGTGACT	170
102678het_dela	CAGATGCTGATACTTTAT-TAC IGCCACGGAAA-GTACT	52	TCCAGGTTCTTCCAGATGCT	130	CACTCAGGCTGGATGAACAA	22
102594_02598het_deiAGAG A	AAAGCACCTACTGCTGAAAAGAGAGTGGACCTAA-GCAAG	53	AGCTCAAACCAAGCGAGAAG	131	AGCATCTGGAAGAACCTGGA	28
102644_102645het_insG	ATG CTG CAG TTCAGAGGGTCCAGGTTCTTCCA-GATGC	54	GGACCTAAGCAAGCTG-CAGTA	132	CACTCAGGCTGGATGAACAA	22
102594_102595het_deiAG	TAAAGCACCTACTGCTGAAAAGAGAGAGTGGAC-CTAAGCAAAG	55	AGCTCAAACCAAGCGAGAAG	131	AGCATCTGGAAGAACCTGGA	28
102106het_delT	CACAGGAAGCAGATTCTGCAATACCCTGCAAA-TAGCA	56	CAGACGACACAGGAAGCAGA	133	TGCTGGATTTGGTTCTAGGG	171
102442het_delT	TTCAGAGTGAACCATGCAGGGGAATGGTAAGTGGC-ATTAT	57	TTTGAGAGTCGTTCCGATTGC	129	CATGGTTTGTCCAGGGCTAT	27
apc 102494C>CT:1429Q>QX	TCCAGATAGCCCTGGATAAACCATGCCACCAAG	58	GTGAACCATGCAGTGGAAATG	25	AGCTGTTTGAGGAGG-TGGTG	172
apc 102557C>CT: 1450R>RX	CTCAAACAGCTCAAACCAAGTGAGAAAGTACCTAAAA-ATAAA	59	ACCACCTCCTCAAACAGCTC	134	GCAGCTTGCTTAGGTCACCT	173
apc 102140het_del A	AGCAGAAAATAAAGAAAAGTTGGAACACTAGGTCA-GCTGA	60	CAGACGACACAGGAAGCAGA	133	TGCTGGATTTGGTTCTAGGG	171

(continuación)

MUTACIÓN EN TEJIDO	SONDA DE CAPTURA	SE C ID Nº	CEBADOR CON SENTIDO 1 (5' A 3')	SE C ID Nº	CEBADOR ANTISENTIDO 2(5' A 3')	SE C ID Nº
apc 102494C>CT:14290>Q/X	TCCAGATAGCCCTGGATAAACCCATGCCACCAAG	58	GTGAACCATGCAGTGGAATG	25	AGCTGTTTTGAGGAGGTGGTG,	172
apc 102554hel_dela	CTCAACAGCTCAAAACGCGAGAAGTACC TAAA	61	CATGCCACCAAGCAGAAGTA	21	GCAGCTTGCTTAGGTCCACT	173
tp53 E512647A>AG:193H>H/R	TCTGGCCCTCCTCAGCGTCTTATCCGAGTGGAAAG	62	CAGGCCTCTGATTCCTCACT	36	ACACGCAAAATTCCTTCCAC	174
tp53 E512742G>GA	CCTATGAGCCCGCCTGAGATCTGGTTGCAACTGGG	63	CATAGTGTGGTGGGCCCTA	135	AACCACCCCTTAACCCCTCCT	175
tp53 E512706C>CT:213R>R/X	ATGACAGAAACACATTTTTGACATAGTGGTGGTG	64	GTGGAAGGAAATTTGCCGTGT	136	CAGTTGCAAAACAGACCTCA	176
tp53 E512712A>AG:215S>S/G	GAAACACTTTTCGACATGGTGGTGGTGCCCTAT	65	GTGGAAGGAAATTTGCCGTGT	136	CAGTTGCAAAACAGACCTCA	176
tp53 E412388T>TC:134F>F/L	CTGCCCTCAACAAGATGCTTTGCCAACTGGCCAAG	66	TGTTCACTTGTGCCCTGACT	137	GCAGGTCTTGGCCAGTTG.	177
tp53E311606G>GA:125T>T/T	AAGTCTGTGACTTGACACAGTCAGTTGCCCTGAGGG	67	GTCTGGGCTTCTTGCAATTC	138	GCCAGGCATTGAAGTCTCAT	31
tp53 E613379C>CT:248R>RAW	GCATGGCGGGCATGAACTGGAGGCCCATCCTCACC	68	TGGCTCTGACTGTACCACCA	139	CCAGTGTGATGATGGTGAGG	178
tp53 l2E311326A>AC (sitio de corte y ajuste)	TCTTTTACCCCATCTACCGTCCCGCTGCCGTCCC	69	ACCTGGTCTCTGACTGCTC	140	GGGACAGCATCAAAATCATC	17.9
tp53 E613412G>GT:259D>D/Y	CCATCATCACACTGGAATACTCCAGGTCAGGAGCC	70	CCTCACCATCATCACACTGG	141	GGGTCAGAGGCAAGCAGA	40
tp53 E412449G>GT:154G>GA/	ACCCCGCCCGTCACCCCGCGTCC	71	GTGCAGCTGTGGGTTGATT	142	CTCCGTCATGCTGTGACT	170
tp53 E713872G>GT:298E>E/X	GGAACAGCTTTGAGGTGTGTTTTGTGCCTGTCTCT	72	GGAAGAGAATCTCCGCAAGA	143	GCCTTCTTGTCCCTGCTTGCTT	43
APC 102843C>CG:1545S>S/X	TCAGAGCAGCCTAAAGAATGAAATGAAAAACCAAG- AGAAA	73	ATGCCTCCAGTTCAGGAAAA	144	TTTTTCTGCCCTCTTCTCTTGG	180
tp53 E412392G>GT:135C>C/F	CCTCAACAAGATGTTTTTCCAACTGGCCAAGACCT	74	TGCCCTGACTTTCAACTCTGT	145	CTGCACAGGGCAGGCTCT	181
APC 102557C>CT:1450R>R/X	CTCAAAACAGCTCAAAACCAAGTGAAGTACCTAAAA- ATAAA	59	ACCACCTCTCAAAACAGCTC	134	GCAGCTTGCTTAGGTCCACT	173
tp53 E713819G>T:280R>I	CCTGTCTGGGATAGACCCGGCGCAC	75	CTACTGGGACGGAAACAGCTT	146	GCGGAGATTCTCTTCTCTG	182

(continuación)

MUTACIÓN EN TEJIDO	SONDA DE CAPTURA	SE C ID Nº	CEBADOR CON SENTIDO 1 (5' A 3')	SE C ID Nº	CEBADOR ANTISENTIDO 2(5' A 3')	SE C ID Nº
tp53 I3E411326A>AC(sitio de corte y ajuste)	TCITTTACCCCATCTACCGTCCCGCTTGCCCGTCCC	69	ACCTGGTCCCTCTGACTGCTC	140	GGGGACAGCATCAAAATCATC	179
tp53 E713412G>GT:259D>D/Y	CCATCATCACACTGGAATACTCCAGGTCAGGAGCC	70	CCTCACCATCATCACACTGG	141	GGGTCAGAGGCAAGCAGA	40
tp53 E512449G>GT:154G>G/V	ACCCCGCCCGTCCACCCGCGTCC	71	GTGCAGCTGTGGGTTGATT	142	CTCCGTCATGTGCTGTGACT	170
tp53 E813872G>GT:298E>E/X	GGAGCCTCACCACTAGCTGCCCGCCAGG	76	GGAAGAGAATCTCCGCAAGA	143	GCTTCTTGCTCCTGCTTGCTT	43
tp53 E813813C>CG:278P>P/R	GTGTTGTGCGCTGTCGTTGGGAGAGACCCGGCG	77	CTACTGGGACGGAAACAGCTT	146	GCGGAGATTCTCTTCCCTCTG	182
tp53 E813851A>AT:291K>K/X	GGAAGAGAAATCTCCGCTAGAAAAGGGAGCCTCA	78	GCGCACAGAGGAAGAAATC	147	TTCCTTGCTCCTGCTTGCTTACC	183
smad4 E219049G>GA:118A>A/A	GTAAATATTGTCAGTATGCATTTGACTTAAAATGT-GATAG	79	AGGTGGCCTGATCTTCACAA	148	TGGATTACACAGACACTA-TCACA	184
tp53 E813777G>GA:266G>G/E	TAGTGGTAATCTACTGGAACGGAAACAGCTTTG-AGGTG	80	TTTCCCTTACTGCCTCTTGCTT	149	CACAAAACACGGCACCTCAAAG	185
tp53 E612653T>TC:195I>I/T	CCTCCTCAGCATCTTACCCGAGTGGAAGGAAAT	81	CAGGCCTCTGATTCCTCACT	36	ACACGCAAAATTTCCCTCCAC	174
tp53 E713379C>CT:248R>R/W	GCATGGCGGCGCATGAACTGGAGGCCCATCCCTCACC	68	TGGCTCTGACTGTACCACCA	139	CCAGTGTGATGATGGTGAGG	178
tp53 E612647A>AG:193H>H/R	TCTGGCCCTCCTCAGCGTCTTATCCGAGTGGAAAG	62	CAGGCCTCTGATTCCTCACT	36	ACACGCAAAATTTCCCTCCAC	174
tp53 E612712A>AG:215S>S/G	GAAACACTTTTCGACATGGGTGGTGGTGCCCTAI	65	GTGGAAGGAAATTTGCGGTG	136	CAGTTGCAAAACCCAGACCTCA	176
tp53 E813872G>GT:298E>E/X	GGAGCCTCACCACTAGCTGCCCGCCAGG	76	GGAAGAGAATCTCCGCAAGA	143	GCTTCTTGCTCCTGCTTGCTT	43
tp53 E713370G>GA:245G>G/S	AGTTCCTGCATGGCAGCATGAACCCGGAGGC	82	TGGCTCTGACTGTACCACCA	139	CCAGTGTGATGATGGTGAGG	178
tp53 E411580het_delG	CTGGGCTTCTTGCAATCTGGACAGCCAAGTCTGTGA	83	CCCTTCCCAGAAAACCTTACC	30	ACTGACCGTGCAAAGTCACAG	186
tp53E512524A>AG:179H>H/R	TGCCCGCCACCGTGAGCGCTGC	84	TGGCCATCTACAAGCAGTCA	150	CTGCTCACCATCGCTATCTG	187
tp53E612661G>GT:198E>E/X	TCAGCATCTTATCCGAGTGTAAAGGAAATTTGCGGT-GTGGG	85	CAGGCCTCTGATTCCTCACT	36	CCAAATACTCCACACCGCAAA	188

(continuación)

MUTACIÓN EN TEJIDO	SONDA DE CAPTURA	SE CID Nº	CEBADOR CON SENTIDO 1 (5' A 3')	SE CID Nº	CEBADOR ANTISENTIDO 2(5' A 3')	SE CID Nº
tp53E813872G>GT;298E>E/X	GGAGCCTCACCACCTAGCTGCCCCCCAGG	76	GGAAGAGAATCTCCGCAAGA	143	GCTTCTTTCCTGCTTGCCT	43
apc 102494C>CT; 1429Q>Q/X	TCCAGATAGCCCTGGATAAACCCATGCCACCAAG	58	CAGGAGACCCCACTCATGTT	19	TGGCAAAAATGTAATAAAAGTA- TCAGC	20
apc 102557C>CT;1450R>R/X	CTCAAAACAGCTCAAAACCAAGTGAGAAAGTACCTAAAA- ATAAAA	59	CAGGAGACCCCACTCATGTT	19	TGGCAAAAATGTAATAAAAGTA- TCAGC	20
apc 102140het_delA	AGCAGAAAAATAAAGAAAAAGTTGGAACCTAGGTCA- GCTGA	60	TTCATTATCATCTTTGTCA- TCAGC	15	CGCTCCTGAAGAAAAATTCAC	16
apc 102494C>CT; 1429Q>Q/X	TCCAGATAGCCCTGGATAAACCCATGCCACCAAG	58	CAGGAGACCCCACTCATGTT	19	TGGCAAAAATGTAATAAAAGTA- TCAGC	20
apc 102134G>GT;1309E>E/X	TGCAAAATAGCAGAAAAATAAAGATTGGAACCTA- GGTCA	86	TTCATTATCATCTTTGTCA- TCAGC	15	CGCTCCTGAAGAAAAATTCAC	16
apc 102554het_delA	CTCAAACAGCTCAAAACCAAGCGAGAAGTACCTAAA	61	CAGGAGACCCCACTCATGTT	19	TGGCAAAAATGTAATAAAAGTA- TCAGC	20
apc 102852het_snsA	CTAAAGAAATCAAAATGAAAAAACAAGAGAAAGAGG- CAGAA	87	GAGCCTCGATGAGCCATTTA	23	TCAATATCATCATCATCTGAA- TCATC	24
kras 5571G>GA;12G>G/D	GTGGTAGTTGGAGCTGATGGCGTAGGCAAGAGT	88	AGGCCTGCTGAAAAATGACTG	2	TGTTGGATCATAATTCCG- TCCAC	3
tp53 E412392G>GA;135C>C/Y	CCTCAACAAGATGTTTACCAACTGGCCAAGACCT	89	TGTTCACTTGTGCCCTGACT	137	GCAGGCTTTGGCCAGTTG	177
tp53 E512655C>CT;196R>R/X	CCTCCTCAGCATCTTATCTGAGTGGAAAGGAAATTTGC	90	CAGGCCTCTGATTCCTCACT.	36	ACACGCAAAATTTCCCTTCCAC	174
tp53 E613350G>GA;238C>C/Y	TCCACTACAACATACATGTATAACAGTTCTGTCATGGG	91	TGGCTCTGACTGTACCACCA	139	CCAGTGTGATGATGGTGAGG	178
tp53 E613420G>GA	CACCTGGAAGACTCCAGATCAGGAGCCACTTTGCC	92	CCTCACCATCATCACACTGG	141	GGGTCAGAGGCAAGCAGA	40
tp53 E512712A>AG;215S>S/G	GAAACACTTTTCGACATGGTGTGGTGGTGCCTAT	65	GTGGAAGGAAATTTGCCGTGT	136	CAGTTGCAAAACCAGACCTCA	176
kras 5571G>GA;12G>G/D	GTGGTAGTTGGAGCTGATGGCGTAGGCAAGAGT	88	AGGCCTGCTGAAAAATGACTG	2	TGTTGGATCATAATTCCG- TCCAC	3

(continuación)

MUTACIÓN EN TEJIDO	SONDA DE CAPTURA	SE C ID Nº	CEBADOR CON SENTIDO 1 (5' A 3')	SE C ID Nº	CEBADOR ANTISENTIDO 2(5' A 3')	SE C ID Nº
p16 (ink4a) E1 19638A>AT	GGAGAGGGGGAGTGCAGGCAGCGGG	93	AGCCAGTCAGCCCGAAGG	151	GAGGGGCTGGCTGGTC	189
p16 (ink4a) E2 23353G>GT; 447D>D/Y	CCCAACTGGCCCTACCCCGCCACTC	94	CACCCTGGCTCTGACCAT	152	GGGTGGGTGAGAGTGG	190
p16(ink4a)E119638A>AT	GGAGAGGGGGAGTGCAGGCAGCGGG	93	AGCCAGTCAGCCCGAAGG	151	GAGGGGCTGGCTGGTC	189
p16 (ink4a) E2 23402het_delIT	GCCCCGGAGGGGCTCCT-GGACACGCTG	95	GACCCCGCCACTCTCAC	153	CAGCTCCTCAGCCAGGTC	191
p16 (ink4a) E2 23403C>CA; 484F>F/	GCCCCGGAGGGGCTTACTGGACACGCTGGT	96	GACCCCGCCACTCTCAC	153	CAGCTCCTCAGCCAGGTC	191
ctnrb 1 25541het delIT	CAATGGGTCAATACACAGATTCTTTTTTTAAATAA- AAGTAACA	97	ATATTTCAATGGGTCAAT- CACAG	154	TCAATCAGCTATAAATACG- AACA	192
cdh1 E976435het_delA	TCTTATCTCAAAAAGAAACAACAAAAAAGAGGAATCC- TTTAG	98	GCCATGATCGCTCAAAATACA	155	TCTCAGGGGGCTAAAAGGATT	193
cdh1 E1743_744het_insAGCCCTGC GCCC A	GCGCCAGCCCTGCGCCCATTCCTC	99	ACTTGCAGGGGACGCATT	156	GAAGAAGGGAAGCGGTGAC	194
cdh1 E1386853_86854het_insA	AAGTAAGTCCAGCTGGCAAAAGTGACTCAGCCCTTT- GACTT	100	C.ATTCTGGGGATTCTTGGAG	157	GAAATAAACCTCCTCCA- TTTTT	195
cdh1 E1491472C>CT;751N>N/N	AGGATGACACCCCGGACAAATGTTTATTACTATGA- TGAAG	101	CTGTTTCTTCGGAGGAGAGC	158	CCGCTCCTTCTTCATCATA	196
cdh1 E1592868_92896het_delITTGAC TTGA GCCAGCTGCACAGGG- GCCTG	TTTTTTCTCCAAAAGGACTGACGCTCGGCCCTGAAGTG	102	TTCCTACTCTTTCATTGTACTT- CAACC	159	TGCAACGTCGTTACGAGTCA	197
cdh1 E4 71669het_delA	CAAGCAGAAATTGCTCACTTTCCCAACTCCTCTCC	103	CGTTTCTGGAATCCAAAGCAG	160	GCAGCTGATGGGAGGAATAA	198
cdh1E774926G>GA;289A>A/T	GGTCACAGCCACACAGACGGACGATGATGAA	104	CCAGGAACCTCTGTGATGGA	161	TGAGGATGGTGAAGCGGATG	199

(continuación)

MUTACIÓN EN TEJIDO	SONDA DE CAPTURA	SE C ID N°	CEBADOR CON SENTIDO 1 (5' A 3')	SE C ID N°	CEBADOR ANTISENTIDO 2(5' A 3')	SE C ID N°
cdh1E1736_742het_deITCGGCC	AGCCCTGCGCCCTTCCCTCTCCCG	105	ACTTGCAGGGACGCATT	156	GAAGAAAGGGAAGCGGTGAC	194
p16 (lnk4a) E1 19638A>AT	GGAGAGGGGAGTGCAGGCAGCGGG	93	AGCCAGTACGCCGAAGG	151	GAGGGCTGGCTGGTC	189
lp53 E412365A>AG,126Y>Y/C	TTCCCTTCCCTACAGTGTCCCGTGCCTCAAC	106	CACITGTGCCCTGACTTTCA	33	GCCAGTTGGCAAAACATCT	200
lp53 E412548G>GA	TGCTCAGATAGCGATGATGAGCAGCTGGGGCTG	107	CACATGACGGAGGTTGTGAG	162	AACCAGCCCTGTGGTCTCT	34
p16 (lnk4a) E1 19810T>TG,491I>I/S	GGTCGAGGGCCGAGCCAGGTGGGTAGA	108	TTCCAAATCCCCCTGCAAA	163	CCCAACGGCACCGGAATAGT	201
lp53 E7 13757G>GA	GCTTCTCTTTTCCCTATCCTAAGTAGTGGTAATCT- ACTGG	109	GGGACAGGTAGGACCTGATT	164	AGCTGTTCCCGTCCCAGTAGA	202
lp53 E713815G>GC,279G>G/R	TTGTGCCTGTCCCTCGGAGACACCGGGG	110	CTACTGGGACGGAAACAGCTT	146	GCGGAGATTCTCTTCCCTCTG	182
lp53 E7 13816G>GA,279G>G/E	TGTGCCCTGTCCCTGAGAGAGACCGGGGC	111	CTACTGGGACGGAAACAGCTT	146	GCGGAGATTCTCTTCCCTCTG	182
lp53 E5 12365A>AC,126Y>Y/S	TTCCCTTCCCTACAGTCTCCCTGCCCTCAAC.	112	CACITGTGCCCTGACTTTCA	33	GCCAGTTGGCAAAACATCT	200
lp53 E512491A>AT,168H>H/L	TCTACAAGCAGTCACAGCTCATGACGGAGGTT- GTGGA	113	TGGCCATCTACAAGCAGTCA	150	CTGCTCACCATCGCTATCTG	187
		113	TGGCCATCTACAAGCAGTCA	150	TCACCATCGCTATCTGAGCA	203
		113	TGGCCATCTACAAGCAGTCA	150	AACCAGCCCTGTGGTCTCT	34
kras 5570G>GC, 12G>G/R	GTTGGTAGTTGGAGCTGATGGCGTAGGCAAGAGT	88	AGGCCCTGCTGAAAATGACTG	2	TTGTTGGATCATATTCGTCCA	3
lp53 E713370G>GA,245G>G/S	AGTTCCCTGCAATGGGACAGCATGAACCGGAGGC	82	TGGCTCTGAGTGTACCACCA	139	GCAGTGTGATGATGGTGAGG	178

(continuación)

MUTACIÓN EN TEJIDO	SONDA DE CAPTURA	SE C ID Nº	CEBADOR CON SENTIDO 1 (5' A 3')	SE C ID Nº	CEBADOR ANTISENTIDO 2(5' A 3')	SE C ID Nº
ape 102864_102865het_delAG	AAATGAAAACCAAGAGAAAAGGCAGAAAAAATAATT- GATTC	114	TGACAAATGGGAATGAAACAGA	165	GGTCCTTTTTCAGAAATCAATA- GTTTT	204
tp53 E512386T>TC,133M>M/T	CCTGCCCTCAACAAGACGTTTTGCCCAACTGGCC	115	TGTTCACTTGTGCCCTGACT	137	GCAGGTCITGGCCAGTTG	177
cdh1 E1593059OGA	GCTCATCTTAAGCTCAGGAAGAGTTGTGTCAAAAA- TGAGA	116	CCAAAGCATGGCTCATCTCTA	205	CTCAGGCAAGCTGAAAAACAT	206
tp53 E813798G>GA:273R>R/H	CGGAACAGCTTTGAGGTGCATGTTGTGCTGTC- CTGGG	117	CTACTGGGACGGAAACAGCTT	146	GCGGAGATTTCTTCCCTCTG	182
p53 E6.12698_12701het_delAC(1 ó 2 repeticiones AC)	TGGAAGGAAATTTGCCGTGGAGTATTTGGATGACA G	118	GTGGAAGGAAATTTGCCGTG	136	CAGTTGCAAAACCAGACCCTCA	176
P53 E8.13824C>CT282R>R/W	TGTCCCTGGGAGAGACTGGCGCACAGAGGAAGAGAA T	119	CTACTGGGACGGAAACAGCTT	146	GCGGAGATTTCTTCCCTCTG	182
APC102151G>GA.1314R>R/R	AAGAAAAGATTGGAAC TAGATCAGCTGAAGATC- CTGTG	120	CAGACGACACAGGAAGCAGA	133	GTGACACTGCTGGAACCTCG	207
P53 E5 12457 G>G/T	CGCCCGCACCCGCTCCCGCCCATGGCCA	121	GTGCAGCTGTGGGTTGATT	142	CTCCGTCATGTGCTGTGACT	170
p53 E8 13812C>CG:278P>P/A	GTGTTTGTGCCGTGCTGGGAGAGACC GGCG	122	CTACTGGGACGGAAACAGCTT	146	GCGGAGATTTCTTCCCTCTG	182
APC 102688het_delA	AGGTTCTCCAGATGCTGATACITTTATTACATTTTGC	123	CTGCAGTTCCAGAGGGTCCAG	210	CACTCAGGCTGGATGAACAA	22
APC het_delAG entre 102594_102603 (1 de 5 repeticiones AG)	GCGAGAAGTACCTAAAAATAAAGCACCTACTGCTGA A	124	AGCTCAAAACCAAGCGAGAAG	131	AGCATCTGGAAGAACCCTGGA	28
APC 102240C>CA.1344S>S/X	CAGGGTTCTAGTTTATCTTTAAGAAATCAGCCAGGCACA	125	CCCTAGAACC AAAATCCAGCA	166	TGTCTGAGCACCACTTTTGG	208

(continuación)

MUTUACIÓN EN TEJIDO	SONDA DE CAPTURA	SEC ID N°	CEBADOR CON SENTIDO 1 (5' A 3')	SEC ID N°	CEBADOR CON SENTIDO 2 (5' A 3')	SEC ID N°
102676_102660delACATT	CCAGATGCTGATACTT- TATTTTGGCCACG GAAAG- TACTC	126	CTGCAGTTCAGAGGGTC-CAG	167	CACT CAG GCTGGAT- GAACAA	22
12487C>CT: 167Q>Q/X	ATGGCCATC TACAAG- CAG TCATAG CACATGAC G- GAGGTTGT	49	AGTACTCCCCCTGCCCT-CAAC	128	CTCACAACTCCCGTCAT-GTG	169
102447_102450het_delTGGT	AG AG TG AAC C ATG C AG T-GGAAAAGTGGCAT-TATAAGCCC	50	TTT G AG AGTCGTTTCG ATT - GC	129	CATGGTTTGTCCAG-GGCTAT	27
12410G>GA, 141C>C/Y	TTTGCCAACTGGCCAA-GACCTACCCCTGTGCAGCT-GTG	51	AGTACTCCCCCTGCCCT-CAAC	128	CTCCGTCATGTGCTGT-GACT	170
102678het_delA	CAGATGCTG ATACTTTAT- TACTTTTGGCCACGGAAA- TACT	52	TCCAGGTT CTTCCAGAT - GCT	130	CACT CAG GCTGGAT- GAACAA	22
102594_102598het_delAGA GA	AAAGCACCTACTGCTGAAA GAGAGTGGACCTAAGCAA G :	127	AGCTCAAACCAAGCGA-GAAG	131	AG CAT CTG GAAGAACCCT - GGA	28
102776A>AT: 1523R>R/X	ATGACAATGGGAAT- GAAACAGAATCAGAG- CAGCCTAAAG	14	TTTGCCACGGAAAG-TACTCC	168	TTTCTGAACTGGAG-GCATT	209
102644_102645 het_ins G	ATGCTG CAG TT CAGAG-GGGTCCAGGTTCTTCCA-GATGC	54	GGACCTAAGCAAGCT-GCAGTA	132	CACT CAG GCTGGAT- GAACAA	22
102594_102595het_del AG	TAAAGCACCTACTGCT- GAAAAGAGAGAGTGGAC- CTAAGCAAAG	55	AGCTCAAACCAAGCGA-GAAG	131	AG CAT CTG GAAGAACCCT - GGA	28
102106het_delT	CACAG GAAAG CAGATT CT - GCAATACCCCTGCAAAATAG- CA	56	CAGACGACACAGGAAAGCA-GA	133	TGCTGGATTTGGTTCTAG-GG	171
102442het_delT	TT CAGAGT GAACCAT - GCAGGGAATGGTAAGT- GGCATTTAT	57	TTT G AG AGTCGTTTCG ATT - GC	129	CATGGTTTGTCCAG-GGCTAT	27
ape 102494C>CT: 1429Q>Q/X	TCCAGATAGCCCTGGA- T AAAC CATGCCACCCAAG	58	GTGAACCATGCAGT-GGAATG	25	AGCTGTTTGTGAGGAGGT-GGTG	172
ape 102140het_delA	AGCAG AAATAAAA- GAAAAG TTGG AACTAGGT- CAGCTGA	60	CAGACGACACAGGAAAGCA-GA	133	TGCTGGATTTGGTTCTAG-GG	171
ape 102554het_delA	CT CAAACAG CT CAAAC- CAGCGAGAAGTACTTAAA	61	CATGCCACCAAGCAGAAG-TA	21	G CAG CTTGCTT AGGTC- CACT	173

5 No se detectaron mutaciones diana en deposiciones de control. Se detectaron mutaciones diana en deposiciones del 68% (47/69) de los pacientes con una neoplasia en el GI. Específicamente, se detectaron mutaciones diana en deposiciones del 71% (36/51) de los pacientes con cáncer [40% (2/5) con orofaríngeo, 65% (11/17) con esofágico, 100% (4/4) con gástrico, 55% (6/11) con pancreático, 75% (3/4) con biliar o de vesícula biliar, y 100% (10/10) con colorrectal] y del 61%(11/18) con precánceres [100% (2/2) con neoplasia mucinosa papilar intraductular pancreática y 56% (9/16) con adenoma colorrectal avanzado]. Las copias mutantes en genes recuperados de las deposiciones promediaron un 0,4% (intervalo 0,05-13,4%) para neoplasias supracolónicas y un 1,4% (0,1-15,6%) para neoplasias colorrectales, $p=0,004$ (Tabla 8).

Tabla 8: Detección digital de curvas de fusión de mutaciones validadas en deposiciones de pacientes con cáncer AD

Nº	ID	Sitio	Edad	Género	Mutaciones tisulares		Detección de deposición	Frecuencia de mutación %	Control normal
1	1163	Cabeza/Cuello (faringe)	73	M	tp53		SI	0,8	Neg.
2	1250	Cabeza/Cuello (faringe)	49	M	tp53		NO		Neg.
3	1295	Cabeza/Cuello (faringe)	47	F	tp53		NO		Neg.
4	1391	Cabeza/Cuello	65	M	tp53	TP53	NO (ambas)		Neg.
5	1427	Cabeza/Cuello	60	M	tp53	tp53	SI (p53-1), No (n53-2)	0,05	Neg.
1	745	Esófago	84	F	tp53		SI	0,4	Neg.
2	769	Esófago	56	F	tp53		SI	0,4	Neg.
3	782	Esófago	55	M	tp53		NO		Neg.
4	789	Esófago	61	M	tp53		SI	1,6	Neg.
5	819	Esófago	53	M	tp53		SI	0,2	Neg.
6	873	Esófago	61	M	tp53		SI	0,2	Neg.
7	906	Esófago	55	M	APC		SI	0,8	Neg.
8	1049	Esófago	57	M	tp53		NO		Neg.
9	1064	Esófago	72	F	tp53		NO		Neg.
10	1067	Esófago	72	M	tp53		SI	0,7	Neg.
11	1103	Esófago	78	M	tp53		NO		Neg.
12	1199	Esófago	66	M	tp53		SI	0,5	Neg.
13	1307	Esófago	51	M	tp53		NO		Neg.
14	1373	Esófago	76	M	tp53		SI	0,5	Neg.

(continuación)

Nº	ID	Sitio	Edad	Género	Mutaciones tisulares			Detección de deposición	Frecuencia de mutación %	Control normal
15	1414	Esófago	66	M	tp53			SI	0,1	Neg.
16	1448	Esófago	82	M	tp53			NO		Neg.
17	1072	Esófago			tp53			SI	0,4	Neg.
1	798	Estómago	81	M	cdhl			SI	13,2	Neg.
3	1221	Estómago	55	M		cdhl	cdhl	SI (ambas)	8,1,3	Neg.
4	1224	Estómago	75	F	smad4	cdhl		SI(smad4), NO(CDH1)	0,2	Neg.
5	1402	Estómago	56	M	APC	tp53		SI (p53)	0,1	Neg.
1	848	Vesícula biliar	67	M	tp53			SI	0,1	Neg.
2	1315	Vesícula biliar	57	F	tp53			SI	1,4	Neg.
1	1043	Conducto biliar	51	F	APC			NO		Neg.
2	1554	Conducto biliar	77	M	cdh1			SI	13,4	Neg.
1	757	Cáncer pancreático in situ	78	M	k-ras			SI	0,2	Neg.
2	1349	Cáncer pancreático in situ	64	M	k-ras			SI	0,2	Neg.
1	839	Páncreas	69	F	tp53			SI	0,2	Neg.
2	1204	Páncreas	65	F		p16		No		Neg.
3	1253	Páncreas	63	F	K-ras	tp53		SI (K-ras), No (p53)	2	Neg.
4	1400	Páncreas	71	F	tp53	k-ras		NO (ambas)		Neg.
5	1547	Páncreas	77	F	tp53			NO		Neg.
6	1217	Páncreas			K-ras			NO		Neg.

(continuación)

Nº	ID	Sitio	Edad	Género	Mutaciones tisulares			Detección de deposición	Frecuencia de mutación %	Control normal
					K-ras	P53	APC			
7	1073	Páncreas			K-ras		NO		Neg.	
8	532	Páncreas			K-ras		SI	1	Neg.	
9	1592	Páncreas			K-ras	P53	SI (ambas)	0,3	Neg.	
10	1695	Páncreas			K-ras		SI	0,2	Neg.	
11	1058	Páncreas			K-ras	P53	SI (K-ras)	0,2	Neg.	
1	438	Cáncer colorrectal	78	F		APC	SI	1,2	Neg.	
2	446	Cáncer colorrectal	74	M	BRAF		SI	0,4	Neg.	
3	529	Cáncer colorrectal	46	M	K-RAS		SI	1	Neg.	
4	489	Cáncer colorrectal	73	M	K-RAS		SI	2,6	Neg.	
5	549	Cáncer colorrectal	79	M	BRAF		SI	1,6	Neg.	
6	551	Cáncer colorrectal	69	M	K-RAS		SI	5,8	Neg.	
7	584	Cáncer colorrectal	68	M	K-RAS		SI	1,4	Neg.	
8	894	Cáncer colorrectal	57	M	P53	APC	SI (p53, APC)	1,6, 5	Neg.	
9	998	Cáncer colorrectal	45	F	APC	K-RAS	SI (K-ras, APC)	0,6, 0,8	Neg.	
10	1009	Cáncer colorrectal	65	F	P53		SI	12,9	Neg.	
1	513	Adenoma colorrectal	65	F	APC		SI	0,1	Neg.	
2	546	Adenoma colorrectal	61	M	APC		NO		Neg.	
3	547	Adenoma colorrectal	52	F	APC		NO		Neg.	
4	568	Adenoma colorrectal	52	M	APC		SI	7,8	Neg.	
5	578	Adenoma colorrectal	71	F	APC		NO		Neg.	

(continuación)

Nº	ID	Sitio	Edad	Género	Mutaciones tisulares		Detección de deposición	Frecuencia de mutación %	Control normal
6	590	Adenoma colorrectal	54	F	APC		SI	3,2	Neg.
7	701	Adenoma colorrectal	72	F	APC		NO		Neg.
8	855	Adenoma colorrectal	75	M	K-RAS		SI	0,4	Neg.
9	860	Adenoma colorrectal	53	M	APC		SI	15,6	Neg.
10	900	Adenoma colorrectal	64	F	APC	K-RAS	NO (ambas)		Neg.
11	962	Adenoma colorrectal	56	M	K-RAS		SI	1	Neg.
12	965	Adenoma colorrectal	82	M	APC	K-RAS	NO (ambas)		Neg.
13	991	Adenoma colorrectal	79	M	APC	K-RAS	SI (K-ras), No (APC)	0,2	Neg.
14	1135	Adenoma colorrectal	59	M	K-RAS		SI	13	Neg.
15	1231	Adenoma colorrectal	50	M	APC		NO		Neg.
16	1559	Adenoma colorrectal		-	K-RAS		SI	1	Neg.

También se realizó un estudio piloto inicial con 10 muestras de heces de pacientes con cánceres confirmados del conducto biliar para determinar si la tecnología DMC podía detectar mutaciones en k-ras, un gen bien caracterizado

que se sabe que está mutado en esta población. Se detectaron mutaciones en K-ras en deposiciones para 3/10 o 4/10 cánceres del conducto biliar (dependiendo del valor de mutación de 5 ó 3, respectivamente) (Tabla 9). Como K-ras es mutante en el 30-40% de los cánceres del conducto biliar, estos resultados indican que el ensayo de detección está consiguiendo la proporción apropiada de muestras de cáncer.

5 Tabla 9. Valores de mutación en K-ras para pacientes con cáncer del conducto biliar

Ejemplo Nº	Patología	Valor de mutación en K-ras	Mutación detectada	
			A	B
520	Cáncer BD	0		
528	Cáncer BD	0		
559	Cáncer BD	0		
558	Cáncer BD	1	Codón 12 GAT	
515	Cáncer BD	2	Codón 12 GAT	
543	Cáncer BD	2	Codón 13 GAC	
806	Cáncer BD	3	Codón 12 TGT	
539	Cáncer BD	5	Codón 12 GAT	Codón 13 GGA
512	Cáncer BD	6	Codón 12 GAT	Codón 12 GAT
725	Cáncer BD	25	Codón 13 GAC	Codón 12 GAT; Codón 12 GTT

PCR específica de alelo

10 El ensayo de PCR específica de alelo fue una versión modificada de un procedimiento previamente publicado (por ejemplo, Cha y col., Mismatch Amplification Mutation Assay (MAMA): Application to the c-H-ras Gene PCR Methods and Applications, 2:14-20 (1992) Cold Spring Harbor Laboratory). Se capturaron fragmentos del gen TP53 a partir de muestras de ADN fecal con sondas específicas para mutaciones identificadas en el tejido coincidente (Tabla 7). Se evaluaron los números de copias por cPCR. Las muestras se ajustaron a 10.000 fragmentos cada una y se amplificaron con series de cebadores específicos de alelo.

Muestra	Cebador F	Cebador R
A745	GACAGAAACACTTTAT (SEC ID Nº 211)	CGGCTCATAGGG (SEC ID Nº 217)
A848	ACACTTTTCGACAAG (SEC ID Nº 212)	AAACCAGACCTCAG (SEC ID Nº 218)
A789	CCTCAACAAGATAC (SEC ID Nº 213)	CAGCTGCACAGG (SEC ID Nº 219)
A782	GCCGCCTGAAA (SEC ID Nº 214)	AGACCCAGTTGC (SEC ID Nº 220)
A873	GCGGCATGAAAT (SEC ID Nº 215)	TTCCAGTGTGATGAT (SEC ID Nº 221)
A769	CCCCTCCTCAGAG (SEC ID Nº 216)	CTTCCACTCRGATAA (SEC ID Nº 222)

15 El cebador directo en cada caso es específico para cada mutación de TP53.

Esófago y estómago

20 Abordando las mutaciones encontradas en cánceres esofágicos o aquellos de la unión gastroesofágica (en p53, APC, o K-ras), se detectó la misma mutación por PCR específica de alelo en deposiciones coincidentes en cinco de cinco (100%) cánceres pero en ninguno de los controles (Tabla 10). El ciclo umbral (Ct), indica el ciclo de PCR en el que el producto entra en la fase exponencial de amplificación.

Vesícula biliar

25 Abordando una mutación confirmada en un cáncer de vesícula biliar, se encontró la misma mutación en las deposiciones coincidentes de ese paciente usando PCR específica de alelo (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de PCR cuantitativa específica de alelo mutante para cánceres del tracto aerodigestivo coincidentes

Muestra	Gen	Nº de fragmentos	Ct	
A769	cáncer esofágico/gástrico	p53	10K	71
N	normal	p53	10K	>80
A782	cáncer esofágico/gástrico	p53	10K	38,8
N	normal	p53	10K	44,1

(continuación)

A745	cáncer esofágico/gástrico	p53	30K	42,5
N	normal	p53	30K	45,6
A873	cáncer esofágico/gástrico	p53	30K	37,8
N	normal	p53	30K	40,4
A848	cáncer de la vesícula biliar	p53	10K	22,4
N	normal	p53	10K	36,3
A789	cáncer esofágico/gástrico	p53	10K	25,9
N	normal	p53	10K	28,7

Ejemplo 9 - Marcadores polipeptídicos fecales candidatos identificados para cáncer colorrectal y adenomas precancerosos

5 Se identificó la siguiente lista de polipéptidos por un modelo de análisis estadístico usando todos los datos generados a partir de espectros de masas de extractos de proteínas fecales: β 2-macroglobulina, proteína C3 del complemento, serotransferrina, haptoglobina, anhidrasa carbónica 1, xaa-pro dipeptidasa, inhibidor de elastasa de leucocitos, hemoglobina, glucosa-6-fosfato, y catalasa. Esta lista de polipéptidos está en orden de diferencia de la normalidad. Por tanto, la abundancia espectral media para β 2-macroglobulina es la más diferente de la normalidad para cáncer y adenoma.

10 La significancia estadística de la abundancia relativa de polipéptidos entre normalidad, adenoma, y cáncer colorrectal (CRC) se obtuvo usando datos de recuento espectral normalizados a partir de un modelo de regresión de poisson de ceros inflados como término de compensación en el análisis de expresión diferencial específica de proteína. El análisis de expresión diferencial también incorporaba el modelo de regresión de poisson de cero inflados. Los polipéptidos después se clasificaron de acuerdo con su significancia estadística y si el perfil de expresión seguía el patrón clínicamente relevante de Normal < Adenoma < CRC. Usando una norma de que un ensayo positivo requería que fueran positivos tres cualesquiera de seis marcadores principales, la sensibilidad y especificidad de este panel fueron del 100% en una serie de preparación.

Los polipéptidos enumerados pueden usarse individualmente o en cualquier combinación para detectar cáncer colorrectal o adenomas precancerosos.

20 **Ejemplo 10 - Identificación de marcadores polipeptídicos para cáncer pancreático**

Se identificaron marcadores polipeptídicos potenciales para la predicción de cáncer pancreático. Utilizando una comparación lado a lado Scaffold (Proteome Software) de abundancias espectrales, se compararon las proporciones de los recuentos espectrales de carboxipeptidasa B (CBPB1_HUMAN) y carboxipeptidasa A1 (CBPA1_HUMAN). Un valor para carboxipeptidasa B/A1 de 0,7 o mayor fue predictivo de cáncer pancreático (en deposiciones normales, se observó una proporción promedio de 2:3 B/A1). La especificidad para los datos de preparación fue del 100% con una sensibilidad del 88%, mientras que la sensibilidad de una serie de validación fue del 82% a la misma especificidad.

Ejemplo 11- Uso de ALX4 metilado fecal como marcador de neoplasia

30 Se descubrió que las deposiciones de pacientes con tumores colorrectales contenían cantidades significativamente elevadas de copias del gen ALX4 metilado, pero se descubrió que aquellas de individuos normales no contenían ninguna o solamente cantidades traza. Cuando se ensayó ALX4 metilado fecal con un procedimiento de amplificación apropiado, se detectaron específicamente cánceres colorrectales y adenomas premalignos. Al 90% de especificidad, ALX4 metilado fecal detectó el 59% de cáncer colorrectal y el 54% de adenomas premalignos, permitiendo la detección tanto de cáncer colorrectal como de adenomas premalignos.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> Mayo Foundation for Medical Education and Research
- <120> Detección de neoplasia
- 40 <130> MAFO001PEP02
- <150> EP 09 711 056.3

<141> 11-02-2009
 <150> PCT/US2009/033793
 <151> 11-02-2009
 5
 <150> US 61/029.221
 <151> 15-02-2008
 <160> 222
 10 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 37
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 20 <400> 1
 gtggacgaat atgatccaac aatagaggta aatcttg 37
 <210> 2
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 30 <400> 2
 aggcctgctg aaaatgactg 20
 <210> 3
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 40 <400> 3
 ttgttgatc atattgtcc ac 22
 45 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <400> 4
 55 taaggcctgc tgaaaatgac 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <400> 5
 65 atcaaagaat ggtcctgcac 20

<210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <400> 6
 10 cgtctgcagt caactggaat tt 22
 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 20 <400> 7
 tgtatcgtca aggcactctt gc 22
 <210> 8
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 30 <400> 8
 cftaagcgtc gatggaggag 20
 <210> 9
 <211> 37
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <400> 9
 ccagacaact gttcaaactg atgggacca ctccatc 37
 45 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <400> 10
 55 ccacaaaatg gatccagaca 20
 <210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <400> 11
 65 tgcttgctct gataggaaaa tg 22

5
 <210> 12
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10
 <400> 12
 cagatagccc tggacaaacc atgccaccaa gcagaag 37

15
 <210> 13
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
 <400> 13
 ttccagcagt gtcacagcac cctagaacca aatccag 37

25
 <210> 14
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 14
 atgacaatgg gaatgaaaca gaatcagagc agcctaaag 39

35
 <210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 15
 tcattatca tcttgtcat cagc 24

45
 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 16
 cgctcctgaa gaaaattcaa 20

55
 <210> 17
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

65
 <400> 17
 tgcagggttc tagttatct tca 23

ES 2 522 542 T3

5
<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10
<400> 18
ctggcaatcg aacgactctc 20

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
15
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
<400> 19
caggagacc cactcatggt 20

<210> 20
<211> 25
25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
<400> 20
tggcaaatg taataaagta tcagc 25

<210> 21
<211> 20
35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 21
catgccacca agcagaagta 20

45
<210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 22
55
cactcaggct ggatgaaca 20

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
60
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 23
65
gagcctcgat gagcattta 20

<210> 24
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <400> 24
 10 tcaatatcat catcatctga atcatc 26
 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 20 <400> 25
 gtgaaccatg cagtggaatg 20
 <210> 26
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 30 <400> 26
 acttctcgct tggttgagc 20
 <210> 27
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 40 <400> 27
 catggttgt ccaggctat 20
 <210> 28
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 50 <400> 28
 agcatctgga agaactgga 20
 <210> 29
 <211> 37
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <400> 29
 65 aagaccagg tccagatgaa gctccagaa tgccaga 37

ES 2 522 542 T3

5
<210> 30
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10
<400> 30
ccctcccag aaaacctacc 20

<210> 31
<211> 20
<212> ADN
15
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
<400> 31
gccaggcatt gaagtctcat 20

<210> 32
<211> 37
25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
<400> 32
catggccatc tacaagcagt cacagcacat gacggag 37

<210> 33
<211> 20
35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 33
cacttggtcc ctgacttca 20

45
<210> 34
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 34
55
aaccagccct gtcgtctct 19

<210> 35
<211> 37
<212> ADN
60
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 35
65
agtgaagga aattgcgtg tggagtatt ggatgac 37

<210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <400> 36
 caggcctctg attcctcact 20
 10
 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 20
 <400> 37
 cftaacccct cctcccagag 20
 <210> 38
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 30
 <400> 38
 atgtgtaaca gttcctgcat gggcggcatg aaccgga 37
 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 40
 <400> 39
 cftgggcctg tggtatctcc 20
 45
 <210> 40
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <400> 40
 gggtcagagg caagcaga 18
 55
 <210> 41
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <400> 41
 cgcacagagg aagagaatct cgcgaagaaa ggggagc 37
 65

ES 2 522 542 T3

5
<210> 42
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 42
10 gggagtagat ggagcctggt 20

<210> 43
<211> 20
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 43
20 gcttctgtc ctgcttgctt 20

<210> 44
<211> 21
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 44
30 acgcctgtaa tccagcact t 21

<210> 45
<211> 19
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 45
40 tcgcccaggc tggagtgca 19

<210> 46
<211> 20
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 46
50 tggtgaaacc ccgtctctac 20

<210> 47
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 47
60 ctactgcaa cctccacctc 20

65

ES 2 522 542 T3

5
<210> 48
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 48
cgccccgcta attttgat 20

15
<210> 49
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
<400> 49
atggcatct acaagcagtc atagcacatg acggaggtg t 41

25
<210> 50
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
<400> 50
agagtgaacc atgcagtgga aaagtggcat tataagccc 39

35
<210> 51
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

40
<400> 51
ttgccaact ggccaagacc taccctgtgc agctgtg 37

45
<210> 52
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 52
cagatgctga tacttatta ctttgccac ggaaagtact 40

55
<210> 53
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 53
aaagcaccta ctgctgaaag agagtggacc taagcaag 38

65

ES 2 522 542 T3

5
<210> 54
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 54
atgctgcagt tcagaggggt ccaggttctt ccagatgc 38

<210> 55
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
<400> 55
taaagcacct actgctgaaa agagagagtg gacctaagca ag 42

<210> 56
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
<400> 56
cacaggaagc agattctgca atacctgca aatagca 37

<210> 57
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

40
<400> 57
tcagagtga accatgcagg gaatgtaag tggcattat 39

<210> 58
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 58
tcagatagc cctggataaa ccatgccacc aag 33

<210> 59
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 59
ctcaaacagc tcaaaccaag tgagaagtac ctaaaataa a 41

65

ES 2 522 542 T3

5
<210> 60
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 60
10 agcagaaata aaagaaaagt tggactagg tcagctga 38

<210> 61
<211> 34
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 61
20 ctcaaacagc tcaaaccagc gagaagtacc taaa 34

<210> 62
<211> 35
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente
30

<400> 62
tctggcccct cctcagcgtc ttatccgagt ggaag 35

<210> 63
<211> 35
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente
40

<400> 63
cctatgagcc gcctgagatc tggttgcaa ctggg 35

<210> 64
<211> 35
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente
50

<400> 64
55 atgacagaaa cacttttga catagtgtgg tggg 35

<210> 65
<211> 35
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 65
65 gaaacacttt tcgacatggt gtggtgtgc cctat 35

ES 2 522 542 T3

5
<210> 66
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 66
10 ctgccctcaa caagatgctt tgccaactgg ccaag 35

<210> 67
<211> 35
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 67
20 aagtctgtga cttgcacagt cagttgccct gaggg 35

<210> 68
<211> 35
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 68
30 gcatgggagg catgaactgg aggccatcc tcacc 35

<210> 69
<211> 35
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 69
40 tctttcacc catctaccgt ccccttgcc gtccc 35

<210> 70
<211> 35
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 70
50 ccatcatcac actgaatac tccaggtcag gagcc 35

<210> 71
<211> 23
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 71
60 accccgccc gtcaccgcg tcc 23

65

ES 2 522 542 T3

5
<210> 72
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 72
10 ggaacagctt tgagggtgtg gttgtgcct gtcct 35

<210> 73
<211> 39
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 73
20 tcagagcagc ctaaagaatg aatgaaaac caagagaaa 39

<210> 74
<211> 35
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 74
30 cctcaacaag atgttttcc aactggccaa gacct 35

<210> 75
<211> 25
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 75
40 cctgtcctgg gatagaccgg cgcac 25

<210> 76
<211> 27
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 76
50 ggagcctcac cactagctgc cccagg 27

<210> 77
<211> 31
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 77
60 gtgtttgtgc ctgtcgtggg agagaccggc g 31

65

ES 2 522 542 T3

5
<210> 78
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 78
10 ggaagagaat ctccgctaga aaggggagcc tca 33

<210> 79
<211> 41
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 79
20 gftaaatatt gtcagtatgc attgactta aaatgtgata g 41

<210> 80
<211> 37
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente
30

<400> 80
tagtgtaat ctactggaac ggaacagctt tgaggtg 37

<210> 81
<211> 33
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 81
cctcctcagc atcttaccg agtgaagga aat 33
45

<210> 82
<211> 31
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 82
55 agttcctgca tgggcagcat gaaccggagg c 31

<210> 83
<211> 36
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 83
65 ctgggcttct tgcatctgg acagccaagt ctgtga 36

ES 2 522 542 T3

5
<210> 84
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 84
10 tgccccacc gtagcgctg c 21

<210> 85
<211> 39
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 85
20 tcagcatctt atccgagtgt aaggaaattt gcgtgtgga 39

<210> 86
<211> 41
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 86
30 tgcaaatagc agaaataaaa taaaagattg gaactaggtc a 41

<210> 87
<211> 39
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 87
40 ctaaagaatc aaatgaaaaa ccaagagaaa gaggcagaa 39

<210> 88
<211> 33
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 88
50 gtgtagttg gagctgatgg cgtaggcaag agt 33

<210> 89
<211> 35
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 89
60 cctcaacaag atgtttacc aactggccaa gacct 35

65

ES 2 522 542 T3

5
<210> 90
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10
<400> 90
cctcctcagc atcttatctg agtgaagga aattgc 37

15
<210> 91
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
<400> 91
tccactacaa ctacatgtat aacagttcct gcatggg 37

25
<210> 92
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 92
cactggaaga ctccagatca ggagccactt gcc 33

35
<210> 93
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 93
ggagaggggg agtgcaggca gcggg 25

45
<210> 94
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

55
<400> 94
ccaactgcg cctacccgc cactc 25

60
<210> 95
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 95
gcccgggagg gctcctggac acgctg 26

ES 2 522 542 T3

5
<210> 96
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 96
gcccgggagg gcttactgga cacgctggt 29

15
<210> 97
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
<400> 97
caatgggtca tatcacagat tcttttttt aaattaaagt aaca 44

25
<210> 98
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
<400> 98
tcttatctca aaagaacaac aaaaaagagg aatcctttag 40

35
<210> 99
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

40
<400> 99
gcgcccagcc ctgcgccat tctc 25

45
<210> 100
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 100
aagtaagtcc agctggcaaa gtgactcagc ctttgactt 39

55
<210> 101
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 101
aggatgacac ccgggacaat gtttattact atgatgaag 39

65

5
 <210> 102
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10
 <400> 102
 tttttctcc aaaggactga cgctcggcct gaagtg 36

15
 <210> 103
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
 <400> 103
 caagcagaat tgctcacttt cccaactcct ctcc 34

25
 <210> 104
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 104
 ggtcacagcc acagacacgg acgatgatgt gaa 33

35
 <210> 105
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 105
 agccctgagc cccttctct cccg 24

45
 <210> 106
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

55
 <400> 106
 ttctcttcc tacagtgctc cctgcccctc aac 33

60
 <210> 107
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 107
 tgctcagata gcgatgatga gcagctgggg ctg 33

5 <210> 108
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

 10 <400> 108
 ggtcggaggc cgagccaggt gggtaga 27

 <210> 109
 <211> 39
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

 20 <400> 109
 gctctcttt tcctatccta agtagtgga atctactgg 39

 <210> 110
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 30
 <400> 110
 ttgtcctgt cctcggagag accggcg 27

 <210> 111
 <211> 27
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

 <400> 111
 tgtcctgtc ctgagagaga ccggcgc 27

 45 <210> 112
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

 <400> 112
 55 ttctcttc tacagtctc cctgccctc aac 33

 <210> 113
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

 <400> 113
 65 tctacaagca gtcacagctc atgacggagg ttgtga 37

ES 2 522 542 T3

5
<210> 114
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 114
10 aaatgaaaac caagagaaag gcagaaaaa ctattgattc 40

<210> 115
<211> 33
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 115
20 cctgccctca acaagacgtt ttgccaactg gcc 33

<210> 116
<211> 41
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 116
30 gctcatctct aagctcagga agagttgtgt caaaaatgag a 41

<210> 117
<211> 39
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 117
40 cggaacagct ttgagtgca tgtttgtgcc tgcctctggg 39

<210> 118
<211> 37
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 118
50 tgaaggaaa ttgctgtg gagtattgg atgacag 37

<210> 119
<211> 36
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 119
60 tgcctggga gagactggcg cacagaggaa gagaat 36

65

<210> 120
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <400> 120
 10 aagaaaagat tggaactaga tcagctgaag atcctgtg 38
 <210> 121
 <211> 30
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 20 <400> 121
 cgcccggcac ccgcttccgc gccatggcca 30
 <210> 122
 <211> 31
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 30 <400> 122
 gtgtttgtgc ctgtgctggg agagaccggc g 31
 <210> 123
 <211> 37
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 40 <400> 123
 aggttctcc agatgctgat actttattac atttgc 37
 <210> 124
 <211> 37
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 50 <400> 124
 55 gcgagaagta cctaaaata aagcacctac tgctgaa 37
 <210> 125
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <400> 125
 65 cagggtcta gttatctta agaatcagcc aggcaca 37

ES 2 522 542 T3

5
<210> 126
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 126
10 ccagatgctg atactttatt ttgccacgga aagtactc 38

<210> 127
<211> 38
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 127
20 aaagcaccta ctgctgaaag agagtgacc taagcaag 38

<210> 128
<211> 20
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 128
30 agtactcccc tgcctcaac 20

<210> 129
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 129
40 ttgagagtc gttcgattgc 20

<210> 130
<211> 20
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 130
50 tccaggttct tccagatgct 20

<210> 131
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 131
60 agctcaaacc aagcgagaag 20

65

5 <210> 132
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

 10 <400> 132
 ggacctaagc aagctgcagt a 21

 15 <210> 133
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

 20 <400> 133
 cagacgacac aggaagcaga 20

 25 <210> 134
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

 <400> 134
 accacctct caaacagctc 20

 35 <210> 135
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

 <400> 135
 catagtgtgg tggcgccta 20

 45 <210> 136
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

 <400> 136
 gtggaaggaa attgcgtgt 20

 55 <210> 137
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

 <400> 137
 tgtcacttg tgccctgact 20

 65

ES 2 522 542 T3

5
<210> 138
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10
<400> 138
gtctgggctt cttgcattct 20

<210> 139
<211> 20
<212> ADN
15
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
<400> 139
tgctctgac tgtaccacca 20

<210> 140
<211> 20
25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
<400> 140
acctgtctct ctgactgctc 20

<210> 141
<211> 20
35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 141
cctcacatc atcacactgg 20

45
<210> 142
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 142
55
gtgcagctgt gggttgatt 19

<210> 143
<211> 20
<212> ADN
60
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

65
<400> 143
ggaagagaat ctccgcaaga 20

ES 2 522 542 T3

5
<210> 144
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10
<400> 144
atgctccag ttcaggaaa 20

<210> 145
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
<400> 145
tgcctgact tcaactctg t 21

25
<210> 146
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

35
<400> 146
ctactggac ggaacagctt 20

<210> 147
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

45
<400> 147
gcgcacagag gaagagaatc 20

50
<210> 148
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

60
<400> 148
aggtggcctg atctcaca 20

<210> 149
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 149
ttccttact gccttctgct tc 22

ES 2 522 542 T3

5
<210> 150
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10
<400> 150
tggccatcta caagcagtca 20

<210> 151
<211> 17
<212> ADN
15
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
<400> 151
agccagtcag ccgaagg 17

<210> 152
<211> 18
25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
<400> 152
caccctggct ctgacat 18

<210> 153
<211> 17
35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

40
<400> 153
gaccccgcca ctctcac 17

45
<210> 154
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 154
atattcaat gggcatatc acag 24
55
<210> 155
<211> 20
<212> ADN
60
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 155
65
gcatgatcg ctcaaataca 20

5
 <210> 156
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10
 <400> 156
 acttgcgagg gacgcatt 18

15
 <210> 157
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
 <400> 157
 cattctgggg attcttgag 20

25
 <210> 158
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
 <400> 158
 ctgtttcttc ggaggagac 20

35
 <210> 159
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

40
 <400> 159
 ttctactct tcattgtact tcaacc 26

45
 <210> 160
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

55
 <400> 160
 cgtttctgga atccaagcag 20

60
 <210> 161
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

65
 <400> 161
 ccaggaacct ctgtgatgga 20

<210> 162
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <400> 162
 cacatgacgg aggttgtag 20
 10
 <210> 163
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 20
 <400> 163
 ttccaattcc cctgcaa 18
 <210> 164
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 30
 <400> 164
 gggacaggta ggacctgatt t 21
 <210> 165
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 40
 <400> 165
 tgacaatggg aatgaaacag a 21
 45
 <210> 166
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <400> 166
 ccctagaacc aatccagca 20
 55
 <210> 167
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <400> 167
 ctgcagtca gaggtccag 20
 65

ES 2 522 542 T3

5
<210> 168
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10
<400> 168
ttgccacgg aaagtactcc 20

<210> 169
<211> 20
<212> ADN
15
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
<400> 169
ctcacaacct ccgtcatgtg 20

<210> 170
<211> 20
<212> ADN
25
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
<400> 170
ctccgtcatg tgctgtgact 20

<210> 171
<211> 20
<212> ADN
35
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

40
<400> 171
tgctggattt ggttctaggg 20

<210> 172
<211> 20
<212> ADN
45
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

50
<400> 172
agctgttga ggagtggtg 20

<210> 173
<211> 20
<212> ADN
55
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

60
<400> 173
gcagcttgc taggtccact 20

65

5
 <210> 174
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10
 <400> 174
 acacgcaaat ttcttcac 20

<210> 175
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
 <400> 175
 aaccacctt aaccctct 20

<210> 176
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
 <400> 176
 cagttgcaaa ccagacctca 20

<210> 177
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

40
 <400> 177
 gcaggtcttg gccagttg 18

45
 <210> 178
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

55
 <400> 178
 ccagtgat gatggtgagg 20

<210> 179
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

65
 <400> 179
 ggggacagca tcaaatcatc 20

ES 2 522 542 T3

5
<210> 180
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10
<400> 180
ttttctgcc tcttctctt gg 22

<210> 181
<211> 18
<212> ADN
15
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
<400> 181
ctgcacaggg caggtctt 18

<210> 182
<211> 20
<212> ADN
25
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
<400> 182
gcggagattc tcttctctg 20

<210> 183
<211> 21
<212> ADN
35
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

40
<400> 183
ttctgtcct gcttgcttac c 21

45
<210> 184
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

55
<400> 184
tgattcaca cagacactat caca 24

<210> 185
<211> 20
<212> ADN
60
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

65
<400> 185
cacaacacg cacctcaaag 20

ES 2 522 542 T3

5
<210> 186
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10
<400> 186
actgaccgtg caagtcacag 20

<210> 187
<211> 20
<212> ADN
15
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
<400> 187
ctgctacca tcgctatctg 20

<210> 188
<211> 20
25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
<400> 188
ccaaatactc cacacgcaa 20

<210> 189
<211> 16
35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 189
gaggggctgg ctggtc 16

45
<210> 190
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 190
55
gggtcgggtg agagtgg 17

<210> 191
<211> 18
60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

65
<400> 191
cagctcctca gccaggtc 18

ES 2 522 542 T3

5
<210> 192
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 192
tcaaatcagc tataaatagc aaaca 25

15
<210> 193
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
<400> 193
tctcaggggg ctaaaggatt 20

25
<210> 194
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
<400> 194
gaagaaggga agcgggtgac 19

35
<210> 195
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

40
<400> 195
ggaaataaac ctcctccatt ttt 23

45
<210> 196
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 196
ccgcctcctt cttcatcata 20

55
<210> 197
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 197
tgcaacgtcg ttacgagtca 20

65

5
 <210> 198
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10
 <400> 198
 gcagctgatg ggaggaataa 20

<210> 199
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
 <400> 199
 tgaggatggt gtaagcgatg 20

<210> 200
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
 <400> 200
 gccagttggc aaaacatct 19

<210> 201
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

40
 <400> 201
 cccaacgcac cgaatagt 18

45
 <210> 202
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 202
 agctgttccg tccagtaga 20

55
 <210> 203
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 203
 tcaccatcgc tatctgagca 20

65

ES 2 522 542 T3

5
<210> 204
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 204
ggtccttttc agaatcaata gtttt 25

15
<210> 205
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
<400> 205
ccaaagcatg gctcatctct a 21

25
<210> 206
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
<400> 206
ctcaggcaag ctgaaaacat 20

35
<210> 207
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

40
<400> 207
gtgacactgc tggacttcg 20

45
<210> 208
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 208
tgctgagca ccacttttg 20

55
<210> 209
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 209
tttctgaac tggaggcatt 20

65

ES 2 522 542 T3

5
<210> 210
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10
<400> 210
ctgcagtca gaggtccag 20

<210> 211
<211> 16
<212> ADN
15
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
<400> 211
gacagaaaca cttat 16

<210> 212
<211> 15
25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
<400> 212
acacttttcg acaag 15

<210> 213
<211> 14
35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

40
<400> 213
cctcaacaag atac 14

45
<210> 214
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 214
gccgctgaa a 11
55
<210> 215
<211> 12
<212> ADN
60
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

65
<400> 215
gcggcatgaa at 12

5
 <210> 216
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10
 <400> 216
 cccctcctca gag 13

<210> 217
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

20
 <400> 217
 cggctcatag gg 12

<210> 218
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

30
 <400> 218
 aaaccagacc tcag 14

<210> 219
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

40
 <400> 219
 cagctgcaca gg 12

45
 <210> 220
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 220
 agaccccagt tgc 13

55
 <210> 221
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 221
 ttccagtgtg atgat 15

65

<210> 222
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

10

<400> 222
cttcactcg gataa 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de detección de cáncer en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento determinar si una muestra de heces de dicho mamífero comprende o no un valor de mutación elevado de K-ras, un estado de metilación elevado de BMP3, y un nivel elevado de ADN humano en comparación con un control normal, en el que la presencia de dicho valor de mutación elevado de K-ras, dicho estado de metilación elevado de BMP3, y dicho nivel elevado de ADN humano indica que dicho mamífero tiene cáncer colorrectal.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho valor de mutación de K-ras se mide por análisis digital de curvas de fusión.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho K-ras está representado por la secuencia de nucleótidos de la Figura 13.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho valor de mutación de K-ras es medido por PCR cuantitativa específica de alelo.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho BMP3 está representado por la secuencia de nucleótidos de la Figura 14.
- 15 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho estado de metilación elevado de BMP3 es medido por PCR específica de metilación a tiempo real.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho nivel elevado de ADN humano es medido por PCR a tiempo real.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho ADN humano comprende una repetición Alu.

20

Figura 1

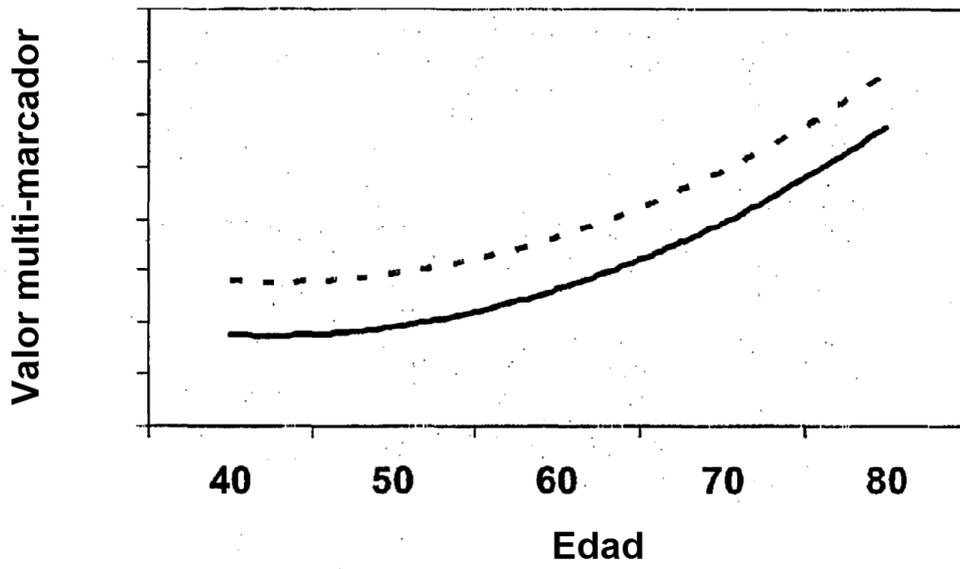


FIGURA 2

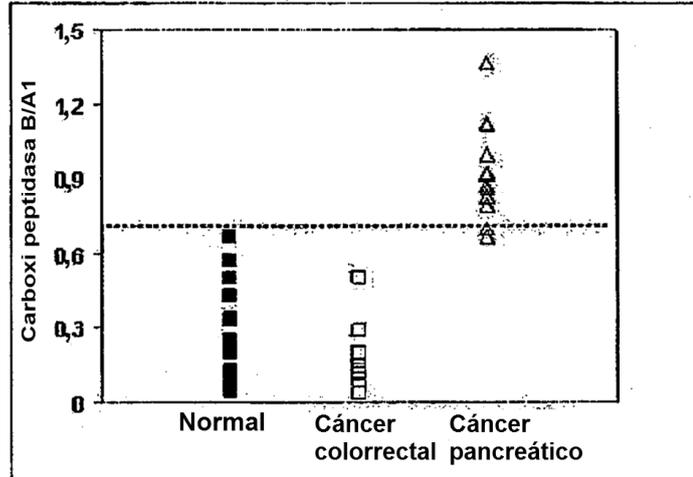


FIGURA 3

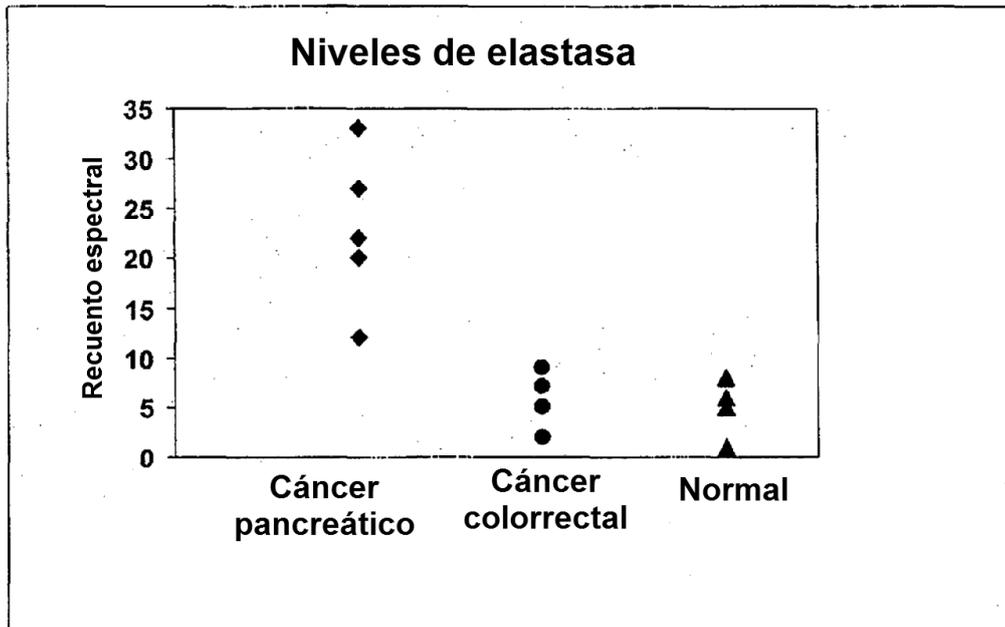


FIGURA 4

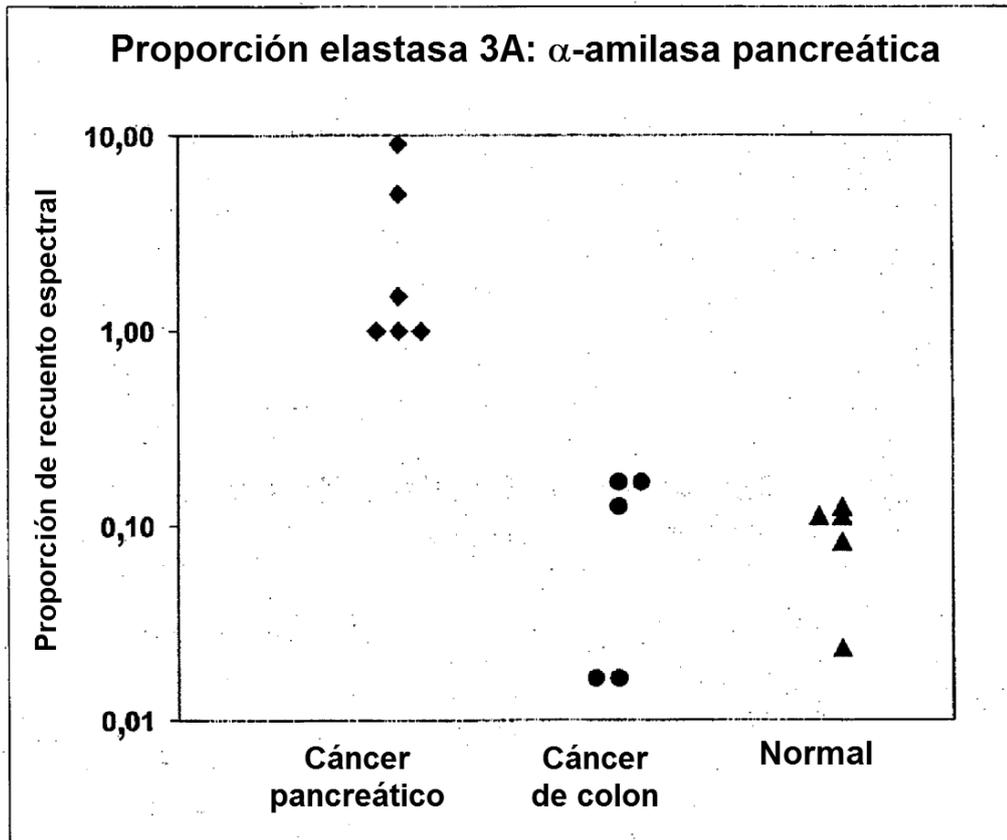
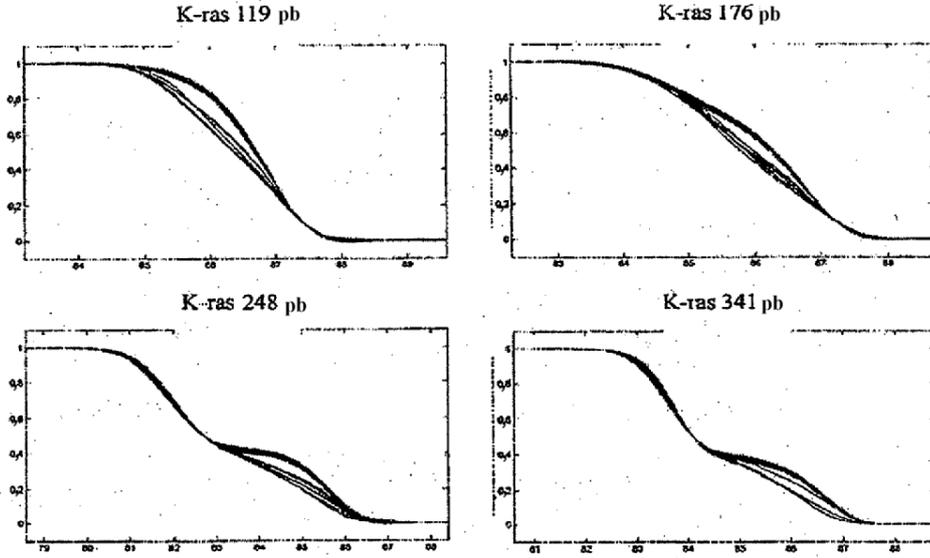


FIGURA 5

A. Mutación en K-ras (5571G>T,12G>V)



B. Mutación en APC (102457delC)

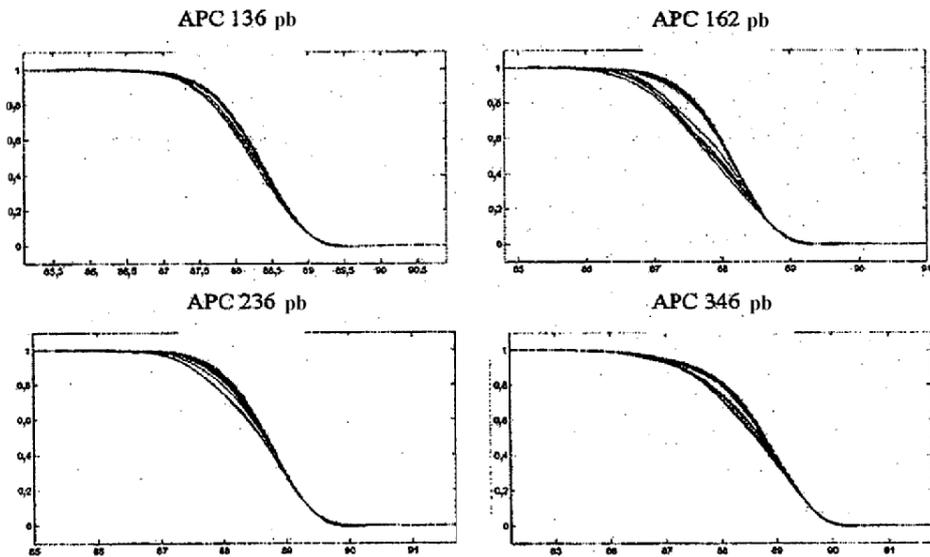


FIGURA 6

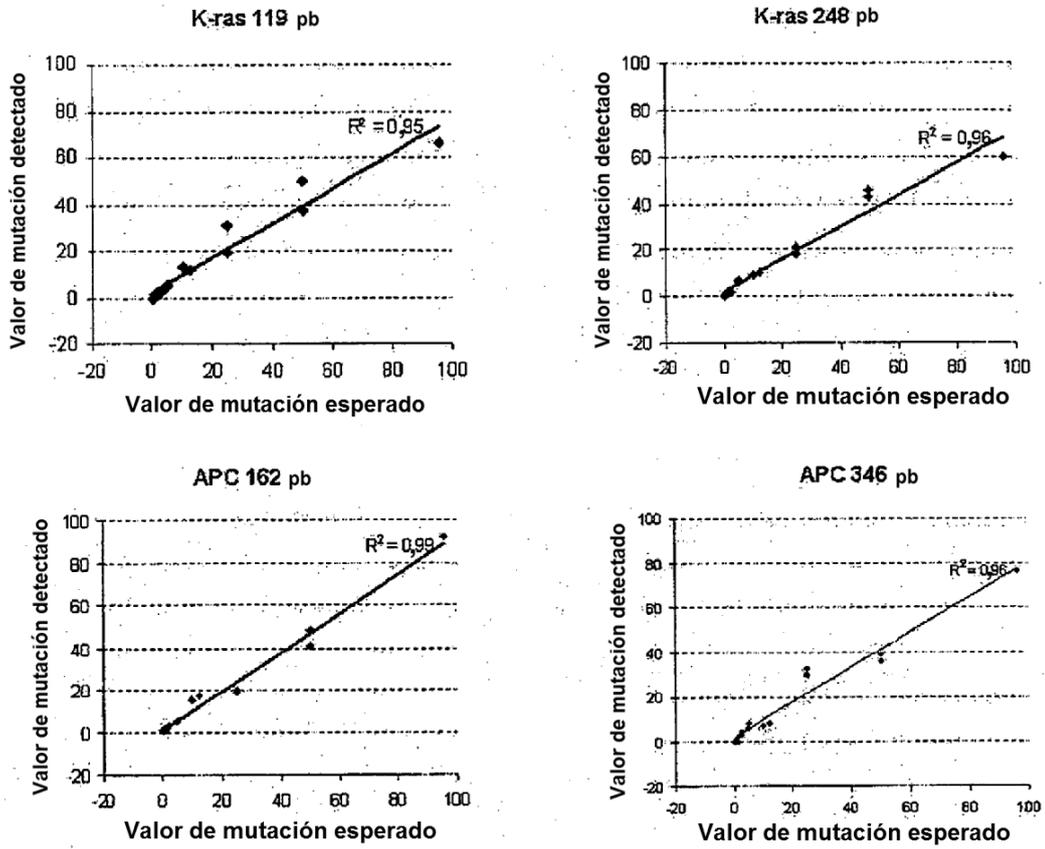


FIGURA 7

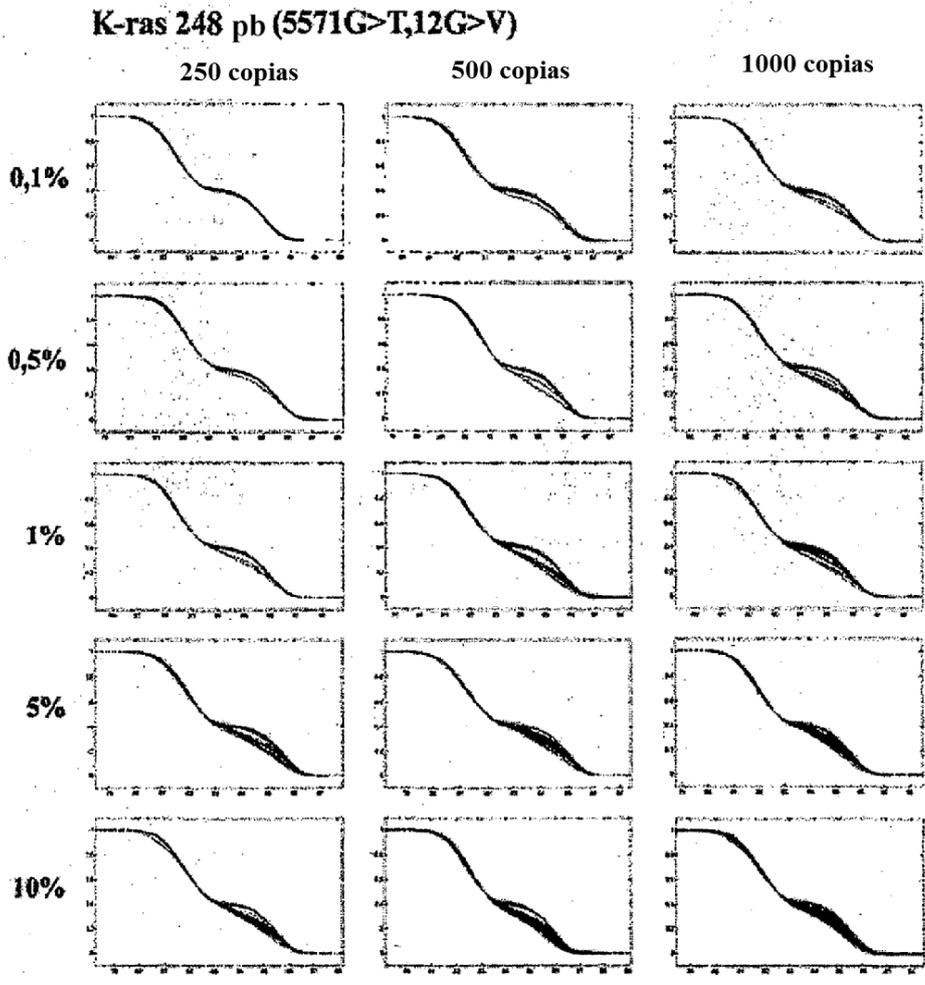


FIGURA 8

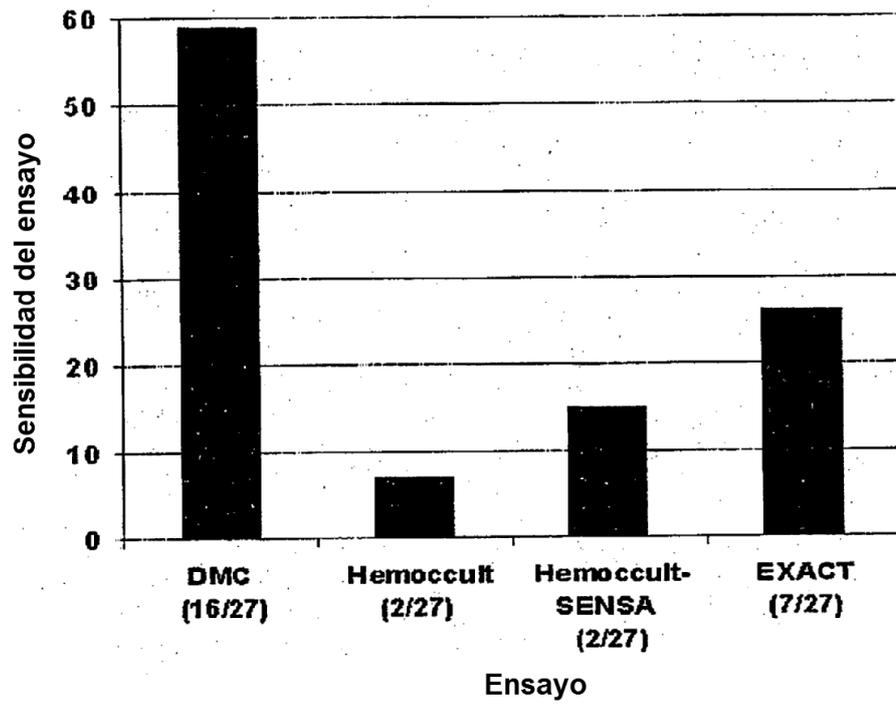


FIGURA 9

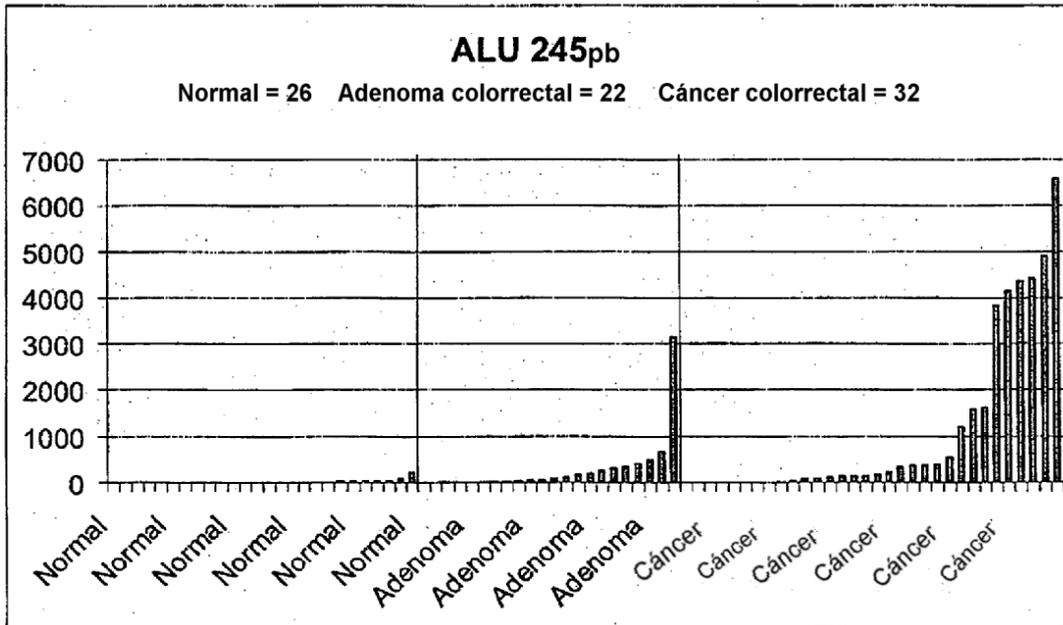
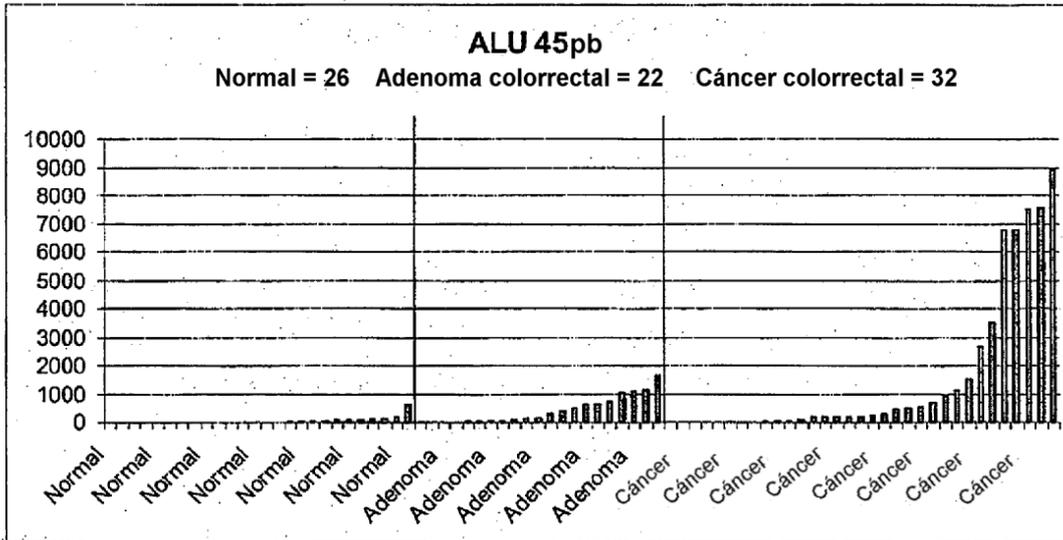


FIGURA 10

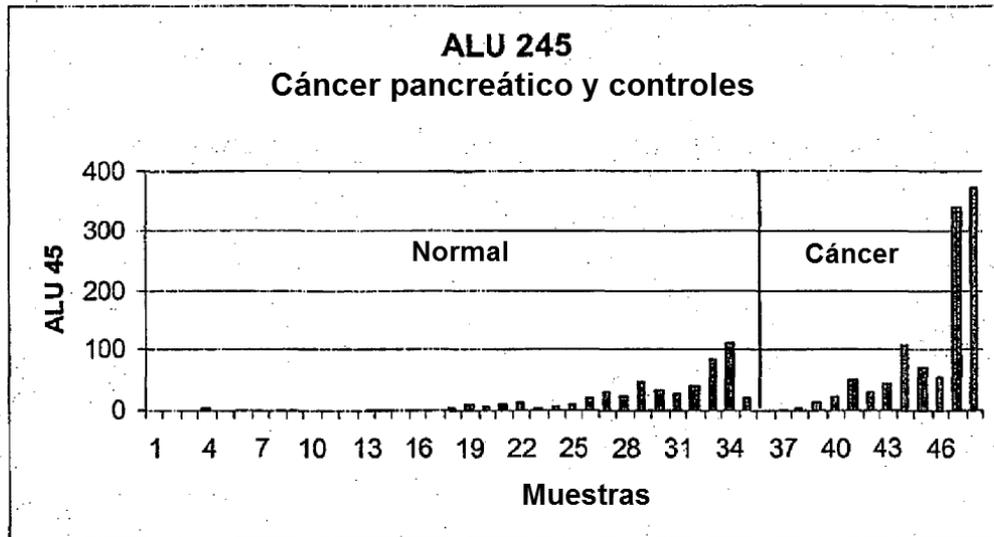
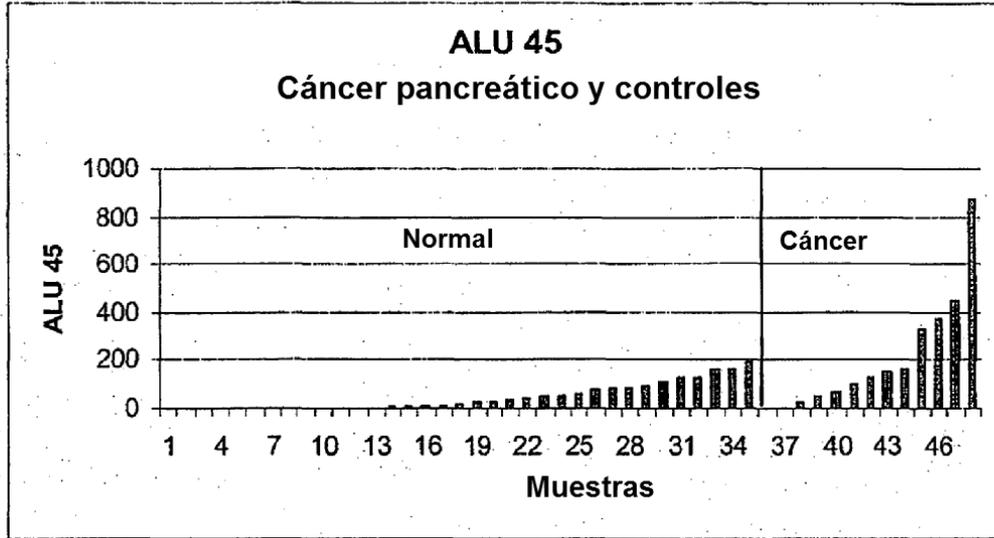


FIGURA 11

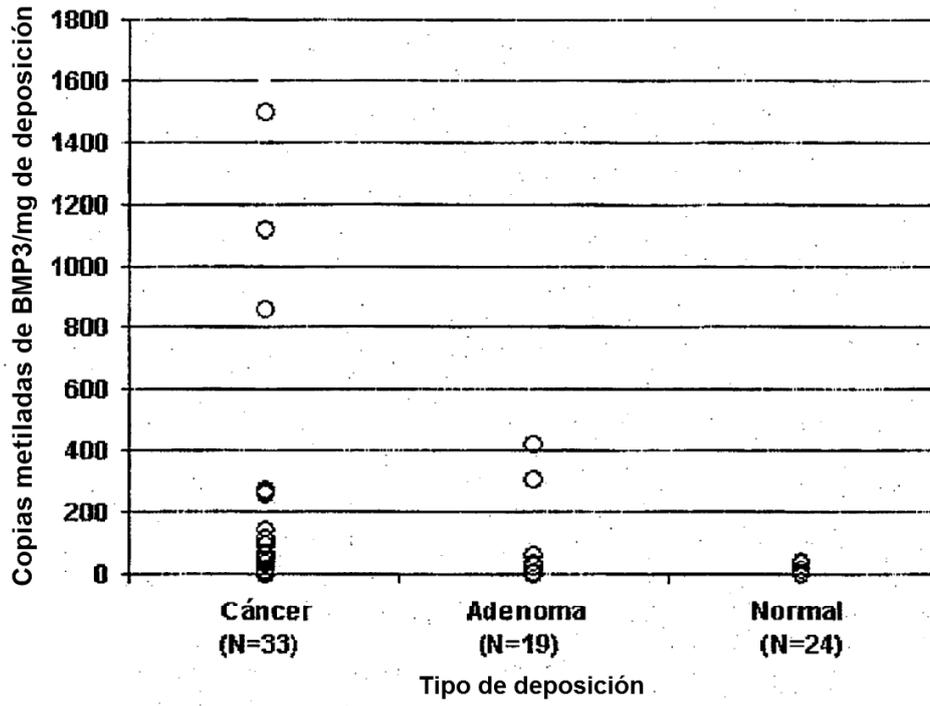


FIGURA 12

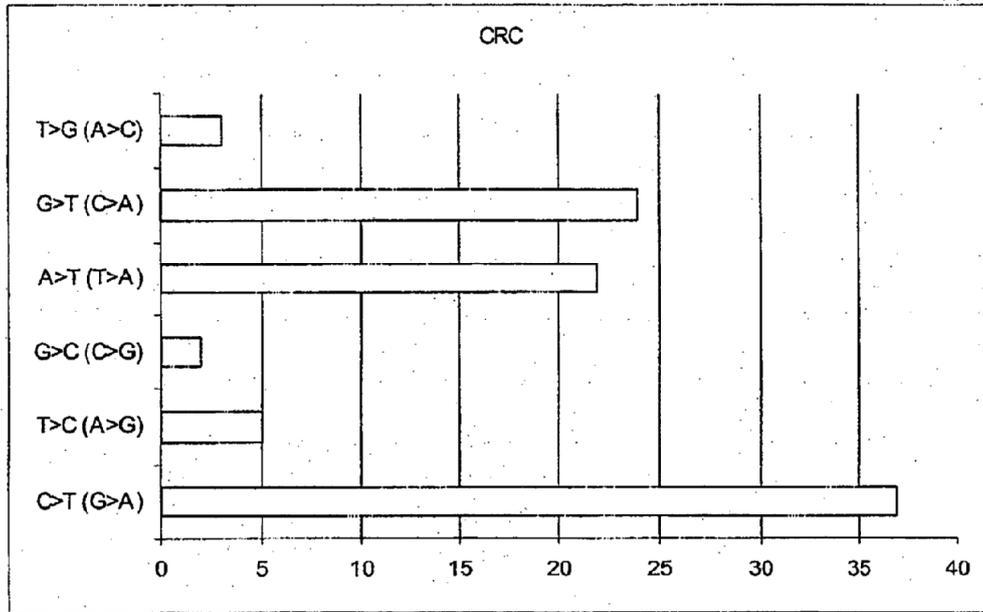


FIGURA 13

Secuencia de nucleótidos de K-ras (nº de acceso a GenBank NM_033360; gi | 34485724 |)

ggccgcggcg	gcggaggcag	cagcggcggc	ggcagtggcg	gcggcgaagg	tggcggcggc	60
tccggccagta	ctcccggccc	ccgccatttc	ggactgggag	cgagcgcggc	gcaggcactg	120
aaggcggcgg	cggggccaga	ggctcagcgg	ctcccagggtg	cgggagagag	gcctgctgaa	180
aatgactgaa	tataaacttg	tggtagttgg	agctggtggc	gtaggcaaga	gtgccttgac	240
gatacagcta	attcagaatc	atthttgtgga	cgaatatgat	ccaacaatag	aggattccta	300
caggaagcaa	gtagtaattg	atggagaaaac	ctgtctcttg	gatattctcg	acacagcagg	360
tcaagaggag	tacagtgcaa	tgagggacca	gtacatgagg	actggggagg	gctttctttg	420
tgtatthtgc	ataaataata	ctaaatcatt	tgaagatatt	caccattata	gagaacaaat	480
taaaagagtt	aaggactctg	aagatgtaac	tatggtccta	gtaggaaata	aatgtgattt	540
gccttctaga	acagtagaca	caaacaggc	tcaggactta	gcaagaagtt	atggaattcc	600
ttttattgaa	acatcagcaa	agacaagaca	gagagtggag	gatgcttttt	atacattggt	660
gaggggagatc	cgacaataca	gattgaaaaa	aatcagcaaa	gaagaaaaga	ctcctggctg	720
tgtgaaaatt	aaaaaatgca	ttataatgta	atctgggtgt	tgatgatgcc	ttctatacat	780
tagttcgaga	aattcgaaaa	cataaagaaa	agatgagcaa	agatggtaaa	aagaagaaaa	840
agaagtcaaa	gacaaagtgt	gtaattatgt	aaatacaatt	tgtacttttt	tcttaaggca	900
tactagtaca	agtggtaatt	ttgtacatt	acactaaatt	attagcattt	gttttagcat	960
tacctaatth	ttttcctgct	ccatgcagac	tgtagctttt	taccttaaat	gcttattthta	1020
aatgacagt	ggaagthttt	ttttcctcta	agtgccagta	ttcccagagt	tttggthttt	1080
gaactagcaa	tgctgtgaa	aaagaaactg	aatacctaag	atthctgtct	tggggthttt	1140
ggtgcatgca	gthgattact	tcttathttt	cttaccaatt	gtgaatgthg	gtgtgaaaca	1200
aattaatgaa	gctthtgaa	catcctatt	ctgtgtthta	tctagtcaaa	taaatggatt	1260
aattactaat	ttcagthgag	accttctaatt	tggtthttac	tgaacattg	agggaacaca	1320
aatthtatggg	cttctgatg	atgattcttc	taggcatcat	gtcctatagt	ttgtcatccc	1380
tgatgaatgt	aaagttacac	tgthcaaaa	gththtgtct	cththccact	gctattagtc	1440
atggtcactc	tccccaaaat	attatathth	ttctataaaa	agaaaaaat	ggaaaaaat	1500
tacaaggcaa	tggaaactat	tataaggcca	ttctctthtc	acattagata	aattactata	1560
aagactccta	atagctthtc	ctgttaaggc	agaccagta	tgaatgggg	attattatag	1620
caaccathth	ggggctatat	ttacatgcta	ctaaaththt	ataataattg	aaaagathth	1680
aacaagtata	aaaaathctc	ataggaatta	aatgtagtct	cctgtgtca	gactgctctt	1740
tcatagtata	actthaaatc	ttthctcaa	cttgagtctt	tgaagatagt	thtaattctg	1800
cttgtgacat	taaaagatta	tttggccag	ttatagctta	ttaggtgthg	aagagaccaa	1860
gthtgcaagg	ccaggccctg	tgtgaaacct	tgagctthca	tagagagtht	cacagcatgg	1920

ES 2 522 542 T3

actgtgtccc cacggtcctc cagtgttgtc atgcattggc tagtcaaat ggggagggac 1980
tagggcagtt tggatagctc aacaagatac aatctcactc tgtgggtggc ctgctgacaa 2040
atcaagagca ttgcttttgt ttcttaagaa aacaaactct tttttaaaaa ttacttttaa 2100
atattaactc aaaagttgag attttggggc ggtgggtgtc caagacatta attttttttt 2160
taaacaatga agtgaaaaag ttttacaatc tctaggtttg gctagttctc ttaacactgg 2220
ttaaattaac attgcataaa cacttttcaa gtctgatcca tatttaataa tgctttaaaa 2280
taaaaataaa aacaatcctt ttgataaatt taaaatgtta cttattttaa aataaatgaa 2340
gtgagatggc atgggtgaggt gaaagtatca ctggactagg aagaaggtga cttaggttct 2400
agataggtgt cttttaggac tctgattttg aggacatcac ttactatcca tttcttcatg 2460
ttaaagaag tcatctcaa ctcttagttt tttttttta caactatgta atttatattc 2520
catttacata aggatacact tatttgtaa gctcagcaca atctgtaaat ttttaaccta 2580
tgttacacca tottccagtgc cagtcttggg caaaattgtg caagaggtga agtttatatt 2640
tgaatatcca ttctcgttt aggactctc ttccatatta gtgtcatctt gctctctac 2700
cttccacatg ccccatgact tgatgcagtt ttaatacttg taattcccct aaccataaga 2760
tttactgctg ctgtggatat ctccatgaag ttttcccact gagtcacatc agaaatgcc 2820
tacatcttat ttctcaggg ctcaagagaa tctgacagat accataaagg gatttgacct 2880
aatcactaat tttcaggtgg tggctgatgc tttgaacatc tctttgctgc ccaatccatt 2940
agcgacagta ggatttttca aacctggtat gaatagacag aacctatcc agtggaaagga 3000
gaatttaata aagatagtgc tgaaagaatt ccttaggtaa tctataacta ggactactcc 3060
tggtaacagt aatacattcc attgttttag taaccagaaa tottcatgca atgaaaaata 3120
ctttaattca tgaagcttac ttttttttt tgggtgacaga gtctcgtctt tgtcaccag 3180
gctggaatgc agtggcgcca tctcagctca ctgcaacctc catctcccag gttcaagcga 3240
ttctcgtgcc tgggctcct gagtagctgg gattacaggc gtgtgccact aactcaact 3300
aatttttgta tttttaggag agacggggtt tcaccctgtt ggccaggctg gtctcgaact 3360
cctgacctca agtgattcac ccacctggc ctcataaacc tgttttgag aactcattta 3420
ttcagcaaat atttattgag tgctaccag atgccagtca ccgcacaagg cactgggtat 3480
atggtatccc caaacaagag acataatccc ggtccttagg tagtgctagt gtggctgta 3540
atatcttact aaggcctttg gtatacgacc cagagataac acgatgcgta ttttagttt 3600
gcaaagaagg ggtttggtct ctgtgccagc tctataattg ttttgctacg attccactga 3660
aactcttga tcaagctact ttatgtaaat cacttcattg ttttaaagga ataaacttga 3720
ttatattgtt tttttatttg gcataactgt gattctttta ggacaattac tgtacacatt 3780
aagggtgatg tcagatattc atattgacct aaatgtgtaa tattccagtt ttctctgcat 3840
aagtaattaa aatatactta aaaattaata gttttatctg ggtacaaata aacaggtgcc 3900
tgaactagtt cacagacaag gaaacttcta tgtaaaaatc actatgattt ctgaattgct 3960
atgtgaaact acagatcttt ggaacactgt ttaggtaggg tgtaagact tacacagtac 4020

ES 2 522 542 T3

ctcgttttcta	cacagagaaa	gaaatggcca	tacttcagga	actgcagtg	ttatgagggg	4080
atatttaggc	ctcttgaatt	ttgatgtag	atgggcattt	ttttaaggta	gtgggtaatt	4140
acctttatgt	gaactttgaa	tggtttaaca	aaagatttgt	ttttgtagag	attttaaagg	4200
gggagaattc	tagaaataaa	tgttacctaa	ttattacagc	cttaaagaca	aaaatccttg	4260
ttgaagtttt	tttaaaaaaa	gctaaattac	atagacttag	gcattaacat	gtttgtggaa	4320
gaatatagca	gacgtatatt	gtatcatttg	agtgaatggt	cccaagtagg	cattctaggc	4380
tctatttaac	tgagtccacac	tgcataggaa	tttagaacct	aacttttata	ggttatcaaa	4440
actgttgtca	ccattgcaca	attttgcct	aatatataca	tagaaacttt	gtggggcatg	4500
ttaagttaca	gtttgcacaa	gttcatctca	tttgtattcc	attgattttt	tttttcttct	4560
aaacattttt	tottcaaaaca	gtatataact	ttttttaggg	gatttttttt	tagacagcaa	4620
aaactatctg	aagattttcca	tttgcataaa	agtaatgatt	tcttgataat	tgtgtagtaa	4680
tgttttttag	aaccocagcag	ttaccttaaa	gctgaattta	tatttagtaa	cttctgtggt	4740
aatactggat	agcatgaatt	ctgcattgag	aaactgaata	gctgtcataa	aatgaaactt	4800
tctttctaaa	gaaagatact	cacatgagtt	cttgaagaat	agtcataact	agattaagat	4860
ctgtgtttta	gtttaatagt	ttgaagtgcc	tgtttgggat	aatgataggt	aatttagatg	4920
aatttagggg	aaaaaaaaagt	tatctgcaga	tatgttgagg	gcccattctct	ccccccacac	4980
ccccacagag	ctaactgggt	tacagtgttt	tatccgaaag	ttccaattc	cactgtcttg	5040
tgttttcatg	ttgaaaatac	ttttgcattt	ttcctttgag	tgccaatttc	ttactagtac	5100
tattttctaa	tgtaacatgt	ttacctggaa	tgtattttta	ctatttttgt	atagtgtaaa	5160
ctgaaacatg	cacattttgt	acattgtgct	ttcttttgtg	ggacatatgc	agtgtgatcc	5220
agttgttttc	catcatttgg	ttgcgctgac	ctaggaatgt	tggtcatatc	aaacattaaa	5280
aatgaccact	cttttaattg	aaattaactt	ttaaatgttt	ataggagtat	gtgctgtgaa	5340
gtgatctaaa	atgtgtaata	tttttgcatt	gaactgtact	actcctaatt	attgtaatgt	5400
aataaaaata	gttacagtga	caaaaaaaaaa	aaaaaa			5436

FIGURA 14

Secuencia de nucleótidos de BMP3 (nº de acceso a GenBank M22491; gi | 179505)

```

agatcttgaa aacacccggg ccacacacgc cgcgacctac agctctttct cagcgttgga      60
gtggagacgg cgcgccgagc gcctgcgcg ggtgaggtcc gcgcagctgc tggggaagag      120
cccacctgtc aggctgcgct gggtcagcgc agcaagtggg gctggccgct atctcgctgc      180
acccgccgce gteccggggt ccgctgcgcc tcgccccagc tggtttgag tcaaacctc      240
ggctccgccc cgggctcctt gcgccttgg agtgtcccgc agcgacgcc ggagccgacg      300
cgccgcgccc gtacctagcc atggctgggg cgagcaggct gctctttctg tggtgggct      360
gcttctgcgt gagcctggcg cagggagaga gaccgaagcc acctttcccg gagctccgca      420
aagctgtgcc aggtgaccgc acggcaggtg gtggcccggg ctccgagctg cagccgcaag      480
acaaggtctc tgaacacatg ctgcgctct atgacaggtg cagcacggtc caggcggccc      540
ggacaccggg ctccctggag ggaggtcgc agccctggcg ccctcggtc ctgcccgaag      600
gcaacaaggc tcgcagcttt cgggcggcag cagcagaaac tcttgaaaga aaaggactgt      660
atatcttcaa totgacatcg ctaaccaagt ctgaaaacat tttgtctgcc aactgtatt      720
tctgtattgg agagctagga aacatcagcc tgagttgtcc agtgtctgga ggatgctccc      780
atcatgctca gaggaaacac attcagattg atctttctgc atggaccctc aaattcagca      840
gaaaccaaag tcaactcctt ggccatctgt cagtggatat ggccaaatct catcgagata      900
ttatgtcctg gctgtctaaa gatatactc aattcttgag gaaggccaaa gaaaatgaag      960
agttcctcat aggatttaac attacgtcca agggacgcca gctgccaaag aggaggttac     1020
cttttccaga gccttatatc ttggtatatg ccaatgatgc cgccatttct gagccagaaa     1080
gtgtggtatc aagcttacag ggacaccgga attttcccac tggaaactgtt cccaaatggg     1140
atagccacat cagagctgcc ctttccattg agcggaggaa gaagcgtct actggggctct     1200
tgctgcctct gcagaacaac gagcttctcg gggcagaata ccagtataaa aaggatgagg     1260
tgtgggagga gagaaagcct tacaagaccc ttcaggctca ggcccctgaa aagagtaaga     1320
ataaaaagaa acagagaaag gggcctcatc ggaagagcca gacgctcaa tttgatgagc     1380
agaccctgaa aaaggcaagg agaaagcagt ggattgaacc tcggaattgc gccaggagat     1440
acctcaaggc agactttgca gatattggct ggagtgaatg gattatctcc cccaagtct     1500
ttgatgccta ttattgctct ggagcatgcc agttccccat gccaaagtct ttgaagccat     1560
caaatcatgc taccatccag agtatagtga gagctgtggg ggtcgttct gggattcctg     1620
agccttgctg tgtaccagaa aagatgtcct cactcagtat tttattcttt gatgaaaata     1680
agaatgtagt gcttaaagta taccctaaca tgacagtaga gtcttgcgct tgacagataac     1740
ctggcaaaga actcatttga atgcttaatt caat                                     1774

```