

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 385**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2013** E 13195770 (6)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017** EP 2881739

54 Título: **Método y kit para determinar la integridad del genoma y/o la calidad de una biblioteca de secuencias de ADN obtenidas por amplificación de genoma completo mediante sitios de restricción determinísticos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.10.2017**

73 Titular/es:

**MENARINI SILICON BIOSYSTEMS S.P.A. (50.0%)**  
**Via G. di Vittorio, 21 B/3**  
**40013 Castel Maggiore (BO) , IT y**  
**FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR**  
**FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN**  
**FORSCHUNG E.V. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KLEIN, CHRISTOPH ANDREAS;**  
**POLZER, BERNHARD MICHAEL y**  
**MANARESI, NICOLÒ**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 637 385 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Método y kit para determinar la integridad del genoma y/o la calidad de una biblioteca de secuencias de ADN obtenidas por amplificación de genoma completo mediante sitios de restricción determinísticos.

5 La presente invención se relaciona con un método y un kit para determinar la integridad del genoma de una muestra, en particular una célula individual, y/o la calidad de una biblioteca de secuencias de ADN obtenidas por amplificación de genoma completo mediante sitios de restricción determinísticos (DRS-WGA) del genoma de la muestra.

**ESTADO DEL ARTE**

10 La Amplificación de Genoma Completo (WGA) permite la detección de mutaciones somáticas y alteraciones en el número de copias de ADN a partir de poco material de partida, tal como en el caso de las células tumorales circulantes individuales (CTC) de pacientes con cáncer o en diagnóstico preimplantacional.

Para el uso diagnóstico de la WGA para el análisis de células individuales, la calidad del ADN genómico (o sea la integridad del genoma) de una muestra de células individuales de interés tiene un rol principal para el análisis molecular exitoso después de la WGA.

15 En particular, las CTC se han descrito como frecuentemente apoptóticas (Mehes, G., y col., *Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic*. *Am J Pathol*, 2001. 159 (1) : p.17-20).

Más aún, durante la apoptosis mediada por caspasas, se fragmenta el ADN genómico en pequeños fragmentos de entre 180 pb y 200 pb de longitud (Wyllie, AH., *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation*. *Nature*, 1980. 284(5756): p.555-6).

20 Por lo tanto, es importante evaluar el estado de Integridad del Genoma de una célula individual, ya que el mismo se asocia al estado biológico de la células misma, y da información clínicamente relevante acerca del estado general de un paciente con cáncer, lo cual va más allá de la información provista mediante el mero conteo de las CTC y complementa la caracterización molecular de estas CTC.

25 Además, el entrecruzamiento y/o fragmentación del ADN ocurre con tratamiento químico (por ejemplo fijación) aplicado a células y tejidos derivadas de paciente para la conservación de muestra necesaria después de la biopsia.

Para predecir el desempeño de ensayos moleculares para el análisis de células individuales y la evaluación de los datos resultantes derivados de dichas muestras, la evaluación de la integridad genómica de células individuales tiene una importancia fundamental.

30 Los kits disponibles para WGA de células individuales evalúan la calidad de la amplificación de genoma completo mediante la medida solamente de la concentración del producto de la WGA. Debido a que los protocolos para estos métodos incluyen por lo menos un paso al azar durante el procedimiento de amplificación del ADN de célula individual, los ensayos específicos para evaluar la integridad del genoma de la muestra inicial (en general una célula individual) tales como el estado apoptótico o no apoptótico, o la calidad del producto de la WGA, tales como la adaptabilidad para un análisis genético adicional, son difíciles.

35 Un tipo específico de WGA es la amplificación de genoma completo mediante sitios de restricción determinísticos (de aquí en adelante denominada como DRS-WGA). La DRS-WGA, que se conoce a partir de la EP1109938 y que es comercializada por Ampli1™ por parte de Silicon Biosystems Spa, se basa en la digestión con enzimas de restricción específicas del ADN de doble hebra en los sitios MseI (TTAA) y la ligación de un adaptador universal para la amplificación.

40 Se ha demostrado que la DRS-WGA es mejor para la amplificación de células individuales (véase por ejemplo: Lee YS, y col.: *Comparison of wide genome amplification methods for further quantitative analysis with microarray-based comparative genomic hybridization*. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2008, 47(1):32-41) y también más tolerante a la degradación del ADN debido al tratamiento fijador (véase por ejemplo: Stoecklein N.H. y col.: *SCOMP is Superior to Degenerated Oligonucleotide Primed-PCR for Global Amplification of Minute Amounts of ADN from Microdissected Archival Samples*. *American Journal of Pathology* 2002, Vol. 161, No. 1; Arneson N. y col.: *Comparison of wide genome amplification methods for analysis of ADN extracted from microdissected early breast lesions in formalin-fixed paraffin-embedded tissue*. *ISRN Oncol*. 2012; 2012;710692).

45 A la fecha, no existen ensayos específicos para evaluar la integridad del genoma de una muestra inicial para el

producto de la DRS-WGA o la calidad del producto de la DRS-WGA obtenido.

5 Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollo de métodos y kits que permitan determinar la integridad del genoma de una muestra inicial y/o la calidad del producto de la DRS-WGA obtenido, y que permita predecir el desempeño de los ensayos moleculares subsiguientes a la DRS-WGA para el análisis de células individuales y la evaluación de los datos resultantes.

Un objeto de la presente invención es por lo tanto proveer un método para determinar la integridad del genoma de una muestra y/o la calidad de una biblioteca de secuencias de ADN obtenidas a partir de DRS-WGA que pueda proveer resultados robustos y confiables y que permita, en particular, predecir el desempeño de los ensayos moleculares subsiguientes a la DRS-WGA.

10 Este objeto se consigue mediante la presente invención teniendo en cuenta que la misma se relaciona con un método como se define en la reivindicación 1.

Es otro objeto de la presente invención proveer un kit como se define en la reivindicación 8.

#### DEFINICIONES

15 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente documentación tiene el mismo significado comúnmente comprendido por las personas con experiencia en el arte al que pertenece esta invención.

20 El término "muestra", designa a una muestra que comprende por lo menos una partícula de una entidad biológica, en donde dicha partícula comprende por lo menos una secuencia de ADN que representa el genoma o una parte sustancial del genoma de la entidad biológica. Dicha entidad es humana, en donde dicha por lo menos una partícula puede ser una célula individual, o un núcleo de célula individual, o una célula germinal haploide, o un cromosoma.

Mediante el término "genoma" se designa al genoma completo de dicha parte sustancial del genoma.

25 Mediante el término "integridad" del genoma se designa a la ausencia de daños al ADN, tal como rupturas de doble hebra, o rupturas de hebra individual o condiciones similares que puedan impedir la replicación del genoma o su funcionalidad normal.

Mediante el término "calidad" de una biblioteca de secuencias de ADN se designa a la aptitud de la biblioteca de secuencias de ADN a usarse para la caracterización genética de ciertos aspectos tales como, a título enunciativo no taxativo, la presencia de mutaciones puntuales, eliminaciones, inserciones, variaciones del número de copias.

#### 30 DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una foto de un gel de agarosa de PCR de marcadores individuales, y de un ensayo en multiplex de 4 muestras y un ensayo en multiplex de 3 muestras de acuerdo con formas de realización preferidas de la presente invención;

35 La Figura 2 muestra una foto de un gel de agarosa de PCR en el punto caliente 1 y el punto caliente 2 de PIK3CA (M=marcador de tamaños, 01 = mama13, 02 = mama15, 03 = mama17, 04 = mama20, 05 = próstata14, 06 = próstata16, 07 = próstata24, 08= melanoma13, 09 = melanoma14, 10 = melanoma16);

La Figura 3 muestra una foto de un gel de agarosa de 8 muestras ensayadas mediante el ensayo en multiplex de 4 muestras preferido de la Figura 1.

40 La Figura 4 muestra un histograma de la distribución del Índice de Integridad del Genoma entre Células Tumorales Circulantes (CTC) individuales y leucocitos individuales (WBC) de pacientes con cáncer de mama.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 El método de acuerdo con la presente invención para determinar la integridad del genoma de una muestra y/o la calidad de una biblioteca de secuencias de ADN obtenidas por amplificación de genoma completo mediante sitios de restricción determinísticos (DRS-WGA) del genoma de la muestra comprende los pasos (a) a (d) de la reivindicación 1. Al permitir la determinación de la integridad del genoma de una muestra y/o la calidad de una biblioteca de secuencias obtenidas por DRS-WGA del genoma de la muestra, el método también permite

predecir la tasa de éxito de los ensayos de análisis genéticos sobre la biblioteca de secuencias de ADN.

La muestra preferiblemente puede ser una célula tumoral circulante (CTC), una célula fetal circulante, una célula endotelial circulante (CEC), un oocito, una célula del cúmulo, una célula espermática, un blastómero, o una célula de trofoectodermo.

5 En el paso (a), se provee la biblioteca de secuencias de ADN.

En el paso (b), la biblioteca de secuencias de ADN se amplifica mediante PCR usando por lo menos un primer par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca que tiene una longitud entre 1000 pb y 5000 pb, preferiblemente entre 1000 pb y 2000 pb, y que corresponde a una secuencia del genoma que se localiza en un primer brazo cromosómico, en donde el paso de amplificación da origen a un primer producto de PCR de entre 50 pb y 1000 pb.

Preferiblemente, la secuencia de ADN de la biblioteca con la que se hibridiza el primer par de cebadores abarca la región D5S2117 del cromosoma 5q.

Más preferiblemente, el cebador directo del primer par de cebadores tiene la SEQ ID NO:4 y el cebador reverso del primer par de cebadores tiene la SEQ ID NO:3.

15 En el paso (c) se detecta el primer producto de PCR. Puede usarse una electroforesis en gel de agarosa para separar y detectar el producto de la PCR así como también otros métodos conocidos en el arte.

En el paso (d) se correlaciona la presencia del primer producto de PCR con la integridad del genoma de la muestra y/o la calidad de la biblioteca de secuencias de ADN. En el paso (b) se usa por lo menos un segundo par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca que tiene una longitud entre 1000 pb y 5000 pb, más preferiblemente entre 1000 pb y 2000 pb, y que corresponde a una secuencia del genoma que se localiza en un segundo brazo cromosómico distinto al primer brazo cromosómico, en donde el paso de amplificación da origen a un segundo producto de PCR de entre 50 pb y 1000 pb que tiene un tamaño distinto al primer producto de PCR. El paso (b) usa por lo menos un segundo par de cebadores, en donde el segundo producto de PCR también se detecta en el paso (c) y la presencia del segundo producto de PCR también se correlaciona con la integridad del genoma de la muestra y/o la calidad de la biblioteca de secuencias de ADN del paso (d).

Preferiblemente, la secuencia de ADN de la biblioteca con la que se hibridiza el segundo par de cebadores abarca los exones 2 y 3 del gen TRP53.

Más preferiblemente, el cebador directo del segundo par de cebadores tiene la SEQ ID NO:6 y el cebador reverso del segundo par de cebadores tiene la SEQ ID NO:5. En el paso (b) se usa por lo menos un tercer par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca que tiene una longitud entre 1000 pb y 5000 pb, más preferiblemente entre 1000 pb y 2000 pb, y que corresponde a una secuencia del genoma que se localiza en un tercer brazo cromosómico distinto a primero y al segundo brazo cromosómico, en donde el paso de amplificación da origen a un tercer producto de PCR de entre 50 pb y 1000 pb que tiene un tamaño distinto que el primer y segundo producto de PCR. El paso (b) usa por lo menos un tercer par de cebadores, en donde también se detecta el tercer producto de PCR en el paso (c) y la presencia del tercer producto de PCR también se correlaciona con la integridad del genoma de la muestra y/o la calidad de la biblioteca de secuencias de ADN en el paso (d). La secuencia de ADN de la biblioteca con la que hibridiza el tercer par de cebadores abarca al pseudogén 1 de KRT19 (indicado para ahorro de espacio como CK19).

40 Más preferiblemente, el cebador directo del tercer par de cebadores tiene la SEQ ID NO:8 y el cebador reverso del tercer par de cebadores tiene la SEQ ID NO:7.

Aún más preferiblemente, en el paso (b) por lo menos se usa un cuarto par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca que tiene una longitud entre 80 pb y 300 pb, en donde el paso de amplificación da origen a un cuarto producto de PCR de entre 50 pb y 200 pb que tiene un tamaño distinto que el primero, el segundo y el tercer producto de PCR.

45 Cuando el paso (b) usa por lo menos un cuarto par de cebadores, también se detecta el cuarto producto de PCR en el paso (c) y la presencia del cuarto producto de PCR también se correlaciona con la integridad del genoma de la muestra y/o la calidad de la biblioteca de secuencias de ADN en el paso (d).

50 Preferiblemente, la secuencia de ADN de la biblioteca con la que hibridiza el cuarto par de cebadores abarca a los codones 12 y 13 del gen KRAS.

Aún más preferiblemente, el cebador directo del cuarto par de cebadores tiene la SEQ ID NO:17 y el cebador reverso del cuarto par de cebadores tiene la SEQ ID NO:18.

5 De acuerdo con la presente invención también se provee un kit para determinar la integridad del genoma de una muestra y/o la calidad de una biblioteca de las secuencias de ADN que se obtienen mediante la amplificación de genoma completo mediante sitios de restricción determinísticos (DRS-WGA) del genoma de la muestra que comprende por lo menos uno de:

- por lo menos un primer par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca que tiene una longitud entre 1000 pb y 5000 pb y que corresponde a una secuencia del genoma que se localiza en un primer brazo cromosómico,

10 - por lo menos un segundo par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca que tiene una longitud entre 1000 pb y 5000 pb y que corresponde a una secuencia del genoma que se localiza en un segundo brazo cromosómico distinto del primer brazo cromosómico,

15 - por lo menos un tercer par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca que tiene una longitud entre 1000 pb y 5000 pb y que corresponde a una secuencia del genoma que se localiza en un tercer brazo cromosómico distinto del primero y del segundo brazo cromosómico, en donde el primero, el segundo y el tercer par de cebadores dan origen, cuando se amplifican por PCR, a productos de PCR que tienen diferentes tamaños entre sí.

Preferiblemente el kit comprende el primero, el segundo y el tercer par de cebadores.

20 [0040] Preferiblemente, el kit además comprende por lo menos un cuarto par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca que tiene una longitud entre 80 pb y 300 pb, en donde el primero, el segundo, el tercero y el cuarto par de cebadores dan origen, cuando se amplifican por PCR, a productos de PCR que tienen diferentes tamaños entre sí.

Más preferiblemente, el kit comprende el primero, el segundo, el tercero y el cuarto par de cebadores.

25 El kit puede usarse para predecir el éxito de un ensayo de análisis genético después de la amplificación de un ADN genómico de célula individual mediante DRS-WGA. Preferiblemente, el ensayo de análisis genético es una secuenciación de Sanger para análisis de mutaciones, la evaluación de cambios de número de copias específicas, PCR cuantitativa para amplificación génica, Hibridización Genómica Comparativa (CGH) en metafase, o Hibridización Genómica Comparativa (CGH) en matriz.

30 Para los ensayos específicos para genes, tales como la secuenciación de Sanger para el análisis de mutaciones, se pueden usar las muestras con por lo menos 1 o 2 de los 4 productos de PCR. La positividad de por lo menos 3 de los 4 productos de PCR es predictiva de un análisis de genoma completo exitoso con CGH en metafase. Para la CGH en matriz es aconsejable usar muestras con 4 de los 4 productos de PCR positivos.

## EJEMPLOS

35 En resumen, se ensayaron varios pares de cebadores diseñados para fragmentos MseI que se localizan en diferentes localizaciones cromosómicas y con longitudes de fragmento variables. Se seleccionaron tres pares de cebadores que predicen un análisis de genoma completo exitoso de productos de células individuales con alta especificidad y sensibilidad (Ejemplo 1). Se agregó un cuarto par de cebadores para un fragmento MseI más corto para indicar una DRS-WGA exitosa para células con baja calidad, por ejemplo CTC apoptóticas (Ejemplo 2). En los ejemplos, los productos de PCR también se denominan como "marcadores" y las reacciones de amplificación por PCR que incluyen varios pares de cebadores también se denominan como "ensayos de múltiples reacciones". En particular, las reacciones de amplificación por PCR que incluyen varios pares de cebadores diseñados para determinar la integridad del genoma de una muestra y/o la calidad de la biblioteca de secuencias de ADN obtenidas por amplificación de genoma completo mediante sitios de restricción determinísticos (DRS-WGA) del genoma de la muestra, también se denominan como "ensayos de control de calidad" o "ensayos de QC".

### Ejemplo 1

50 Se mostró que dos combinaciones alternativas de marcadores predijeron el éxito de la hibridización genómica comparativa en metafase (CGH) después de la amplificación de un ADN genómico de célula individual con DRS-WGA (Resolución entre 10 y 20 Mb) en muestras de células de cáncer y muestras de células diploides con cariotipo normal.

A. Características de los 8 marcadores para PCT ensayados

5 [0046] Se realizaron PCR sobre 8 fragmentos Msel diferentes que cubrían una longitud de fragmento Msel de entre 239 y 1936 pb (Tabla 1). Las secuencias localizadas en 7 brazos diferentes de cromosoma se seleccionaron para minimizar la posibilidad de un resultado negativo del ensayo debido a la pérdida de ADN genómico en una célula cancerígena individual.

Esquema de pipeteo (1x) 1.0 ml de Solución amortiguadora + dNTPs (MgCl 10mM, Tris 100mM (pH 8.5), KCl 500 mM, dNTPs 1mM)

0.5 ml de Cebador 3' (8 mM)

0.5 ml de Cebador 5' (8 mM)

10 0.25 ml de BSA (para biología molecular)

7.25 ml de PCR-H<sub>2</sub>O

0.1 ml de Taq polimerasa (5U/ml)

0.5 ml de producto de Ampli1 (muestra de ensayo)

Perfil térmico

15 [0047]

Paso 1 94.0°C 2 min

Paso 2 Temperatura de hibridización 30 s

Paso 3 72.0°C 2 min

Paso 4 94.0°C 15 s

20 Paso 5 Temperatura de hibridización 30 s

Paso 6 72.0°C 20 s

*14 ciclos adicionales (pasos 4-6)*

Paso 7 94.0°C 5 s

Paso 8 Temperatura de hibridización 30 s

25 Paso 9 72.0°C 30 s

*24 ciclos adicionales (pasos 7-9)*

Paso 10 72.0°C 2 min

Paso 11 4°C sin final

30

Tabla 1. Características de los 8 pares de cebadores para PCR seleccionados ensayados para el ensayo de QC para evaluar la calidad de la DRS-WGA

Nombre del cebador	SEQ ID NO	Secuencia	Temperatura de hibridización	Cromosoma	Longitud del fragmento Mse	Longitud del fragmento de PCR
BCR-TT-R	1	TCAGCCTCAGGACTCTTGTG	61°C	22q	1936 pb	323 pb
BCR-TT-F	2	CGTGGACAACACTACGGAGTTG	61°C	22q	1936 pb	323 pb
D5S2117-R	3	ACTGAGTCCTCCAACCATGG	58°C	5q	1376 pb	140 pb*
D5S2117-F	4	CCAGGTGAGAACCTAGTCAG	58°C	5q	1376 pb	140 pb*
TRP53-Ex2/3-R	5	CAGCCCAACCCTTGTCTTA	58°C	17p	1374 pb	299 pb
TRP53-Ex2/3-F	6	GAAGCGTCTCATGCTGGATC	58°C	17p	1374 pb	299 pb
CK19-R	7	TTCATGCTCAGCTGTGACTG	58°C	6q	1146 pb	614 pb
CK19-F	8	GAAGATCCGCGACTGGTAC	58°C	6q	1146 pb	614 pb
IGF2R-R	9	GGATCTTGGTACCACTCATG	58°C	6q	647 pb	217 pb
IGF2R-F	10	GCCACTGTGGAAGTCTGCA	58°C	6q	647 pb	217 pb
RUFY2-R	11	CAGCTAGGAACTCCAGGAATCA	64°C	10q	458 pb	104 pb
RUFY2-F	12	GTTGAGGGCTTCATCAACAC	64°C	10q	458 pb	104 pb
SMYD1-R	13	CTTTTCCCTGAAGGTCTTAG	55°C	2p	287 pb	163 pb
SMYD1-F	14	GGGTGACCTGCTTGACATC	55°C	2p	287 pb	163 pb
PHACTR2-R	15	TGTGAGAAAGACTTGGAGTT	58°C	6q	239 pb	205 pb
PHACTR2-F	16	ACTGAACAGAGCAGGTCTAC	58°C	6q	239 pb	205 pb

\* Este par de cebadores amplifica una secuencia microsatélite. Por lo tanto la longitud del fragmento real puede variar levemente entre los alelos de un paciente y entre diferentes pacientes.

#### B. Selección de marcadores de PCR para el ensayo de QC

5 Para seleccionar la mejor combinación posible de marcadores para PCR, se reamplificaron 72 genomas celulares individuales de diferentes tipos de cánceres humanos (24 células de cáncer diseminado (DCC) de mama, 24 DCC de próstata, 24 DCC de melanoma). Para cada uno de los tres grupos, se incluyeron 12 células que dieron como resultado la hibridización exitosa en metafase en un experimento previo de CGH y 12 células que no dieron como resultado una hibridización en metafase en un experimento previo de CGH. Se realizaron PCR específicas para todos los marcadores seleccionados y el ensayo se evaluó para estudiar su precisión en la predicción del resultado de CGH en metafase.

10 Como marcadores individuales, las PCR de los fragmentos Mse largos D5S2117, TRP53-Ex2/3 y KRT19 pseudogén 1 (a partir de aquí también referido como CK19) proveyeron una mejor separación entre los genomas amplificados con éxito y sin éxito en CGH en metafase. Un ensayo de estos tres fragmentos mostró una precisión alta de ensayo para predecir el éxito de CGH en metafase. El agregado de la PCR sobre el

fragmento Mse más corto PHACTR2 aumentó levemente la precisión del ensayo en el conjunto de los 72 genomas de DCC.

En síntesis, se desarrollaron dos ensayos alternativos de QC para el kit QC para Ampli1 (Tabla 2).

Alternativa 1: ensayo de QC con 3 marcadores (D5S2117, TRP53-Ex2/3 y CK19).

5 Alternativa 2: ensayo de QC con 4 marcadores (D5S2117, TRP53-Ex2/3, CK19 y PHACTR2).

Tabla 2. Precisión del ensayo de dos combinaciones alternativas de marcadores para el ensayo de QC (72 muestras de DCC)

10

Medida estadística	Alternativa 1		Alternativa 2	
	2/3 PCRs +	3/3 PCRs +	3/4 PCRs +	4/4 PCRs +
Verdadero +	35	29	35	29
Falso -	1	7	1	7
Falso -	34	36	35	36
Falso +	2	0	1	0
Sensibilidad	0.97	0.81	0.97	0.81
Especificidad	0.94	1.0	0.97	1.0
Valor predictivo positivo	0.95	1.0	0.97	1.0
Valor predictivo negativo	0.97	0.84	0.97	0.84

15

20

Si es posible, solo deben usarse las muestras que son de la mayor calidad y que son positivas para todos los marcadores seleccionados (para ambos ensayos alternativos 100% de especificidad). Sin embargo, el resultado de aplicar este estándar alto de control de calidad es una tasa alta de falsos negativos (7/36 = 19.4%). Si el número de muestras de ensayo con el mayor estándar de calidad es limitado, los genomas amplificados de DRS-WGA con 2/3 o 3/4 de PCR positiva aún predicen una tasa de éxito alta para CGH en metafase (especificidad 0.94 para el ensayo con 3 marcadores y 0.97 para el ensayo con 4 marcadores, respectivamente).

25

C. Ensayo de marcadores para PCR en un conjunto de 100 células diploides con cariotipo normal

30

Para evaluar adicionalmente el conjunto de marcadores para PCR para el ensayo de QC, se reamplificaron 100 genomas celulares individuales de células diploides con cariotipos normales. Todas las muestras se ensayaron para los 8 marcadores para PCR diferentes. Además, el éxito de CGH en metafase se confirmó para los 22 genomas con buena calidad predicha y 10 genomas con calidad mala predicha. Los resultados de la evaluación estadística de la precisión del ensayo se muestran en la Tabla 3.



Tabla 3. Precisión del ensayo de dos combinaciones alternativas de marcadores para el kit de QC Ampli1 (32 muestras normales)

Medida estadística	Alternativa 1		Alternativa 2	
	2/3 PCRs +	3/3 PCRs +	3/4 PCRs +	4/4 PCRs +
Verdadero +	22	21	22	21
Falso -	0	1	0	1
Verdadero -	10	10	10	10
Falso +	0	0	0	0
Sensibilidad	1.0	0.95	1.0	0.95
Especificidad	1.0	1.0	1.0	1.0
Valor predictivo positivo	1.0	1.0	1.0	1.0
Valor predictivo negativo	1.0	0.91	1.0	0.91

D. Validación adicional de marcadores de QC seleccionados en muestras amplificadas de DRS-WGA

5 Debido a que las muestras ensayadas en B y C se tomaron de un biobanco existente de genomas de células individuales, se amplificaron con reactivos diseñados para DRS-WGA de los laboratorios relacionados (provistos por diferentes proveedores). Para validar el desempeño del ensayo de QC propuesto con muestras amplificadas mediante el kit Ampli1 (tal como lo provee Silicon Biosystems), se aislaron PBL mononucleares individuales y conjuntos de células de un donante sano y células individuales y conjuntos de células de la línea de células de cáncer de mama SKBR3. Los marcadores propuestos en B y C para el ensayo de QC se usaron para predecir la calidad de los genomas amplificados. Luego, se realizaron experimentos de CGH en metafase para un conjunto de muestras (5 células individuales, 1 conjunto de células y 1 control negativo de Ampli1) para células sanguíneas diploides así como también células SKBR3 para validar la precisión predictiva del ensayo de QC.

15 SKBR: 10/11 células individuales y ambos conjuntos de células mostraron 4/4 PCR con marcador de bandas positivas

1/11 células fueron negativas para todos los marcadores ensayados, control negativo limpio en todas las PCR ensayadas

PBL: 11/11 células individuales y ambos conjuntos de células mostraron

20 4/4 PCR con marcador de bandas positivas, control negativo limpio en todas las PCR ensayadas

**Ejemplo 2**

25 [0056] Como otros análisis corriente abajo, por ejemplo secuenciamiento Sanger de fragmentos específicos, no dependen de una amplificación cuali y cuantitativamente muy alta del ADN de célula individual, se incluyó un cuarto fragmento. Los experimentos se realizaron para evaluar si una amplificación exitosa de esta secuencia sola es suficiente para predecir el éxito del secuenciamiento de Sanger de fragmentos Mse comparables (aquí zonas importantes 1 y 2 de PIK3CA).

A. Protocolo para el ensayo en multiplex de 4 muestras

30 [0057] Con el objetivo de tener compatibilidad con el ensayo en multiplex de 3 muestras ya establecido, se diseñaron nuevos cebadores para el fragmento Mse de KRAS que abarca los nucleótidos mutados con frecuencia que codifican para los codones 12 y 13. Estos cebadores amplifican un fragmento de PCR de 91 pb de longitud claramente distinguible de las otras tres bandas (D5S2117, CK19 y TP53-Exon2/3, véase la Figura

## ES 2 637 385 T3

1).

Se usó el siguiente esquema de pipeteo y perfil térmico con el agregado de los cebadores para KRAS en una concentración de 4 mM a la mezcla de cebadores.

KRAS91pb-F ATAAGGCCTGCTGAAAATGAC (SEQ ID NO:17)

5 KRAS91pb-R CTGAATTAGCTGTATCGTCAAGG (SEQ ID NO:18)

Esquema de pipeteo (1x) 1.0 ml de solución amortiguadora de reacción para PCR Ampli1™ (MgCl<sub>2</sub> 20mM incluido)

0.2 ml de dNTPs (10mM)

1.0 ml de mezcla de cebadores (8 cebadores, cada uno 4 mM)

10

0.2 ml de BSA (20 mg/ml)

6.5 ml de PCR-H<sub>2</sub>O

0.1 ml de Taq polimerasa Ampli1™ (5U/ml)

1.0 ml producto de Ampli1™ (muestra ensayada)

Perfil térmico

15

Paso 1 95.0°C 4 min

Paso 2 95.0°C 30 s

Paso 3 58.0°C 30 s

Paso 4 72.0°C 90 s

32 ciclos (pasos 2-4)

20

Paso 5 72.0°C 7 min

Paso 6 4.0°C sin final

Se cargaron 5 ml de cada producto de PCR en un gel de agarosa al 1.2%. Los resultados se confirmaron por comparación de la longitud de pb de los amplicones obtenidos con los esperados, como se muestra en la Tabla 4.

25 Tabla 4

30

Identificación del producto de PCR			
Blanco	Marcador del cebador	Cromosoma	Longitud del amplicon (bp)
A	KRAS	12p	91
B	D5S2117	5q	108-166
C	TRP53	17p	299
D	KRT19 pseudogén 1 (CK19)	6q	614

Tal como se indicó precedentemente, el marcador B mapea en una región polimórfica, por lo tanto los productos de PCR pueden ser:

homocigota, y mostrar una banda de un pb que está comprendido en el rango descrito (108-166);

heterocigota y mostrar dos bandas de pb diferente que está comprendido en el rango descrito (108-166).

- 5 En la Figura 3 se muestra un ejemplo de una electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos de diferentes muestras con el uso del ensayo en multiplex para 4 muestras descrito precedentemente.

10 La muestra 1 en la Figura 3 por ejemplo presenta 3/4 marcadores positivos. La heterocigosidad u homocigosidad del marcador B (una o dos bandas) debe ser tenido en cuenta como uno en la evaluación de la positividad para el marcador B. Las muestras 2 y 8 por ejemplo presentan 4/4 marcadores positivos.

B. Comparación del ensayo en mutiplex para 4 muestras con resultados de reacciones de PCR de fragmento individual y multiplex para 3 muestras establecido

15 [0064] Se seleccionaron 72 bibliotecas de DRS-WGA de DCC de mama, de próstata y de melanoma que ya habían sido ensayadas mediante el ensayo en multiplex de 3 muestras del Ejemplo 1. Desafortunadamente la muestra de Mama 01 se perdió debido a una fisura en el tubo de reacción. Los otros 71 productos de DRS-WGA se ensayaron adicionalmente con PCR individual de 91pb para KRAS y el nuevo ensayo en multiplex de 4 muestras. En síntesis, 53/71 muestras mostraron la banda esperada a 91pb en la PCR de marcador individual, y todas ellas menos una (Mama 24) mostraron la misma banda en el ensayo en multiplex de 4 muestras. Todas las otras bandas para D5S2117, CK19 y TP53-Exon2/3 se detectaron en las mismas muestras que con el ensayo en multiplex de 3 muestras. Más aún, el amplicón de 91pb de KRAS se detectó en las 38 muestras que mostraron una o más bandas en el ensayo en multiplex para 3 muestras usado actualmente. Además, se identificaron 15 muestras que fueron negativas para D5S2117, CK19 y TP53-Exon2/3 pero positivas para KRAS 91pb, solamente. Finalmente 18 muestras fueron negativas para los cuatro amplicones ensayados.

25 C. Secuenciamiento de PIK3CA de diez muestras seleccionadas

De las 15 muestras que mostraron el amplicón de 91pb de KRAS solamente, se seleccionaron diez muestras para el análisis de la secuencia de PIK3CA (4 muestras de DCC de mama, 3 muestras de DCC de próstata, y 3 muestras de DCC de melanoma). Las PCR para PIK3CA se realizaron para los fragmentos HS1 y HS2, usando el kit Ampli1™ PIK3CA Seq (Silicon Biosystems SpA, Italia), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la PCR se cargaron todas las muestras en un gel de agarosa al 1.5% y se visualizaron los amplicones después de la electroforesis. Se obtuvieron bandas fuertes solamente para HS1 en cuatro muestras de DCC (DCC de próstata 16, DCC de melanoma 13, 14, y 16) y para HS2 en cinco muestras de DCC (DCC de próstata 14, y 16, DCC de melanoma 13, 14, y 16). Además, se detectaron bandas débiles pero visibles para dos muestras adicionales (DCC de mama 13, DCC de próstata 24) y tres (DCC de mama 13, y 15, DCC de próstata 24), respectivamente (Figura 2). Una muestra (DCC melanoma 16) mostró una mancha fuerte para el fragmento de ADN  $\geq 1$ kb, que también resultó visible en todos los geles previos de esta muestra. No obstante, el amplicón de PCR se purificó y se secuenció para todas las muestras.

El secuenciamiento de Sanger para las zonas importantes de mutación para PIK3CA dio como resultado secuencias muy fuertes y limpias para las muestras mostrando una amplificación fuerte en la electroforesis en gel (véase la Figura 2), incluyendo la muestra de DCC de melanoma 16. La mayoría de las otras muestras con menor concentración de amplicón mostró un ruido de fondo elevado, a pesar que las secuencias podían editarse fácilmente para dos muestras adicionales para HS1 (DCC de mama 13, DCC de próstata 24) y cuatro muestras adicionales para HS2 (DCC de mama 13, 15, y 20, DCC de próstata 24). Para las muestras restantes la señal de fondo fue muy alta para asegurar la edición de la secuencia completa (DCC de mama 15, 17, y 20, DCC de próstata 14 para HS1; DCC de mama 15 para HS2).

En un conjunto de CTC y glóbulos blancos (WBC) recolectados con DEPAArray™ (Silicon Biosystems SpA) de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama enriquecido con CellSearch® (Janssen Diagnostics LLC), se evaluó la integridad del genoma por análisis de la calidad del producto de WGA de Ampli1™ de acuerdo con la invención. El número resultante de productos de PCR detectados luego de la reacción de PCR en multiplex (índice de integridad del genoma o GII) se encontró que estaba significativamente desviado, como se muestra en la Figura 4, hacia valores menores de GII en CTC respecto a WBC normales recolectados de los mismos pacientes, sometidos al mismo proceso de clasificación por enriquecimiento y WGA Ampli1™.

5 A modo de explicación, un GII con un valor de 0 corresponde a una situación en la cual ninguno de los productos primero, segundo, tercero o cuarto de PCR se amplificó, un GII con un valor de 1 corresponde a una situación en la cual solo se amplificó el cuarto producto de PCR, un GII con un valor de 2 corresponde a una situación en la cual se amplifica uno entre el primero, segundo y tercero de los productos de PCR y el cuarto producto de PCR, un GII con un valor de 3 corresponde a una situación en la cual se amplifican dos entre el primero, segundo y tercer producto de PCR y el cuarto producto de PCR, y un GII con un valor de 4 corresponde a una situación en la cual el primero, segundo, tercero y cuarto producto de PCR se amplifican.

10 El GII se usó además para evaluar la tasa de éxito del secuenciamiento de Sanger dirigido para las zonas importantes de mutación del exón 9 y del exón 20 de PIK3CA, de un ensayo qPCR diseñado para determinar la amplificación del gen ERBB2, y de la CGH en matriz. La Tabla 5 muestra una sinopsis de los resultados

Tabla 5

Ensayo molecular	Células analizadas	Índice de integridad del genoma (GII)					Valor P
		GII 0	GII 1	GII 2	GII 3	GII 4	Chi-cuadrado
PIK3CA HS1	n=383	7/23	14/25	48/62	102/117	146/156	<0.0001
		(30.4%)	(56.0%)	(77.4%)	(87.2%)	(93.6%)	
PIK3CA HS2	n=383	8/23	18/25	55/62	109/117	149/156	<0.0001
		(34.8%)	(72.0%)	(88.7%)	(93.2%)	(95.5%)	
PIK3CA completo	n=383	4/23	12/25	45/62	97/117	141/156	<0.0001
		(17.4%)	(48.0%)	(72.6%)	(82.9%)	(90.4%)	
HER2 qPCR	n=351	3/12	8/18	41/61	95/112	136/148	<0.0001
		(25.0%)	(50.0%)	(67.2%)	(84.8%)	(91.9%)	
aCGH	n=50	No evaluado	No evaluado	4/5 (80.0%)	7/9 (77.8%)	36/36 (100%)	0.016

15 Los ejemplos precedentes muestran que el método de acuerdo con la presente invención permite determinar la integridad del genoma de una muestra y la calidad de una biblioteca de secuencias de ADN obtenida por DRS-WGA del genoma de la muestra con resultados robustos y confiables y permite en particular predecir el desempeño de los ensayos moleculares, tal como hibridización genómica comparativa en metafase y matriz (CGH), secuenciamiento de Sanger y qPCR, corriente abajo de DRS-WGA.

A partir del análisis de las características del método y kit de la presente invención, las ventajas resultantes son evidentes.

20 En particular, en virtud del hecho que DRS-WGA se basa en la digestión de restricción específica del ADN de hebra doble en el sitio de MseI (TTAA) y el ligado de un adaptador universal para la amplificación, en principio todos los fragmentos generados durante la amplificación que representan la biblioteca WGA son conocidos. Por lo tanto, por la identificación de los fragmentos MseI específicos que tienen una longitud > 1000 pb en una biblioteca de WGA de célula individual, puede medirse la integridad genómica del ADN de una célula aislada, y  
25 por lo tanto puede determinarse la calidad de la muestra para diferentes tipos de análisis molecular exitoso.

Debido a que el primero, el segundo y el tercer par de cebadores han sido seleccionados específicamente en regiones blanco del genoma correspondientes a amplicones largos de la enzima de digestión de ADN de DRS-WGA, MseI, que son más difíciles de amplificar en caso de fragmentación de ADN, su amplificación es indicativa de un buen éxito total de la DRS-WGA en una muestra dada.

Además, en virtud del hecho que el primero, el segundo y el tercer par de cebadores están diseñados en diferentes brazos del cromosoma, el método permite evaluar la integridad del genoma de una muestra y/o la calidad de la biblioteca de secuencias de ADN obtenida en la región más amplia del genoma.

5 Además, en virtud del hecho que el primero, el segundo, el tercero y el cuarto producto de PCR tienen tamaño diferente, es posible usar el primero, el segundo, el tercero y el cuarto par de cebadores juntos en una reacción en multiplex.

10 Más aún, en virtud del hecho que el cuarto par de cebadores hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca que tiene una longitud entre 80 pb y 300 pb, es posible predecir el desempeño de ensayos moleculares subsiguientes a la DRS-WGA también para células de baja calidad, por ejemplo CTC apoptóticas. De hecho, hay una diferencia significativa en el desempeño entre la tasa de éxito en por ejemplo el secuenciamiento de Sanger dirigido del exón 9 (30%) y del exón 20 (34%) de PIK3CA o qPCR para el análisis de Her2 CNV (25%) de células para las cuales no siquiera se amplifica este cuarto producto de PCR y aquellas células para las cuales por lo menos este puede amplificarse, para el cual la tasa de éxito aproximadamente se duplica (56%, 72%, 50% respectivamente). Las dos poblaciones podrían ser de otra manera no distinguibles cuando se usan solo los 3 pares de cebadores que hibridizan con amplicones largos de la DRS-WGA.

15

Finalmente, resulta claro que pueden hacerse modificaciones y variaciones al método y kit que se describen y que se muestran sin apartarse del alcance de la protección de las reivindicaciones anexas.

En particular, el método puede ser multiplexado con el uso de pares adicionales de cebadores que no interfieran con la amplificación por PCR con el primero, segundo, tercero y posiblemente cuarto cebador.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Silicon Biosystems s.p.A. and Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V.

<120> MÉTODO Y KIT PARA DETERMINAR LA INTEGRIDAD DEL GENOMA Y/O LA CALIDAD DE UNA BIBLIOTECA DE SECUENCIAS DE ADN OBTENIDAS POR AMPLIFICACIÓN DE GENOMA COMPLETO MEDIANTE SITIOS DE RESTRICCIÓN DETERMINÍSTICOS

25 <160> 18

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..20

<223> /mol\_type="ADN" /note="BCR-TT-3" /organism="Homo sapiens"

35 <400> 1

tcagcctcag gactcttggtg 20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

- <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..20
- 5 <223> /mol\_type="ADN" /note="BCR-TT-5" /organism="Homo sapiens"  
 <400> 2  
 cgtggacaac tacggagttg 20  
 <210> 3  
 <211> 20
- 10 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..20
- 15 <223> /mol\_type="ADN" /note="D5s2117-3" /organism="Homo sapiens"  
 <400> 3  
 actgagtctt ccaacctg 20  
 <210> 4  
 <211> 20
- 20 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..20
- 25 <223> /mol\_type="ADN" /note="D5s2117-5" /organism="Homo sapiens"  
 <400> 4  
 ccaggtgaga acctagtcag 20  
 <210> 5  
 <211> 20
- 30 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..20  
 <223> /mol\_type="ADN" /note="TRP53-Ex2/3-3" /organism="Homo sapiens"

5 <400> 5  
 cagcccaacc cttgcctta 20  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> ADN

10 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..20  
 <223> /mol\_type="ADN" /note="TRP53-Ex2/3-5" /organism="Homo sapiens"

15 <400> 6  
 gaagcgtctc atgctggatc 20  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN

20 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..20  
 <223> /mol\_type="ADN" /note="CK12-3" /organism="Homo sapiens"

25 <400> 7  
 ttcattgctca gctgtgactg 20  
 <210> 8  
 <211> 19  
 <212> ADN

30 <213> Homo sapiens  
 <220>

ES 2 637 385 T3

<221> source  
<222> 1..19  
<223> /mol\_type="ADN" /note="CK12-5" /organism="Homo sapiens"  
<400> 8  
5 gaagatccgc gactggtac 19  
<210> 9  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
10 <220>  
<221> source  
<222> 1..20  
<223> /mol\_type="ADN" /note="IGF2R-3" /organism="Homo sapiens"  
<400> 9  
15 ggatcttgg accactcatg 20  
<210> 10  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
20 <220>  
<221> source  
<222> 1..19  
<223> /mol\_type="ADN" /note="IGF2R-59" /organism="Homo sapiens"  
<400> 10  
25 gccactgtcg aagtctgca 19  
<210> 11  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
30 <220>  
<221> source



# ES 2 637 385 T3

<222> 1..22  
<223> /mol\_type="ADN" /note="RUFY2-3" /organism="Homo sapiens"  
<400> 11  
cagctaggaa ctccaggaat ca 22

5 <210> 12  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<220>

10 <221> source  
<222> 1..23  
<223> /mol\_type="ADN" /note="RUFY2-5" /organism="Homo sapiens"  
<400> 12  
gttgagggct tcatcaacac cca 23

15 <210> 13  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<220>

20 <221> source  
<222> 1..20  
<223> /mol\_type="ADN" /note="SMYD1-3" /organism="Homo sapiens"  
<400> 13  
ctttccctg aaggtcttag 20

25 <210> 14  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<220>

30 <221> source  
<222> 1..19

# ES 2 637 385 T3

<223> /mol\_type="ADN" /note="SMYD1-5" /organism="Homo sapiens"  
<400> 14  
gggtgacctg cttgacatc 19  
<210> 15  
5 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<221> source  
10 <222> 1..20  
<223> /mol\_type="ADN" /note="PHACTR2-3" /organism="Homo sapiens"  
<400> 15  
tgtgagaaag acttgagatt 20  
<210> 16  
15 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<221> source  
20 <222> 1..20  
<223> /mol\_type="ADN" /note="PHACTR2-5" /organism="Homo sapiens"  
<400> 16  
actgaacaga gcaggcttac 20  
<210> 17  
25 <211> 21  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<221> source  
30 <222> 1..21  
<223> /mol\_type="ADN" /note="KRAS 91pb 5' " /organism="Homo sapiens"

<400> 17

ataaggcctg ctgaaaatga c 21

<210> 18

<211> 23

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..23

10 <223> /mol\_type="ADN" /note="KRAS 91pb 3' " /organism="Homo sapiens"

<400> 18

ctgaattagc tgtatcgta agg 23

15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para determinar la integridad del genoma humano de una muestra a ser analizada por amplificación de genoma completo (WGA) y/o la calidad de una biblioteca de secuencias de ADN obtenidas por amplificación de genoma completo mediante sitios de restricción determinísticos (DRS-WGA) del genoma humano de la muestra que comprende los pasos de:
- (a) proveer la biblioteca de secuencias de ADN,
- (b) amplificar la biblioteca de secuencias de ADN por PCR usando:
- por lo menos un primer par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca que tiene una longitud entre 1000 pb y 5000 pb y que abarca la región D5S2117 del cromosoma 5q del genoma,
- 10 - por lo menos un segundo par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca que tiene una longitud entre 1000 pb y 5000 pb y que abarca los a los exones 2 y 3 del gen TRP53 del genoma, y
- por lo menos un tercer par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca que tiene una longitud entre 1000 pb y 5000 pb y que abarca al pseudogén 1 de KRT19 del genoma,
- 15 en donde el paso de amplificación da origen a un primer producto de PCR de entre 50 pb y 1000 pb, un segundo producto de PCR de entre 50 pb y 1000 pb que tiene un tamaño distinto al primer producto de PCR, y un tercer producto de PCR de entre 50 pb y 1000 pb que tiene un tamaño distinto que el primero y el segundo producto de PCR;
- (c) detectar el primero, el segundo y el tercer producto de PCR;
- 20 (d) correlacionar la presencia del primero, del segundo y del tercer producto de PCR con la integridad del genoma de la muestra y/o la calidad de la biblioteca de secuencias de ADN.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cebador directo del por lo menos un primer par de cebadores tiene la SEQ ID NO:4 y el cebador reverso del por lo menos un primer par de cebadores tiene la SEQ ID NO:3.
- 25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el cebador directo del por lo menos un segundo par de cebadores tiene la SEQ ID NO:6 y el cebador reverso del por lo menos un segundo par de cebadores tiene la SEQ ID NO:5.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cebador directo del por lo menos un tercer par de cebadores tiene la SEQ ID NO:8 y el cebador reverso del por lo menos un tercer par de cebadores tiene la SEQ ID NO:7.
- 30 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el paso (b) además usa por lo menos un cuarto par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca que tiene una longitud entre 80 pb y 300 pb, en donde el paso de amplificación da origen a un cuarto producto de PCR de entre 50 pb y 200 pb que tiene un tamaño distinto que el primero, el segundo y el tercer producto de PCR;
- el paso (c) además comprende detectar el cuarto producto de PCR;
- 35 - el paso (d) además comprende correlacionar la presencia del cuarto producto de PCR con la integridad del genoma de la muestra y/o la calidad de la biblioteca de secuencias de ADN.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la secuencia de ADN de la biblioteca con la que hibridiza el por lo menos un cuarto par de cebadores abarca el codón 12/13 del gen KRAS.
- 40 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el cebador directo del por lo menos un cuarto par de cebadores tiene la SEQ ID NO: 17 y el cebador reverso del por lo menos un cuarto par de cebadores tiene la SEQ ID NO:18.
8. Un kit para implementar el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende:
- por lo menos un primer par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca humana que tiene una longitud entre 1000 pb y 5000 pb y que abarca la región D5S2117 del cromosoma 5q del

genoma,

- por lo menos un segundo par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca humana que tiene una longitud entre 1000 pb y 5000 pb y que abarca los a los exones 2 y 3 del gen TRP53 del genoma, and

- 5 - por lo menos un tercer par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca humana que tiene una longitud entre 1000 pb y 5000 pb y que abarca al pseudogén 1 de KRT19 del genoma,

en donde el primero, el segundo y el tercer par de cebadores dan origen, cuando se amplifican por PCR, a productos de PCR que tienen diferentes tamaños entre sí.

- 10 9. El kit de acuerdo con la reivindicación 8, que además comprende por lo menos un cuarto par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca que tiene una longitud entre 80 pb y 300 pb, en donde el primero, el segundo, el tercero y el cuarto par de cebadores dan origen, cuando se amplifican por PCR, a productos de PCR que tienen diferentes tamaños entre sí.

10. Uso de un kit que comprende:

- 15 - por lo menos un primer par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca humana que tiene una longitud entre 1000 pb y 5000 pb y que abarca la región D5S2117 del cromosoma 5q del genoma,

- por lo menos un segundo par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca humana que tiene una longitud entre 1000 pb y 5000 pb y que abarca los a los exones 2 y 3 del gen TRP53 del genoma, and

- 20 - por lo menos un tercer par de cebadores que hibridiza con una secuencia de ADN de la biblioteca humana que tiene una longitud entre 1000 pb y 5000 pb y que abarca al pseudogén 1 de KRT19 del genoma,

en donde el primero, el segundo y el tercer par de cebadores dan origen, cuando se amplifican por PCR, a productos de PCR que tienen diferentes tamaños entre sí, para predecir el éxito de un ensayo de análisis genético después de la amplificación de un ADN genómico de célula individual mediante DRS-WGA.

- 25 11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el ensayo de análisis genético se selecciona del grupo que consiste en secuenciación de Sanger para el análisis de mutaciones, la evaluación de cambios de número de copias específicas, PCR cuantitativa para amplificación génica, Hibridización Genómica Comparativa (CGH) en metafase, e Hibridización Genómica Comparativa (CGH) en matriz.

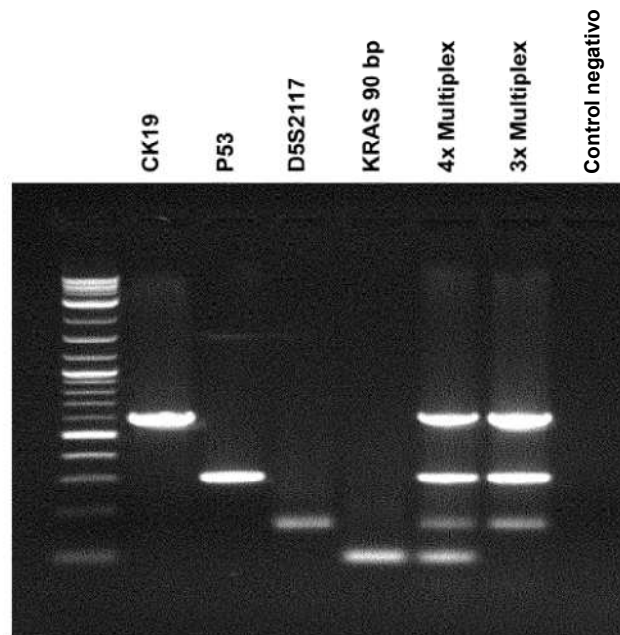
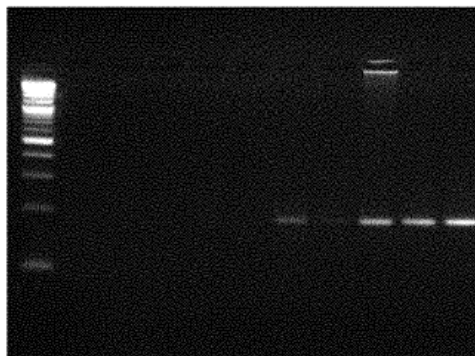


FIG. 1

**PIK3CA HS1**

M 01 02 03 04 05 06 07 08 09 10



**PIK3CA HS2**

M 01 02 03 04 05 06 07 08 09 10

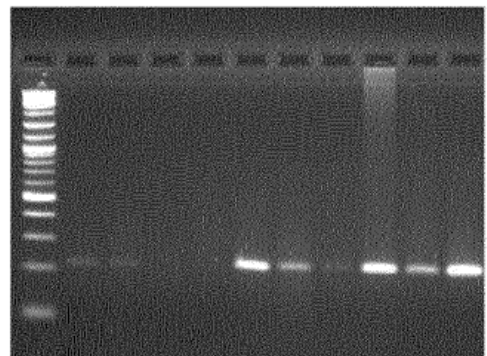


FIG. 2

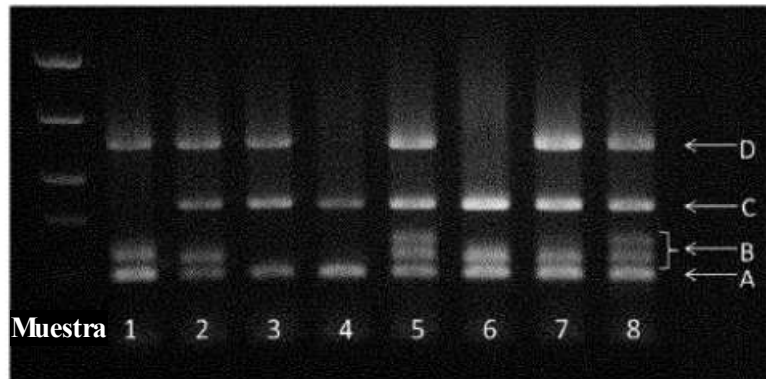


FIG. 3

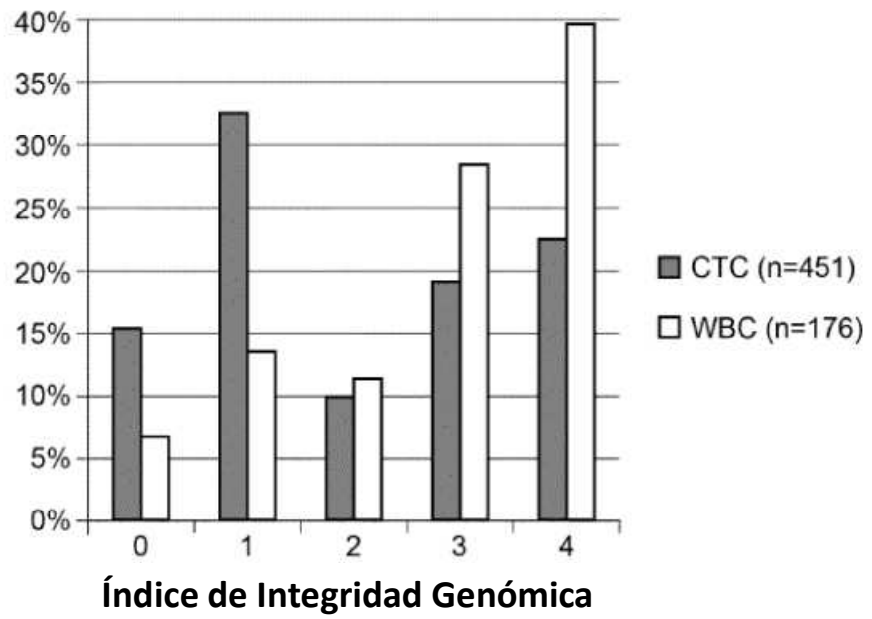


FIG. 4