

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 977**

51 Int. Cl.:

G01N 33/00 (2006.01)

G01N 33/493 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2014** **PCT/JP2014/083320**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015** **WO15088039**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2014** **E 14870595 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018** **EP 3081935**

54 Título: **Método de detección de cáncer mediante el sentido del olfato del nematodo**

30 Prioridad:

10.12.2013 JP 2013255145

22.04.2014 US 201461982341 P

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

08.04.2019

73 Titular/es:

KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION (100.0%)

**10-1, Hakozaki 6-chome Higashi-ku
Fukuoka-shi Fukuoka 812-8581, JP**

72 Inventor/es:

**HIROTSU, TAKAAKI y
SONODA, HIDETO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 707 977 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 de detección de cáncer mediante el sentido del olfato del nematodo

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para detectar cáncer usando el sistema olfativo de nematodos.

Técnica anterior

La neoplasia maligna, incluido el cáncer, ha sido la principal causa de muerte entre los japoneses desde 1981. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la tasa de muertes por neoplasia maligna en 2005 fue del 13% (7.600.000 personas) en todo el mundo y se predijo que la tasa de muertes por neoplasia maligna continuaría aumentando en el futuro.

Mientras la etapa del cáncer sea temprana, la carga mental, física, económica y social sobre la atención médica sería leve y la capacidad de curación también aumentaría. A medida que avanza la etapa del cáncer, dicha capacidad de curación disminuye, y en el caso de un cáncer recurrente progresivo no resecable, el cáncer causa una carga y pérdidas excesivas y da como resultado un tratamiento que prolonga la vida en las circunstancias actuales. Debido a que el cáncer se desarrolla como resultado de una anomalía en las funciones de los genes, en casi todos los tipos de cáncer, se produce un aumento en una población de 100.000 en proporción de 4-6 frente a la incidencia en cada edad (Cancer Patterns in Canada, 1982). Como tal, en todos los grupos de edad o sociedades, si el cáncer se puede encontrar y tratar en una etapa temprana, la carga y las pérdidas pueden reducirse aparentemente en diversas situaciones.

Sin embargo, en general, el cáncer temprano no tiene síntomas, los examinados médicos no tienen motivación suficiente para someterse a una prueba de detección de cáncer en las circunstancias actuales. De hecho, la tasa de detección de cáncer es aproximadamente del 10% al 35% en todos los tipos de cáncer en Japón. Estos valores numéricos son mucho más bajos que el objetivo del plan básico de medidas contra el cáncer en Japón, que tiene como objetivo el 50% o más de la tasa de detección de cáncer hasta 2017. En Japón, donde las técnicas para tratar el cáncer temprano, como los endoscopios o las técnicas quirúrgicas, se encuentran en un nivel superior en el mundo, si un método de detección de cáncer de alta precisión, que produce menos dolor, es simple y barato y se puede realizar en muchas personas como destinatarios, se desarrollara y aplicara recientemente, no es exagerado decir que supondría una revolución en los tratamientos contra el cáncer en el mundo.

Varios equipos, incluidos los presentes inventores, han estudiado el cáncer utilizando perros entrenados (perros detectores de cáncer) y han informado que el cáncer tiene un olor único y, por lo tanto, que el cáncer puede detectarse en una muestra que contiene cáncer temprano con una alta precisión de más del 90% (tanto la sensibilidad como la especificidad) (Bibliografía no de patente 1: Sonoda, H. et al., Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection. Gut, 60, 814-819, 2011).

A partir de estos informes, se considera que se puede construir un sistema de detección de cáncer de alta precisión mediante la detección de un olor que sea específico de un cáncer.

Sin embargo, la capacidad de dicho perro detector de cáncer depende de una diferencia individual y la concentración de los perros disminuye en verano, a medida que aumenta la temperatura. Por otra parte, no existe una metodología específica respecto a un método de entrenamiento de perros detectores. Adicionalmente, incluso en circunstancias en las que dicho perro detector de cáncer está en buenas condiciones, el límite de pruebas al día para el perro son cinco. Una prueba, que se realiza continuamente en una muestra, cuyo propósito de examen es completamente desconocido, proporciona una recompensa que es "jugar con una pelota" a un perro detector de cáncer, incluso si el perro detector se comporta de forma incorrecta. Esto da como resultado una reducción de la precisión. En consecuencia, la detección de cáncer, en la que se utilizan perros detectores, no se puede aplicar para uso comercial.

Además, se ha presentado un método para diagnosticar cáncer, que comprende especificar una sustancia volátil que utiliza un dispositivo analítico como el análisis GC/MS (cromatografía de gases/espectroscopía de masas) (Bibliografía no de patente 2: Y. Hanai, et al., Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer. Biosci. Biotechnol. Biochem. 76, 679-84, 2012) (Bibliografía no de patente 3: Khalid et al., A pilot study combining a GC-sensor device with a statistical model for the identification of bladder cancer from urine headspace. PLoS ONE, 8, e69602, 2013). Sin embargo, es muy probable que una sustancia volátil que existe en la vida diaria se convierta en un ruido y, por lo tanto, se necesitan enormes cantidades de fondos y técnicas analíticas para el desarrollo y la producción de equipos de detección.

Troemel et al. (Olfactory detection and discrimination in *C. elegans*, Mol. Biol. Cell, 7, no. Suppl., 170A, 1996) y Brömann et al. (Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*, Cell, 74(3)3, 515-527, 1993) describen la identificación y mutación de genes sospechosos de estar involucrados en la detección de odorantes. El

documento US 2006/191023 A1 describe kits para la detección de la actividad de uno o más agentes en un nematodo. El documento US 2010/248268 A1 describe el uso de proteínas quimiosensoriales derivadas de invertebrados para diagnosticar enfermedades como el cáncer.

5 BIBLIOGRAFÍAS DE TÉCNICAS RELACIONADAS

BIBLIOGRAFÍAS NO DE PATENTE

- 10 Bibliografía no de patente 1: Sonoda, H. et al., Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection. Gut, 60, 814-819, 2011
 Bibliografía no de patente 2: Y. Hanai, et al. Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer. Biosci. Biotechnol. Biochem. 76, 679-84, 2012
 Bibliografía no de patente 3: Khalid et al., A pilot study combining a GC-sensor device with a statistical model for the identification of bladder cancer from urine headspace. PLoS ONE, 8, e69602, 2013

15 Sumario de la invención

PROBLEMA A RESOLVER POR LA INVENCION

- 20 Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para detectar cáncer, utilizando el sistema olfativo de nematodos.

MEDIOS PARA RESOLVER EL PROBLEMA

- 25 Como resultado de los estudios intensivos dirigidos a resolver el problema mencionado anteriormente, el presente inventor ha encontrado que el cáncer puede detectarse, utilizando la quimiotaxis de los nematodos en función de su olfato o de la respuesta de la neurona olfativa, completando de esta forma la presente invención.

Específicamente, la presente invención es la siguiente.

- 30 (1) Un método *in vitro* para detectar cáncer, caracterizado por la detección de cáncer utilizando, como indicador, la reacción de los nematodos al olor de una sustancia relacionada con la biología derivada del sujeto o un producto procesado de la misma; en donde la sustancia relacionada con la biología o un producto procesado de la misma es una muestra biológica recolectada de un sujeto, o un producto procesado de la misma, en donde la muestra biológica es un fluido corporal, células, tejidos, sangre o espiración.
- 35 (2) El método de acuerdo con el anteriormente mencionado (1), en donde el nematodo es

(a) *Caenorhabditis elegans*; y/o

(b) un nematodo de tipo silvestre, un nematodo mutante o un nematodo transgénico.

- 40 (3) El método de acuerdo con los anteriormente mencionados (1) o (2), en donde cuando el nematodo muestra una respuesta positiva al olor de la sustancia relacionada con la biología derivada del sujeto o un producto procesado de la misma, se determina que el sujeto tiene cáncer o tiene riesgo de padecer cáncer.

- 45 (4) El método de acuerdo con uno cualquiera de los anteriormente mencionados (1) a (3), en donde cuando la respuesta de la neurona olfativa del nematodo es alta al olor de la sustancia relacionada con la biología derivada del sujeto o un producto procesado de la misma, se determina que el sujeto tiene cáncer o tiene riesgo de padecer cáncer.

- (5) El método de acuerdo con uno cualquiera de los anteriormente mencionados (1) a (4), en donde la sustancia relacionada con la biología o un producto procesado de la misma es un fluido corporal tal como orina, células, tejidos, un cultivo de las células o tejidos, o una solución conservante de las células o tejidos tal como solución salina fisiológica.

- 50 (6) Un método para identificar un receptor olfativo en nematodos, caracterizado por identificar un receptor olfativo usando nematodos; en donde se inhibe la expresión o función de un gen que codifica el receptor y se prueba la reacción del nematodo inhibido a un olor y, en donde

55 (a) el olor es el olor de los tipos de cáncer; y/o

(b) el tipo de receptor a identificar es diferente según los tipos de cáncer o la concentración de un odorante.

- 60 (7) El método de acuerdo con el anteriormente mencionado (6), en donde la expresión o función del gen receptor es inhibida por ARNi.

(8) El método de acuerdo con los anteriormente mencionados (6) o (7), en donde el nematodo es *Caenorhabditis elegans*.

- 65 (9) Un método para identificar tipos de cáncer, caracterizado por identificar tipos de cáncer utilizando, como indicador, la reacción de los nematodos al olor de una sustancia relacionada con la biología derivada del sujeto o un producto procesado de la misma; en donde el método comprende las siguientes etapas:

- (a) detectar cáncer por el método de acuerdo con uno cualquiera de los anteriormente mencionados (1) a (5),
- (b) probar la reacción de un nematodo modificado, que se ha preparado modificando un receptor identificado por el método de acuerdo con uno cualquiera de los anteriormente mencionados (6) a (8), al olor de una muestra, que se ha detectado que tiene cáncer en la etapa (a) y
- (c) determinar los tipos de cáncer correspondientes al receptor identificado como tipos de cáncer diana de la identificación cuando la reacción al olor es diferente entre el nematodo modificado y el nematodo utilizado en la etapa (a);

en donde la sustancia relacionada con la biología o un producto procesado de la misma es una muestra biológica recolectada de un sujeto, o un producto procesado de la misma, en donde la muestra biológica es un fluido corporal, células, tejidos, sangre o espiración.

(10) El método de acuerdo con el anteriormente mencionado (9), en donde la modificación del receptor es al menos una seleccionada del grupo que consiste en la eliminación del receptor, la inhibición de la expresión o función del receptor y la alta expresión o alta funcionalización del receptor.

(11) Uso de un kit para detectar o identificar cáncer, en el que el kit comprende nematodos.

(12) El uso de acuerdo con el anteriormente mencionado (11), en donde el nematodo es:

(a) *Caenorhabditis elegans*; y/o

(b) un nematodo de tipo silvestre, un nematodo mutante o un nematodo transgénico.

(13) Uso de un sistema para detectar cáncer, en donde el sistema comprende:

un nematodo,

una parte de almacenamiento para almacenar una sustancia relacionada con la biología o un producto procesado de la misma y el nematodo y una parte de detección para detectar la reacción a un olor del nematodo en la parte de almacenamiento.

EFFECTO DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método *in vitro* para detectar cáncer usando un nematodo. De acuerdo con el método de la presente invención, el cáncer puede detectarse con alta sensibilidad y a bajos costes. Por otra parte, de acuerdo con el método de la presente invención, el análisis de las muestras recolectadas se realiza fácilmente, y además, es barato. Adicionalmente, el método de la presente invención es capaz de detectar cáncer temprano. Por lo tanto, el método de la presente invención es extremadamente útil para pruebas clínicas para el cáncer.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista que muestra los resultados de la prueba de reacción de nematodos a la orina de sujetos sanos y de pacientes con cáncer.

La Figura 2 es una vista que muestra el formato de una placa de Petri utilizada en el método de la presente invención.

La Figura 3 es una vista que muestra un principio de medición cuando se usa un gen Yellow Cameleon como gen indicador.

La Figura 4 es una vista que muestra un principio de medición cuando se utiliza un gen GCaMP como gen indicador.

La Figura 5 una vista que muestra un chip que tiene un canal de micro flujo, en el que se dispone para un nematodo.

La Figura 6 es una vista que muestra el cambio de canales de flujo en un chip que tiene canales de micro flujo.

La Figura 7 es una vista que muestra los resultados obtenidos al examinar la reacción de la neurona olfativa AWC de un nematodo a la orina derivada de un paciente con cáncer.

La Figura 8 es una vista que muestra los resultados obtenidos al examinar la reacción de la neurona olfativa AWC de un nematodo a la orina derivada de un paciente con cáncer.

La Figura 9 es una vista que muestra los resultados obtenidos al examinar la quimiotaxis de los nematodos, utilizando una muestra de orina de la que se han eliminado los precipitados y los sólidos.

La Figura 10 es una vista que muestra los resultados obtenidos al examinar la reacción de la neurona olfativa AWA de un nematodo a la orina derivada de un paciente con cáncer.

La Figura 11 es una vista que muestra los resultados obtenidos al examinar la reacción de la neurona olfativa AWA de un nematodo a la orina derivada de un paciente con cáncer.

La figura 12 es una vista que muestra las placas de ensayo.

La Figura 13 es una vista que muestra el comportamiento de atracción de los nematodos a un medio de cultivo de células cancerosas.

La Figura 14 es una vista que muestra los resultados de una prueba a mediana escala del método de la presente invención.

La Figura 15 es una vista que muestra los resultados obtenidos al realizar una prueba a mediana escala

utilizando el método de la presente invención y otros marcadores tumorales y, a continuación, hacer una comparación entre ellos, en términos de sensibilidad.

La Figura 16A es un diagrama de bloques que muestra un sistema para su uso con la presente invención.

La Figura 16B es un diagrama de configuración que muestra una parte de procesamiento de un sistema para su uso con la presente invención.

La Figura 17 es una vista que muestra la quimiotaxis de los nematodos en medios de cultivo de fibroblastos que tienen diferentes concentraciones.

La Figura 18 es una vista que muestra la quimiotaxis de los nematodos en medios de cultivo de células cancerosas que tienen diferentes concentraciones.

colo205 = cáncer de intestino grueso, MKN1 = cáncer gástrico

La Figura 19 es una vista que muestra la quimiotaxis de los nematodos en los tejidos cancerosos y en los tejidos normales de un paciente con cáncer de colon sigmoide.

La Figura 20 es una vista que muestra la quimiotaxis de los nematodos en una solución diluida de una solución salina fisiológica, a la que se ha agregado una sección de tejido de cáncer humano y se ha conservado.

La Figura 21 es una vista que muestra los resultados obtenidos al probar la quimiotaxis de los nematodos, mientras se cambia la concentración de orina.

La Figura 22 es una vista que muestra el análisis de ARNi de un receptor olfativo asociado con una respuesta a un odorante específico.

(A) Confirmación de la eficacia de la estrategia de análisis de ARNi. El efecto del ARNi de un mutante eri-1 que se dirige a odr-10 se muestra en una respuesta quimiotáctica a una dilución 10^{-3} de diacetilo o una dilución 10^{-3} de pirazina. Se muestra una diferencia significativa respecto a un control ($P < 0,001$, prueba t de Student). (B) El número de genes candidatos a receptores olfativos obtenidos después del tercer análisis, que se ha asociado con la quimiotaxis a un odorante. (C) Los patrones de expresión de los indicadores fluorescentes, cuya expresión ha sido inducida por un promotor srx-47 o sra-17. El color verde indica la expresión de la proteína fluorescente Venus inducida por los promotores de estos genes. El color magenta indica la expresión de mCherry en las neuronas olfativas AWA, AWB y AWC. Se observó la expresión de srx-47 en neuronas AWA y ASH. Se detectó la expresión de sra-17 en neuronas AWA. Barra de escala: 10 μ m.

La Figura 23 es una vista que muestra los patrones de expresión de los genes candidatos a receptores olfativos.

(Izquierda) El color verde indica la expresión de Venus, que ha sido inducida por los promotores de los genes candidatos a receptores olfativos. (Centro) El color magenta indica (A) la expresión de mCherry en neuronas AWA, AWB y AWC, o neuronas sensoriales teñidas de colorante (neuronas ASH, ASJ, AWB, ASK, ADL, ASI, PHA y PHB) (B-M). (Derecha) Vista fusionada. Todas las imágenes son las imágenes del lado izquierdo de las regiones principales de los nematodos, a excepción de C, partes inferiores (regiones de la cola). Las flechas y las puntas de flecha indican los cuerpos celulares de las neuronas que expresan genes candidatos a receptores. Barra de escala = 10 μ m.

La Figura 24 es una vista que muestra que SRI-14 funciona para una respuesta a una alta concentración de diacetilo en neuronas ASH.

(A) La quimiotaxis de tipo silvestre (WT), odr-10 y sri-14 mutantes a una concentración baja y una concentración alta de diacetilo. Las concentraciones de diacetilo se muestran en las partes inferiores ($n = 5$). (B) Efectos de ARNi dirigidos a sri-14 en respuesta de evitación a una alta concentración de diacetilo (5 μ l, sin diluir) ($n = 8$). (C) La quimiotaxis del mutante sri-14 a una alta concentración de diacetilo (5 μ l, sin diluir, Da), alcohol isoamílico (5 μ l, sin diluir, laa) y benzaldehído (1 μ l, sin diluir, Bz), y también de los repelentes octanol (1 μ l, sin diluir, OCT) y nonanona (1 μ l, sin diluir, Nona) ($n = 6$). (D) Los patrones de expresión de los indicadores fluorescentes (verde), cuya expresión ha sido inducida por un promotor sri-14. La punta de flecha indica el cuerpo celular de AWC o ASH identificado por mCherry o por tinte fluorescente, respectivamente (magenta). (E) Efectos obtenidos por el ARNi específico de ASH o AWC de un nematodo de tipo silvestre en sri-14, con respecto a la quimiotaxis a una alta concentración de diacetilo (5 μ l, sin diluir) ($n = 5$). (F) Efectos obtenidos por la expresión neuronal específica del ADNc de sri-14, con respecto a un defecto en la respuesta de un mutante sri-14 a una alta concentración de diacetilo (5 μ l, sin diluir) ($n = 5$). (G) Localización de SRI-14::GFP en los cilios sensoriales de ASH. Barra de escala: 10 μ m (D y G). Las barras de error indican EEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, Prueba t de Student (B y C) o prueba de Dunnett (A, E, y F).

La Figura 25 es una vista que muestra los resultados obtenidos al analizar de manera repetida la quimiotaxis de nematodos tratados con ARNi a una alta concentración de diacetilo.

Además de los ARNi de sri-14, los ARNi de srh-25, srh-79, srh-216 o srh-281, entre los genes de receptores candidatos con respecto a la respuesta a una alta concentración de diacetilo (5 μ l, sin diluir) obtenida después del tercer análisis, han causado un defecto significativo y reproducible en un comportamiento de evitación de diacetilo. Las barras de error indican EEM. Se muestra una diferencia significativa de un control (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; prueba t de Student incluyendo la corrección de Bonferroni).

La Figura 26 es una vista de la estructura de sri-14.

sri-14 codifica una proteína 7-transmembrana. (A) La estructura del gen sri-14. Muestra una región de delección del alelo ok2685. (B) Las supuestas secuencias de aminoácidos de SRI-14. Muestra un dominio 7-transmembrana predicho por un modelo oculto de Markov. (C) Un gráfico hidrófobo de SRI-14. El gráfico deriva de un parámetro de hidropatía definido por Kyte y Doolittle. (D) El mutante sri-14 mostró un comportamiento de evitación normal a un estímulo osmótico alto (NaCl 4M). Las barras de error indican EEM. Se muestra una diferencia significativa de un control (**P < 0,01, prueba de Dunnett).

La Figura 27 es una vista que muestra neuronas asociadas con una respuesta a una alta concentración de diacetilo. (A) La quimiotaxis de nematodos de tipo silvestre ($n \geq 8$), en los que se han eliminado las neuronas sensoriales específicas, a una alta concentración de diacetilo (5 μ l, sin diluir). (B) La quimiotaxis de nematodos, de los cuales se ha eliminado AWA, a diacetilo diluido a 10^{-3} . (C) Una vista esquemática que muestra conexiones neuronales entre las neuronas sensoriales AWA y ASH y 4 interneuronas de primera capa. (D) La quimiotaxis de los nematodos de tipo silvestre ($n \geq 5$), en los que se han inhibido interneuronas específicas, a una alta concentración de diacetilo (5 μ l, sin diluir). (E) La quimiotaxis de los nematodos de tipo silvestre ($n \geq 5$), en los que se han inhibido interneuronas específicas, a diacetilo diluido a 10^{-3} . Las barras de error indican EEM. **P < 0,01, ***P < 0,001, Prueba de Dunnett; †††P < 0,001; prueba t de Student. En la Figura 27 (A), el asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa, en comparación con una cepa de control de tipo silvestre en la que ninguna neurona ha sido eliminada ni inhibida.

La Figura 28 es una vista que muestra la respuesta de las neuronas AWA a diversas concentraciones de diacetilo. (A) La respuesta a calcio de las neuronas AWA en un nematodo de cada genotipo designado, después de la estimulación por una baja concentración de diacetilo (diluido a 10^{-5}). La región sombreada alrededor de la curva indica EEM ($n \geq 8$ en todos los genotipos). La barra negra indica la presencia de estimulación con diacetilo. (B) Un cambio en la fluorescencia media 10 segundos después de la adición de una baja concentración de diacetilo (diluido a 10^{-5}). Las barras de error indican EEM. **P < 0,01, Prueba de Dunnett ($n \geq 8$ en cada genotipo). El color negro indica TS, el color rojo indica mutantes sri-14 y el color azul indica mutantes odr-10. (C) La respuesta a calcio de las neuronas AWA en un nematodo de cada genotipo designado, después de la estimulación por una alta concentración de diacetilo (diluido a 10^{-3}). Los datos se muestran de la misma manera que en (A) anteriormente descrita ($n \geq 8$ en todos los genotipos). (D) Un cambio en la fluorescencia media 10 segundos después de la adición de una alta concentración de diacetilo (diluido a 10^{-3}). La barra de error indica EEM ($n \geq 8$ en todos los genotipos).

La Figura 29 es una vista que muestra la respuesta de las neuronas ASH a diversas concentraciones de diacetilo. (A) La respuesta a calcio de las neuronas ASH en nematodos de tipo silvestre, después de la estimulación por una concentración baja (diluido a 10^{-5}) y una concentración alta (diluido a 10^{-3}) de diacetilo ($n \geq 11$). (B) La respuesta a calcio de las neuronas ASH en los mutantes sri-14 ($n = 26$), los mutantes odr-10 ($n = 28$), los mutantes de sri-14 que tienen la expresión específica de ASH del ADNc de sri-14 (rescate de sri-14, $n = 9$), y nematodos de tipo silvestre que involucran los ARNi específicos de ASH de sri-14 ($n = 20$). La región sombreada alrededor de la curva indica EEM. La barra negra indica la presencia de estimulación con diacetilo. (C) Un cambio en la fluorescencia media 10 segundos después de la adición de una alta concentración de diacetilo (diluido a 10^{-3}). Las barras de error indican EEM. *P < 0,05, prueba de Dunnett ($n \geq 11$).

La Figura 30 es una vista que muestra la imagen de calcio de neuronas ASH en mutantes unc-13 y nematodos con AWA eliminadas. La respuesta a calcio de las neuronas ASH en nematodos de tipo silvestre (A, N = 14), mutantes unc-13 (B, N = 14) y nematodos con AWA eliminadas (C, N = 11), después de la estimulación por una alta concentración de diacetilo (diluido a 10^{-3}). En el caso de los mutantes unc-13 y los nematodos con AWA eliminadas, se observó una respuesta a calcio, que ha continuado durante un período de tiempo más largo que en el caso de las neuronas de nematodos de tipo silvestre. La región sombreada alrededor de la curva indica EEM. La barra negra indica la presencia de estimulación con diacetilo. (D) Un cambio en la fluorescencia media 10 segundos después de la adición de una alta concentración de diacetilo. Las barras de error indican EEM. Se muestra una diferencia significativa de un control (*P < 0,05, prueba de Dunnett).

La Figura 31 es una vista que muestra la respuesta de neuronas AWC a la eliminación de una alta concentración de diacetilo. La respuesta a calcio de las neuronas AWC en nematodos de tipo silvestre, después de la eliminación de una alta concentración de diacetilo (diluido a 10^{-3}) ($n = 10$). La región sombreada alrededor de la curva indica EEM. La barra negra indica la presencia de diacetilo.

La Figura 32 es una vista que muestra la respuesta de neuronas AWB a la eliminación de una alta concentración o una baja concentración de diacetilo. (A) La respuesta a calcio de las neuronas AWB en nematodos de tipo silvestre (marrón, $n = 10$) o de neuronas AWB en nemátodos en los cuales se ha expresado sri-14 ectópicamente (naranja, $n = 11$), después de la eliminación de una baja concentración (diluido a 10^{-5} , izquierda) o de una alta concentración (diluido a 10^{-3} , derecha) de diacetilo. La región sombreada alrededor de la curva indica EEM. La barra negra indica la presencia de diacetilo. (B) Un cambio en la fluorescencia media 10 segundos después de la eliminación de diacetilo. La barra blanca indica una cepa de tipo silvestre; y la barra naranja indica una cepa en la que se ha expresado sri-14 ectópicamente en AWB. Las barras de error indican EEM. ***P < 0,001, prueba t de Student ($n \geq 10$).

La Figura 33 es un diagrama modelo que muestra el cambio de un receptor olfativo, que depende de la

concentración de un olor. A una concentración más baja de diacetilo, ODR-10 en las neuronas AWA funciona como un receptor de diacetilo y provoca la activación de AWA y un comportamiento de atracción pero no SRI-14 en las neuronas ASH. Por el contrario, SRI-14 en las neuronas ASH detecta una concentración más alta de diacetilo, pero no la detecta ODR-10 en las neuronas AWA. Las neuronas ASH se activan solo por una mayor concentración de diacetilo, e inducen un comportamiento de evitación. AWA también responde a una mayor concentración de diacetilo, lo que indica que los receptores olfativos distintos de ODR-10 en las neuronas AWA responden a una mayor concentración de diacetilo.

La Figura 34 es una vista que muestra la quimiotaxis de una cepa N2 y una cepa mutante genética en la orina de pacientes que tienen varios tipos de cáncer.

La Figura 35 es una vista que muestra la quimiotaxis de una cepa N2 y una cepa mutante genética para varios tipos de sustancias químicas.

La Figura 36 es una vista que muestra la quimiotaxis de la cepa con receptor olfativo atenuado en la orina de pacientes con cáncer de mama.

La Figura 37 es una vista esquemática que muestra un método para especificar tipos de cáncer mediante la realización de una prueba con respecto a la quimiotaxis de nematodos.

REALIZACIONES PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con detalle.

1. Sumario

(1) Detección de cáncer

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para detectar cancer como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el método se caracteriza por la cría de nematodos en presencia de una sustancia relacionada con la biología derivada del sujeto o un producto procesado de la misma, y a continuación detectar cáncer, por ejemplo, utilizando la quimiotaxis de los nematodos basándose en su olfato como un indicador.

Tras evaluar si un sujeto ha tenido cáncer o no, el presente inventor se ha centrado en, en un aspecto, la quimiotaxis del nematodo *C. elegans* basándose en el olfato del mismo en una muestra derivada del sujeto.

Un nematodo, *Caenorhabditis elegans* (en lo sucesivo en este documento también abreviado como "*C. elegans*"), es un organismo popular, que ha sido ampliamente criado y estudiado como un organismo modelo para el estudio biológico en laboratorios de todo el mundo. *Caenorhabditis elegans* se caracteriza porque su cría es fácil y tiene un excelente sistema olfativo.

Dichos nematodos muestran una quimiotaxis a un odorante, tal como acercarse o escapar de él. Por lo tanto, en la presente invención, utilizando tal comportamiento como un indicador, se examinarán las reacciones de los nematodos a los olores de cánceres.

Se han examinado las reacciones de los nematodos a la orina de sujetos sanos y pacientes con cáncer. Como resultado, los nematodos han mostrado un comportamiento de evitación a la orina de los sujetos sanos, mientras que han mostrado un comportamiento de atracción a la orina de los pacientes con cáncer. Como resultado del examen realizado en 30 muestras, se encontró que la precisión era del 100% (Figura 1).

Por otra parte, los nematodos han reaccionado con todos los cánceres gástricos, cánceres de colon/recto y cánceres pancreáticos, incluidos los cánceres tempranos. Por lo tanto, se ha demostrado que, al igual que con el comportamiento de los perros detectores de cáncer, los nematodos reaccionan con olores específicos del cáncer, que son comunes en varios tipos de cáncer.

En consecuencia, en la presente invención, tipos de cáncer, tales como cáncer gástrico, cáncer de colon/rectal, cáncer de esófago, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer del conducto biliar, cáncer de mama, linfoma maligno, tumor estromal gastrointestinal, cáncer de ciego y cáncer de pulmón, pueden usarse como dianas de detección.

Este sistema de diagnóstico de cáncer que utiliza nematodos puede resolver muchos problemas de las técnicas de la técnica anterior, como se describe a continuación.

(i) El sistema actual de diagnóstico de cáncer es capaz de detectar el cáncer temprano.

Incluso se puede detectar cáncer temprano de etapa 0 o 1 con alta precisión. Una muestra, que se había determinado que era negativa por un marcador tumoral existente en el momento de la recolección de orina

(2011), ha dado positivo por esta prueba. Este paciente ha desarrollado cáncer durante dos años en la observación de seguimiento. Es decir, puede detectarse cáncer no detectable por los marcadores tumorales existentes por la presente invención.

(ii) La presencia de muchos tipos de cáncer se puede diagnosticar con una sola prueba. Es decir, muchos tipos de cánceres pueden diagnosticarse por un único examen médico. Hasta la fecha, se ha confirmado que el cáncer gástrico, cáncer de colon/rectal, cáncer de esófago, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer del conducto biliar, cáncer de mama, linfoma maligno, tumor estromal gastrointestinal, cáncer de ciego y cáncer de pulmón se pueden detectar mediante el presente sistema de diagnóstico de cáncer.

(iii) El presente sistema de diagnóstico de cáncer tiene una alta sensibilidad.

En una prueba utilizando 30 muestras, el presente sistema de diagnóstico de cáncer ha sido capaz de detectar cánceres con una sensibilidad/especificidad del 100%. Por otra parte, incluso en una prueba a mediana escala (con 242 muestras), el presente sistema de diagnóstico de cáncer ha sido capaz de detectar cánceres en pacientes con cáncer con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 95%.

(iv) Es fácil recoger muestras.

No se determinan condiciones especiales tales como restricción dietética para la recolección de muestras de orina. Pueden usarse muestras de orina recogidas en un examen médico ordinario y regular para el análisis. Por lo tanto, los sujetos no necesitan sentir dolor y es posible recolectar muestras al mismo tiempo que se realiza otro examen de orina. La cantidad necesaria de orina es solo de varios microlitros (μ l).

(v) El análisis puede realizarse fácilmente a bajos costes.

(v-1) El análisis puede llevarse a cabo con prontitud.

Es posible realizar análisis en poco tiempo. Se tarda aproximadamente 1,5 horas en analizar la quimiotaxis de los nematodos. Se tarda aproximadamente 30 minutos en analizar la respuesta de la neurona olfativa de los nematodos transgénicos.

(v-2) Económico

Por ejemplo, el presente sistema de diagnóstico de cáncer cuesta lo siguiente: para una muestra, dos placas de petri para criar nematodos (aproximadamente 10 yenes por placa de petri) y de tres a cinco placas de petri para analizar la quimiotaxis de los nematodos (aproximadamente 10 yenes por placa de petri). El agar cuesta 2,5 yenes y cada tipo de placa de Petri 10 yenes. Por lo tanto, el coste de una muestra es de aproximadamente 100 yenes, incluidos los costes de otros reactivos y similares. Incluso si se añaden los gastos de personal a los costes mencionados anteriormente, el análisis puede realizarse de forma extremadamente económica. (v-3) El análisis es fácil, y por lo tanto, no requiere habilidades profesionales.

La quimiotaxis de los nematodos se puede analizar de manera extremadamente sencilla y, por lo tanto, cualquiera puede hacerlo. Además, la cría de los nematodos también es fácil. No es necesario entrenamiento especial de nematodos y normalmente se pueden usar nematodos criados para el análisis.

(v-4) El análisis puede llevarse a cabo en muchas muestras.

Un solo investigador es capaz de realizar el análisis de quimiotaxis unas 150 veces al día. Como se analiza la quimiotaxis 3 veces para una sola muestra, se pueden analizar 50 muestras por día. También es posible automatizar esta operación.

(vi) La aplicación del presente sistema de diagnóstico de cáncer es fácil y el sistema puede aplicarse en todo el mundo.

(vi-1) El sistema en su conjunto es barato y se puede aplicar fácilmente.

La cría de nematodos no requiere una sala especial. Los aparatos necesarios son únicamente una incubadora a 20 °C y un microscopio estereoscópico, y por lo tanto, el sistema se puede construir a bajo coste y en poco tiempo.

(vi-2) El sistema se puede aplicar en todo el mundo.

Debido a que el presente sistema no necesita un dispositivo de medición costoso, se puede introducir, no solo en países avanzados, sino también en todos los países.

(vii) El presente sistema de diagnóstico de cáncer puede aplicarse al diagnóstico de cáncer recurrente después de la terapia contra el cáncer.

Debido a que el presente sistema es capaz de detectar cánceres en todos los sitios, puede aplicarse a la determinación de la posibilidad de recurrencia postoperatoria.

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención es útil como un método de examen del cáncer novedoso, altamente preciso, que produce menos dolor a un sujeto, en el cual las operaciones se pueden realizar fácilmente a bajo coste y se pueden realizar en muchas personas como destinatarios.

(2) Identificación de receptores olfativos

Un olor es recibido por un receptor olfativo en una neurona olfativa. Se puede decir que un ser humano tiene aproximadamente 350 tipos de receptores olfativos y es capaz de identificar aproximadamente diez mil tipos de olores. Se desconoce cómo un número tan pequeño de receptores son capaces de identificar un enorme número de

odorantes. Para dilucidarlo, es necesario revelar la relación de correspondencia entre un olor y un receptor. Sin embargo, tal intento se ha llevado a cabo solo parcialmente, y como resultado, apenas se conoce la relación de correspondencia, en particular, en un animal vivo.

- 5 El nematodo *C. elegans* es útil para análisis *in vivo*, tiene solo alrededor de 10 neuronas olfativas (por otro lado, un humano tiene alrededor de 5.000.000 de neuronas olfativas), y se han identificado todos sus circuitos neurales. Además, el nematodo *C. elegans* tiene casi el mismo mecanismo para detectar un olor que el de los mamíferos. En consecuencia, se consideran *C. elegans* como un organismo modelo para el estudio de los mecanismos olfativos. Los receptores olfativos de *C. elegans* son del mismo tipo acoplado a proteína G 7-transmembrana que los mamíferos y hay 1.200 o más receptores olfativos predichos en su genoma. Sin embargo, entre tales receptores olfativos, solo se ha revelado un receptor (un receptor de diacetilo, ODR-10) con respecto a la relación de correspondencia con un odorante y se desconoce cómo el nematodo recibe señales de olor.

- 15 Por lo tanto, el presente inventor ha llevado a cabo un análisis exhaustivo, en el que el inventor ha inhibido la función de los genes de los receptores olfativos en los nematodos vivos mediante ARNi y, a continuación, ha examinado cómo los nematodos tratados con ARNi responden a 11 tipos de odorantes. Se han recogido y analizado genes implicados en la respuesta del nematodo para cada olor de manera repetida. Como resultado, el presente inventor ha logrado obtener genes candidatos para todos los odorantes examinados (Figura 22B).

- 20 Posteriormente, con el fin de aclarar si los genes candidatos obtenidos funcionan o no realmente como receptores olfativos en el animal vivo, el presente inventor se ha centrado en un fenómeno por el cual la preferencia (gustos y aversiones) a un solo olor varía dependiendo de la concentración del olor. En el caso de un ser humano, se conoce empíricamente que la preferencia por un olor cambia dependiendo de sus concentraciones, y por ejemplo, una baja concentración de indol provoca el olor a jazmín, mientras que una alta concentración de indol provoca el olor de las heces y la orina. El presente inventor había aclarado en los estudios previos que se observa un fenómeno similar también en nematodos y que cambia el tipo de neurona olfativa que se activa según la concentración de un olor y, de este modo, se modifica la preferencia (Yoshida, K. et al.: Nature Communications 3, 739 (2012)). ¿El tipo de un receptor que reacciona a un solo olor cambia, dependiendo de la concentración del olor? Para analizar esta interesante pregunta, el presente inventor se ha centrado en un gen *sri-14*, que se obtuvo como un gen asociado con la recepción de una alta concentración de diacetilo. Un mutante de pérdida de función *sri-14* ha tenido una reacción normal a una baja concentración de diacetilo y ha mostrado anomalías solo en la reacción a una alta concentración de diacetilo. Por otro lado, en un mutante del receptor de diacetilo ODR-10 existente, solo se ha reducido la reacción a una baja concentración de diacetilo (Figura 24A). Ya se había informado de que ODR-10 funciona en una neurona olfativa AWA que recibe un olor favorito (Sengupta, P. et al.: Cell 84, 899-909 (1996)). Como resultado del análisis de la expresión de *sri-14*, un experimento de rescate y un experimento de inhibición de la expresión génica de neuronas específicas, se ha descubierto que SRI-14 funciona en una neurona sensorial ASH que recibe un olor repulsivo (Figura 24). Además, se ha observado la localización de SRI-14 en los cilios sensoriales, en los que están presentes receptores olfativos (Figura 24G).

- 40 En el presente documento, ejemplos del experimento de inhibición de la expresión génica incluyen: inhibición en la que se utiliza ARNi; inhibición en la que se utiliza ácido nucleico antisentido; e inhibición por la expresión de un gen mutante dominante negativo. Entre estas, se prefiere la inhibición utilizando ARNi.

- 45 A continuación, se ha observado la respuesta de las neuronas sensoriales AWA y ASH al diacetilo utilizando imágenes de calcio. La neurona AWA de tipo silvestre respondió tanto a una baja concentración como a una alta concentración de diacetilo, pero la neurona AWA de un mutante *odr-10* no respondió a una baja concentración de diacetilo (Figura 28). La neurona AWA de un mutante *sri-14* mostró una respuesta normal. Por otro lado, la neurona sensorial ASH respondió solo a una alta concentración de diacetilo y la respuesta de la misma se redujo significativamente en un mutante *sri-14*. La respuesta fue normal en un mutante *odr-10* (Figura 29). Por otra parte, cuando se expresó *sri-14* ectópicamente en otra neurona sensorial AWB, que no respondió al diacetilo, AWB respondió fuertemente a una alta concentración de diacetilo (Figura 32). Por lo tanto, se ha sugerido firmemente que SRI-14 funciona como un receptor de diacetilo *in vivo*. A partir de estos resultados, se ha descubierto que varios receptores están acostumbrados a un único olor, dependiendo de sus concentraciones, y que ODR-10 recibe una baja concentración de diacetilo en la neurona AWA y se percibe como un olor favorable, mientras que SRI-14 recibe una alta concentración de diacetilo en la neurona ASH y se percibe como un olor repulsivo (Taniguchi, G. et al.: Science Signaling 7, ra39 (2014)) (Figura 33).

- 60 Debido a que un nematodo es un organismo excelente en el sistema olfativo, que tiene casi la misma cantidad de receptores olfativos que un perro, es probable que el nematodo reconozca, con alta sensibilidad, el olor de una sustancia nociva y el olor de una sustancia útil, como con los perros detectores de drogas. En dicho caso, a partir de los resultados del presente estudio, se puede identificar el receptor de tal olor. Si se entendiera la relación de correspondencia entre el olor y el receptor, se predeciría que se puede desarrollar un sensor de olor artificial basado en la unión del olor y el receptor como un modelo. Un análisis del olfato utilizando nematodos es útil y contribuirá ampliamente a la sociedad en el futuro.

65

2. Método de detección

(1) Nematodo

5 El nematodo utilizado en el método de la presente invención es un tipo de nematodo de vida libre en el suelo y se ha utilizado ampliamente como un organismo modelo para estudios biológicos. El nematodo utilizado en el método de la presente invención es un gusano macho o hembra y se prefiere un nematodo hermafrodita porque puede proliferar como resultado de la auto-proliferación. Además, el nematodo utilizado en la presente invención puede criarse en una placa de Petri, dando *Escherichia coli* como alimento, y por lo tanto, la cría del mismo es fácil. Si un nematodo padre se transfiere a una placa de Petri, las larvas nacen y crecen hasta gusanos adultos cuatro días después, y por lo tanto, el número de nematodos aumentará de 50 a 100 veces. Durante tal cría, la placa de Petri se puede colocar en una incubadora y se puede dejar, a continuación, como está. No se necesitan operaciones especiales. Si se usa un nematodo hermafrodita, las operaciones como el cruce tampoco son necesarias. Los aparatos necesarios para la cría son una incubadora a 20 °C y un microscopio estereoscópico, y por lo tanto, el sistema se puede construir a bajo coste y en poco tiempo.

Un ejemplo de los nematodos usados en la presente invención, cuando es un nematodo de tipo silvestre, incluye *Caenorhabditis elegans*. Preferentemente se utiliza un hermafrodita de la cepa Bristol N2 de *C. elegans*. De otro modo, también se pueden usar cepas genéticas mutantes que incluyen una mutación de varios genes. Estos nematodos están disponibles, por ejemplo, del Centro Genético de *Caenorhabditis* (CGC).

En la presente invención, además de los nematodos mencionados anteriormente (nematodos de tipo silvestre), también se pueden usar nematodos mutantes y nematodos transgénicos. Los ejemplos del nematodo transgénico incluyen: un nematodo, en el que se ha introducido un gen indicador en las neuronas olfativas AWC y AWA; un nematodo, en el que se ha inhibido la expresión o función de un gen asociado con la recepción del olor del cáncer (gen receptor); un nematodo, en el que se ha sobreexpresado o funcionalizado al alza un gen asociado con la recepción del olor del cáncer (gen receptor); y un nematodo, en el que se ha expresado en cada célula una proteína fluorescente para facilitar el análisis del comportamiento del mismo. Sin embargo, los ejemplos del nematodo transgénico no están limitados a ellos, y se pueden usar todas las cepas transgénicas, en las que se ha introducido un gen extraño.

En algunas realizaciones de la presente invención, se construye ADN, en el que un gen de interés se liga inmediatamente cadena abajo de un promotor predeterminado de un nematodo, y el ADN obtenido se microinyecta, a continuación, en una cepa de nematodo de tipo silvestre o en una cepa de nematodo mutado genéticamente (por ejemplo, gónada). De este modo, se puede producir un nematodo transgénico capaz de pasar de manera estable el gen extraño. Un aumento en la concentración de calcio indica activación de las neuronas. Por lo tanto, por ejemplo, se utiliza un gen indicador capaz de medir una concentración de calcio en la neurona, y el cáncer puede detectarse utilizando un cambio en la concentración de calcio como indicador.

Un ejemplo del promotor utilizado para la expresión en AWC incluye un promotor *odr-1* (Yu, S., Avery, L., Baude, E. y Garbers, D. L. Guanylyl cyclase expression in specific sensory neurons: a new family of chemosensory receptors. Proc Natl Acad Sci USA 94, 3384-3387 (1997).). El *odr-1* induce la expresión en AWC y en AWB (que es otra neurona olfativa distinta de AWC).

Un ejemplo del promotor utilizado para la expresión en AWA incluye un promotor *odr-10* (Sengupta, P., Chou, J. H. y Bargmann, C. I. *odr-10* encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. Cell 84, 899-909 (1996).). Se sabe que *odr-10* induce la expresión solo en AWA.

La información de la secuencia base con respecto a estos promotores se puede obtener, por ejemplo, de los números de acceso Z68118 y FO080931. Como alternativa, también es posible obtener tal promotor mediante la purificación del ADN genómico de un nematodo y a continuación, mediante la realización de la amplificación por PCR utilizando el ADN genómico como plantilla.

Ejemplos del gen indicador de calcio incluyen: un gen Yellow Cameleon (YC) (Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M. y Miyawaki, A. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins. Proc Natl Acad Sci USA 101, 10554-10559 (2004).); y un gen GCaMP (Nakai, J., Ohkura, M. y Imoto, K. A high signal-to-noise Ca2+ probe composed of a single green fluorescent protein. Nat. Biotechnol. 19, 137-141 (2001).). La información de la secuencia base con respecto a estos genes está disponible, por ejemplo, de los números de acceso AB178712 y HM143847. Como alternativa, estos genes también se pueden obtener de Addgene.

El método de ligar un gen indicador inmediatamente cadena abajo de un promotor, el método de microinyección y similares son bien conocidos en el campo técnico actual, y por ejemplo, puede hacerse referencia a "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4ª Edición)" (Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012)), etc. Como alternativa, se puede inyectar una solución de ADN en la gónada de un nematodo de acuerdo con un método conocido (Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D. y Ambros, V. Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance

and integration of transforming sequences. EMBO J 10, 3959-3970 (1991).).

Se utiliza nematodo mutante para referirse a, por ejemplo, un nematodo que comprende un polimorfismo en el genoma de un nematodo de tipo silvestre, un nematodo mutante que comprende una mutación de un receptor olfativo para el olor de cada tipo de cáncer, etc. (que se describirá en los ejemplos más adelante).

(2) sustancia relacionada con la biología derivada del sujeto o producto procesado de la misma

La muestra utilizada en la presente invención es una sustancia relacionada con la biología derivada del sujeto (un sujeto sano, un paciente con cáncer, un paciente sospechoso de tener cáncer, un animal, etc.) o un producto procesado de la misma, en donde la sustancia relacionada con la biología o un producto procesado de la misma es una muestra biológica recolectada de un sujeto, o un producto procesado de la misma, en donde la sustancia relacionada con la biología es un fluido corporal (orina, sudor, saliva o líquido de heces), células (células obtenidas de biopsia, etc.), tejidos tales como tejidos cancerosos (tejidos obtenidos de biopsia, secciones de tejido, etc.), sangre y espiración. En la presente invención, se pueden utilizar estas muestras biológicas directamente. Sin embargo, se usa preferentemente un producto procesado de tal sustancia relacionada con la biología. La expresión "producto procesado" se usa para referirse a una muestra obtenida mediante el procesamiento físico y/o químico de una sustancia relacionada con la biología.

La muestra de fluido corporal, como la orina, incluye un sólido y un precipitado. En el caso de la orina, por ejemplo, se puede utilizar orina recogida directamente. Sin embargo, debido a que la muestra de orina debe administrarse a un nematodo a través de un tubo estrecho, se somete preferentemente a un tratamiento de eliminación por filtro (por ejemplo, tamaño de poro: 0,22 µm, Millex GP, Merck Millipore). Una muestra de orina, que ha sido sometida a un tratamiento de eliminación de sólidos utilizando filtro de este tipo, se incluye en el "producto procesado" descrito anteriormente. Debe observarse que el presente inventor ha confirmado mediante un experimento preliminar que la reacción de un nematodo (comportamiento de atracción a la orina) no se modifica por dicho tratamiento de filtro (Figura 9).

Como se ha descrito anteriormente, cuando las células (p. ej., las células cancerosas obtenidas de la biopsia) se usan como una sustancia relacionada con la biología, se elimina un sólido, tal como un producto desintegrado celular, de un cultivo obtenido después del cultivo celular mediante centrifugación, filtración o similar, y se puede utilizar como un producto procesado, un sobrenadante del cultivo obtenido después de la eliminación del sólido.

Por otra parte, en la presente invención, además de las muestras mencionadas anteriormente, también se puede usar una solución conservante de células cancerosas o tejidos cancerosos (tejidos obtenidos de biopsias, secciones de tejidos, etc.). Los ejemplos de dicha solución conservante incluyen una solución salina fisiológica, un tampón, formalina y DMSO, pero los ejemplos no están limitados a ellos. La solución conservante incluye una solución conservante para la crioconservación, que se utiliza comúnmente para la crioconservación. Después de la crioconservación, dicha solución conservante para la crioconservación puede utilizarse descongelándola.

(3) Detección utilizando olfato de nematodo

En primer lugar, para obtener los nematodos necesarios para la detección, se les permite proliferar.

Varios nematodos (gusanos adultos) se colocan en una placa de Petri (que contiene un medio NGM en el que se ha dispersado *Escherichia coli*), y posteriormente, se crían durante 3 a 6 días, preferentemente durante 4 días, y a una temperatura de 15 °C a 25 °C, preferentemente a 20 °C. De este modo, aproximadamente de 300 a 500 nematodos de la nueva generación crecen hasta gusanos adultos.

Posteriormente, se prepara una placa de petri utilizada para una prueba real. Un formato como se muestra en la Figura 2 se produce en una placa de petri, y a continuación se coloca azida sódica (NaN₃) en (añade a) 4 puntos en la placa de petri. La azida sódica se utiliza para anestesiarse e inmovilizar nematodos. La cantidad de azida sódica agregada es de 0,2 a 3 µl, y preferentemente de 0,5 µl, a una concentración de 1 M.

La *Escherichia coli* dispersada en la placa de petri se elimina con un tampón de lavado y, posteriormente, se coloca en (añade a) la placa de petri una sustancia relacionada con la biología o un producto procesado de la misma, utilizada como muestra. Cuando se usa orina como una muestra, puede usarse una solución madre de la muestra de orina. Sin embargo, la orina recogida puede diluirse entre 1,5 y 1000 veces, por ejemplo, con agua esterilizada, un tampón, etc. El aumento de dilución es preferentemente 10 veces. La cantidad de la muestra de orina añadida a la placa de Petri es de 0,5 a 10 µl y preferentemente 1 µl.

Los nematodos se colocan en el centro de la placa de Petri así preparada.

Los nematodos se crían (se les permite nadar) durante un período de tiempo predeterminado (aproximadamente 1 hora). Temperatura ambiente: se ajusta a 23 °C ± 1 °C.

Una vez transcurrido el período de tiempo predeterminado, se cuenta el número de nematodos en el lado + y el número de nematodos en el lado -, y, a continuación, se calcula el índice de quimiotaxis (la siguiente fórmula). Cuando el número de nematodos en el lado + está representado por N (+) y el número de nematodos en el lado - está representado por N (-), se realiza la siguiente fórmula:

5

$$\text{Índice de quimiotaxis} = \frac{N(+)-N(-)}{\text{número total de nematodos}}.$$

Posteriormente, se detecta el cáncer utilizando como indicador la respuesta positiva o la respuesta negativa.

10 La expresión "respuesta positiva" se usa para referirse a que los nematodos "quieren" o "están interesados en" la muestra, mientras que la expresión "respuesta negativa" se usa para referirse a que los nematodos "no quieren" o "no están interesados en" la muestra.

15 Cuando se utiliza la quimiotaxis como indicador, el valor positivo (+) indica una respuesta positiva (quimiotaxis positiva, quieren), y el valor negativo (-) indica una respuesta negativa (quimiotaxis negativa, no quieren).

El índice de quimiotaxis tiene los valores de +1 a -1. Cuando los nematodos son atraídos hacia la muestra, el índice de quimiotaxis tiene un valor positivo, y cuando los nematodos evitan la muestra, el índice de quimiotaxis tiene un valor negativo.

20

Se puede realizar un solo análisis en una sola muestra. Sin embargo, se puede realizar una pluralidad de análisis en una sola muestra, y se calcula un valor medio de los valores del índice de quimiotaxis, de modo que se puede mejorar la precisión del valor obtenido. Cuando el valor obtenido por el análisis (que es un valor medio cuando se ha realizado una pluralidad de análisis) es un valor positivo, puede determinarse preliminar o definitivamente que el sujeto tiene cáncer o tiene riesgo de cáncer (posibilidad). La determinación de que el sujeto "tiene cáncer" se puede usar, por ejemplo, como una documentación de apoyo para el diagnóstico definitivo o diagnóstico preliminar de cáncer, y la determinación de que el sujeto "tiene riesgo de cáncer" se puede usar, por ejemplo, como una documentación de apoyo para sospechar de cáncer en un examen médico, un primer examen de cáncer, etc.

25

30 La reacción de un nematodo a un olor también puede detectarse utilizando como un indicador un comportamiento distinto de la quimiotaxis, o una reacción biológica. Los ejemplos del comportamiento distinto de la quimiotaxis o la reacción biológica incluyen: un comportamiento de veleta (Lino y Yoshida, The Journal of Neuroscience, 2009), por el cual un nematodo se dirige a una dirección en la que la concentración de un olor es alta; un comportamiento de giro (Pierce-Shimomura et al., The Journal of Neuroscience, 1999), que tiene lugar cuando la concentración de un olor se vuelve baja; el grado de flexión del cuerpo del nematodo (Luo et al., Journal of Neurophysiology, 2008); y respuesta neural.

35

Con respecto al comportamiento de veleta, la "respuesta positiva" significa que un nematodo gira en la dirección de una muestra. Con respecto al comportamiento de giro, cuando un nematodo gira en el momento en que una alta concentración de muestra cambia a una baja concentración de muestra, se puede decir que el nematodo tiene una "respuesta negativa". En el caso del grado de flexión del cuerpo, cuando la distancia entre la parte de la cabeza de un nematodo y la parte de su cola es larga, se puede decir que el nematodo tiene una "respuesta positiva".

40

(4) Detección utilizando nematodos modificados genéticamente

45

(i) La detección utilizando nematodos modificados genéticamente también se puede llevar a cabo como se describe anteriormente. En el presente documento, se utiliza un nematodo transgénico, en el que se ha expresado un gen indicador capaz de medir una concentración de calcio en la neurona en las neuronas olfativas AWC y AWA de un nematodo, y se detecta cáncer utilizando, como un indicador, un cambio en la concentración de calcio (respuesta neural). Debido a que este método es capaz de realizar análisis utilizando varios nematodos, es ventajoso porque se puede ahorrar el costo para el cultivo de nematodos y porque el análisis se puede realizar en poco tiempo.

50

En la Figura 3 se muestra un principio de medición cuando se usa un gen Yellow Cameleon como gen indicador. La proteína indicadora utilizada en la medición es una proteína de fusión formada al conectar la proteína de unión a calcio CaM con el dominio diana M13, al que se une el CaM, y al conectar, a continuación, CFP e YFP con ambos extremos de los mismos (que está codificado por el gen y por lo tanto puede expresarse genéticamente *in vivo*). Cuando la concentración de calcio es baja, CaM se separa de M13 y CFP también se coloca aparte de YFP (vista izquierda). Por lo tanto, si se proporciona luz para la excitación de la CFP, la luz azul se emite desde la CFP. Por otro lado, cuando la concentración de calcio aumenta, de modo que CaM se une a M13, CFP se acerca a YFP y se produce una transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (o transferencia de energía de resonancia de Forster) (FRET). Como resultado, incluso si se proporciona luz para la excitación de CFP, la luz amarilla se emite desde YFP (vista derecha). Como tal, la intensidad de la luz azul y la luz amarilla se miden simultáneamente, y a continuación, se calcula la relación entre ellas, de modo que se pueda encontrar un cambio en la concentración de calcio.

60

Un principio de medición cuando se usa un gen GCaMP como gen indicador se muestra en la figura 4.

65

La proteína indicadora es una proteína de fusión que tiene una estructura en la que CaM y M13 pueden unirse a

GFP. Esta proteína también está codificada por el gen *y*, por lo tanto, puede expresarse genéticamente *in vivo*. Cuando aumenta la concentración de calcio y M13 se une a CaM, aumenta la intensidad de fluorescencia de GFP. Por lo tanto, al medir la fluorescencia de GFP, se puede encontrar un cambio en la concentración de calcio. En la presente invención, cuando la respuesta de la neurona olfativa de un nematodo es alta al olor de la sustancia relacionada con la biología derivada del sujeto o un producto procesado de la misma, concretamente, cuando es alto un cambio en la concentración de calcio, se determina que el sujeto tiene cáncer o tiene riesgo de padecer cáncer. En el presente documento, el término "cuando... es alto" en las frases "la respuesta de la neurona olfativa... es alta" y "un cambio en la concentración de calcio es alto" significa que cuando se administra como un estímulo la sustancia relacionada con la biología derivada del sujeto o un producto procesado de la misma, un cambio en la relación de intensidad de fluorescencia (relación = YFP/CFP) o un cambio en la intensidad de fluorescencia de GFP es significativamente grande, en comparación con un control (una sustancia relacionada con la biología derivada del sujeto sano relacionado o un producto procesado de la misma).

(ii) Un nematodo individual, en el que se ha expresado un indicador de calcio en la neurona olfativa, se coloca en un chip hecho de resina (por ejemplo, hecho de resina de dimetilsiloxano (PDMS)) (Figura 5). En la figura 5, se forman una parte para sujetar el nematodo y cuatro canales de flujo en el chip de resina PDMS.

Al cambiar los canales de flujo 1 a 4 utilizando un aparato de reflujo (fabricado por WPI, sistema de perfusión multicanal MPS-2, etc.) (Figura 6), se realiza el encendido o apagado de la estimulación urinaria (Chalasani, S. H. et al. Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 450, 63-70 (2007); Chronis, N., Zimmer, M. y Bargmann, C. I. Microfluidics for *in vivo* imaging of neuronal and behavioral activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Methods* 4, 727-731 (2007).).

La Figura 6 es una vista que muestra el cambio de canales de flujo en un chip. Se colocó un tampón en los canales de flujo 1, 2 y 4, y la orina se colocó en el canal de flujo 3. Los canales de flujo 2 y 3 se mantienen constantemente en la posición "encendido". Cuando el canal de flujo 1 está "encendido" y el canal de flujo 4 está "apagado", el nematodo no recibe estimulación de la orina. Cuando el canal de flujo 1 se convierte en "apagado" y el canal de flujo 4 se convierte en "encendido", el nematodo recibe la estimulación de la orina.

Debido a que la neurona olfativa AWC es reactiva cuando "hay un olor" → "no hay olor" (reacción de apagado de olor), la reacción del nematodo se observa cuando cambia un estado con orina a un estado sin orina. Por el contrario, en el caso de la neurona AWA, debido a que la neurona AWA es reactiva a "no hay olor" → "hay un olor" (reacción de encendido de olor), la reacción del nematodo se observa cuando un estado sin orina cambia a un estado con orina.

De esa manera, la neurona olfativa de un nematodo es débilmente reactiva incluso con la orina de un sujeto sano. Por lo tanto, se prepara la orina de un control (la orina de un sujeto sano), y la orina de control y la orina como una muestra se administran sucesivamente a un solo nematodo, de modo que el cáncer puede detectarse preferentemente en función de una diferencia en la intensidad de reacción.

(iii) Utilizando un microscopio de fluorescencia (Leica DMI3000B, etc.), se obtiene una imagen de fluorescencia con lente objetiva (40 veces). Dicha imagen se obtiene, por ejemplo, a cada 200 ms, pero se puede cambiar, según sea apropiado, dependiendo del tipo de microscopio o lente. En el caso de Yellow Cameleon, se deben obtener imágenes en dos longitudes de onda, por separado. Por lo tanto, se usa preferentemente una cámara capaz de obtener simultáneamente tales imágenes en dos longitudes de onda, por ejemplo, la cámara digital ORCA-D2 (Hamamatsu Photonics) (sin embargo, aparte de esta cámara, las cámaras que tienen funciones similares están disponibles comercialmente). En el caso de GCaMP, es suficiente obtener una imagen en una longitud de onda. Por lo tanto, se puede usar una cámara microscópica común capaz de obtener una imagen de GFP.

(iv) Con respecto a la imagen obtenida, el cuerpo celular de una neurona olfativa (un sitio en el que un cambio es más visible) se incluye como ROI (región de interés), y para la intensidad de fluorescencia de cada píxel, se llevan a cabo todos los cálculos y la producción de vídeo utilizando software (por ejemplo, el software Metamorph, fabricado por Molecular Devices). También están disponibles otros productos de software vendidos por varias compañías. En el caso de Yellow Cameleon, la proporción YFP/CFP se calcula para cada píxel y a continuación, se calcula un valor medio en la ROI. Además, en el caso de GCaMP, se calcula un valor medio de intensidad de fluorescencia en la ROI.

3. Identificación del receptor

La presente invención proporciona un método para identificar un receptor olfativo en un nematodo, que se caracteriza por identificar el receptor olfativo utilizando el nematodo.

El método de identificación de la presente invención comprende una etapa de inhibir la expresión o función de un gen que codifica un receptor, y probar la reacción del nematodo inhibido a un olor. El olor es el olor de los tipos de cáncer y/o el tipo de receptor que se identifica es diferente dependiendo de los tipos de cáncer o la concentración de un odorante.

Como se ha descrito anteriormente, los ejemplos de la inhibición de la expresión o función de un gen del receptor olfativo incluyen la inhibición en la que se utiliza ARNi, la inhibición en la que se utiliza el ácido nucleico antisentido y

la inhibición por la expresión de un gen mutante negativo dominante. Entre estas, se prefiere la inhibición utilizando ARNi.

Usando nematodos, en los cuales se ha inhibido la expresión del gen del receptor, se prueba la reacción a los olores de muestras derivadas de varios tipos de cáncer. Cuando los nematodos no son reactivos al olor de un cierto tipo de cáncer, se puede determinar que el receptor es un receptor del olor del tipo de cáncer.

El tipo de receptor a identificar es diferente dependiendo de la concentración de un odorante. En consecuencia, se analiza a qué concentración de muestra los nematodos son reactivos, de modo que se pueda identificar un receptor con una alta concentración de muestra y un receptor con una baja concentración de muestra.

El sistema olfativo detecta varios odorantes y responde a ellos. El receptor olfativo es un receptor acoplado a proteína G (proteína de unión a nucleótidos de guanina heterotrimérica) en la mayoría de los organismos, y se une directamente a un odorante volátil o soluble. Cuando se compara con el genoma de un mamífero, el genoma del nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) comprende un número mayor de genes del receptor olfativo supuesto y esto sugiere que la complejidad combinatoria puede estar presente con respecto a la relación entre un receptor y un olor en nematodos. Con el fin de identificar el receptor olfativo de un nematodo necesario para la respuesta a un odorante específico, el presente inventor ha llevado a cabo el análisis del ARN de interferencia (ARNi). Como resultado de este análisis, el presente inventor ha identificado 194 genes de receptores olfativos candidatos, que están asociados con 11 odorantes. Por otra parte, el presente inventor también ha identificado SRI-14 como un gen candidato asociado con la detección de una alta concentración de diacetilo. Como resultado de los experimentos de rescate y de ARNi específicos de neuronas, el inventor ha demostrado que SRI-14 funciona en neuronas quimiosensoriales específicas, neuronas ASH (la neurona sensorial de un nematodo que recibe olores repulsivos o sustancias químicas) y proporciona una respuesta de evitación. Según las imágenes de calcio, se ha demostrado que las neuronas ASH responden solo a una alta concentración de diacetilo, mientras que otro tipo de neuronas quimiosensoriales, las neuronas AWA (la neurona olfativa de un nematodo que recibe principalmente olores favoritos) responde tanto a una concentración baja como a una concentración alta de diacetilo. La pérdida de la función de SRI-14 ha impedido que ASH responda a una alta concentración de diacetilo, mientras que la pérdida de la función de ODR-10 ha reducido la respuesta de AWA a una menor concentración de diacetilo. Las neuronas quimiosensoriales, en las que SPI-14 se expresa ectópicamente, han respondido a una alta concentración de diacetilo. En consecuencia, el nematodo tiene un mecanismo de detección de olor dependiente de la concentración, que se clasifica basándose en un nivel de receptor olfativo y en un nivel de neurona sensorial.

En general, los animales detectan varios odorantes a través de su sistema olfativo y responden a ellos. La mayoría de los odorantes son compuestos volátiles y se detectan por las neuronas receptoras del olfato (ORN). En la ORN, un agente odorante se une directamente a un receptor olfativo y, posteriormente, transmite información a través de una vía de señalización intracelular (1). En mamíferos, el receptor olfativo es un miembro de la familia del receptor (GPCR) acoplado a proteína G 7-transmembrana (proteína de unión a nucleótido de guanina heterotrimérica) (2), y solo un tipo de receptor olfativo está presente en la ORN individual (3). Sin embargo, aunque se han realizado varios tipos de estudios con el fin de identificar la relación de correspondencia entre un olor y un receptor, la relación entre los olores individuales y los receptores ha sido casi desconocida (4, 5). El gusto (sentido gustativo (gestación)) tiene un proceso similar, pero el sabor está asociado con la detección de sustancias químicas solubles.

El nematodo *Caenorhabditis elegans* es un organismo modelo utilizado en el análisis de procesos quimiosensoriales asociados con el olfato y el gusto (olfato, detección de señales volátiles; y sabor, detección de señales solubles), y *C. elegans* detecta una gran cantidad de señales químicas a través de aproximadamente 13 neuronas sensoriales de la mismas, que se sabe que responden a sustancias químicas, y, por lo tanto, responde a ellas (6, 7). Por conveniencia, el presente inventor se refiere a este proceso quimiosensorial como sentido olfativo, y a sustancias químicas como sustancias olorosas. Se predice que el genoma del nematodo (*C. elegans*) comprende más de 1200 supuestos genes de receptores olfativos que codifican GPCR y el GPCR se expresa en 11 neuronas quimiosensoriales (8). Estos hallazgos han indicado que es probable que múltiples tipos de receptores olfativos (9) se expresen en ORN individuales, que son diferentes del olfato (3), pero son similares a la percepción del gusto (10) en mamíferos. Sin embargo, la relación entre un receptor y un odorante u otra sustancia química se ha identificado solo para un receptor específico de diacetilo, ODR-10 (11) y un receptor de feromonas (que también es GPCR (12-14)). Se desconoce cómo se detecta un odorante en una combinación de este tipo de un receptor en la ORN del nematodo (*C. elegans*).

Al igual que con muchos tipos de animales, el nematodo (*C. elegans*) también muestra preferencia por odorantes específicos. Cuando dicho odorante específico se detecta por neuronas olfativas AWA o AWC, el nematodo muestra un comportamiento de atracción hacia el odorante. Cuando el odorante se detecta por neuronas sensoriales AWB, ASH o ADL, el nematodo exhibe un comportamiento de evitación (6, 15, 16). Sin embargo, algunos tipos de neuronas están asociadas tanto con el comportamiento de evitación como con el de atracción y un ejemplo de tales neuronas son las neuronas AWB (16). Hasta el momento, los presentes inventores demostraron que la respuesta de atracción o la respuesta de evitación del nematodo (*C. elegans*) a un solo odorante depende de la concentración del odorante (17). Esto sugiere que es probable que diferentes receptores olfativos funcionen incluso con un solo odorante, dependiendo de la concentración del odorante.

En el presente documento, el presente inventor ha demostrado que diferentes concentraciones de sustancias de diacetilo están mediadas por diferentes receptores olfativos y esa preferencia se modifica de este modo. Como resultado del análisis de pares de receptor-olor, el presente inventor ha identificado 194 genes de receptores olfativos candidatos con respecto a 11 odorantes. Entre estos genes candidatos, el presente inventor ha identificado

5 SRI-14 como un gen que responde específicamente a una alta concentración de diacetilo. Los resultados obtenidos por el presente inventor han demostrado que, con respecto a la recepción de diacetilo, ODR-10 en las neuronas AWA media una respuesta de atracción a una concentración baja y SRI-14 en las neuronas ASH media una respuesta de evitación a una concentración alta.

10 4. Especificación de tipos de cáncer

En la presente invención, es posible especificar tipos de cáncer de acuerdo con una prueba de quimiotaxis de nematodos. En consecuencia, la presente invención proporciona un método para identificar especies de cáncer, que se caracteriza por identificar especies de cáncer, usando la reacción de un nematodo al olor de una sustancia

15 relacionada con la biología derivada del sujeto o un producto procesado de la misma como un indicador, en donde el método comprende las etapas definidas en las reivindicaciones.

Como resultado de estudios con perros detectores de cáncer, se predijo que cada tipo de cáncer tiene un olor diferente. Por lo tanto, se identifica el receptor olfativo de un nematodo al olor de cada tipo de cáncer, y a continuación, se modifica el receptor para producir un nematodo modificado. Los ejemplos de dichos nematodos modificados incluyen una cepa que comprende una mutación o eliminación de un gen del receptor, una cepa en la que se inhibe la expresión o función de un gen receptor, una cepa en la que se inhibe la expresión o función de un gen del receptor, y una cepa en la que un gen del receptor es altamente expresado o altamente funcionalizado.

25 Un ejemplo de un método para producir un mutante por delección incluye un método CRISPR/Cas9 (Friedland et al, Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system, Nature Methods, 2013). Por otra parte, también se produce una cepa en la que se inhibe la expresión o función de un gen del receptor o un nematodo modificado en el que un gen del receptor es altamente expresado o altamente funcionalizado. Ejemplos de inhibición de la expresión o función incluyen: inhibición en la que se utiliza ARNi; inhibición en la que se utiliza ácido nucleico antisentido; e inhibición por la expresión de un gen mutante dominante negativo. Los ejemplos de un método para un

30 gen receptor de alta expresión o alto funcionamiento alto incluyen: un método para conectar el promotor de un gen del receptor con un tándem; un método para introducir un potenciador; un método que involucra la introducción de múltiples copias de un gen del receptor; un método para modificar el sitio de unión de un receptor con un olor o una proteína G; y un método para modificar un sitio para controlar la activación o localización de un receptor o afinidad por un olor.

El método de identificación de la presente invención comprende, por ejemplo, las siguientes etapas.

40 (a) Primero, como ETAPA 1, se detecta cáncer mediante el método de detección descrito anteriormente de la presente invención. Por ejemplo, utilizando la cepa N2, se prueba la presencia o ausencia de especies de cáncer.

(b) A continuación, como ETAPA 2, se especifica el tipo de cáncer utilizando un mutante del receptor de cada tipo de cáncer, o una cepa en la que se ha cambiado la expresión o función de un gen del receptor.

45 Usando un nematodo mutante que comprende una mutación o delección del receptor olfativo identificado anteriormente, o una cepa en la que se ha cambiado la expresión o función de un gen del receptor, se prueba la reacción de tal nematodo al olor de una muestra en la que se ha detectado cáncer en el paso (a) descrito anteriormente.

50 (c) Cuando la reacción al olor es diferente entre el nematodo modificado descrito anteriormente y el nematodo utilizado en la etapa (a) descrita anteriormente, se determina que el tipo de cáncer correspondiente al receptor identificado es el tipo de cáncer diana de la identificación.

Por ejemplo, entre los nematodos mutantes descritos anteriormente y los nematodos en los que se ha inhibido la expresión o función de un gen del receptor, se determina que el tipo de cáncer correspondiente al receptor identificado en nematodos, que no han reaccionado al olor, es el tipo de cáncer diana de la identificación. Como

55 alternativa, entre los nematodos en los que un gen del receptor ha sido altamente expresado o tiene una función alta, se determina que el tipo de cáncer correspondiente al receptor identificado en nematodos, cuya reacción al olor se ha acelerado, es el tipo de cáncer diana de la identificación.

Por ejemplo, cuando un receptor mutante con respecto al olor del cáncer de intestino grueso no muestra un comportamiento de atracción, se puede determinar (diagnosticar) que se tiene cáncer de intestino grueso (Figura 37).

5. Kit y Sistema

65 La presente invención proporciona el uso de un kit para detectar cáncer. El kit comprende nematodos. El presente kit también puede comprender uno o más componentes necesarios para llevar a cabo el método de detección de la

presente invención. Los ejemplos de dicho componente incluyen un tampón, una solución de cultivo, azida de sodio, *Escherichia coli*, una placa de Petri y agar. Además, el kit también puede ser un kit parcial que comprende solo algunos de los componentes necesarios, y en tal caso, el usuario puede preparar otros componentes. Por otra parte, el kit puede incluir también un manual de instrucciones, que explica un método de detección o un método de identificación.

Adicionalmente, la presente invención proporciona el uso de un sistema de detección de cáncer, en el que el sistema comprende nematodos, una parte de almacenamiento para almacenar una sustancia relacionada con la biología o un producto procesado de la misma y los nematodos, y una parte de detección para detectar la reacción de los nematodos en la parte de almacenamiento.

La Figura 16A es un diagrama de bloques que muestra el sistema. En la Figura 16A, el sistema de la presente invención tiene una parte de almacenamiento 30 para almacenar una sustancia relacionada con la biología o un producto procesado de la misma y los nematodos mencionados anteriormente, una parte de detección 10 para detectar la reacción de los nematodos en la parte de almacenamiento 30 a un olor, y una parte de procesamiento 20 para procesar la información detectada. Por otra parte, el sistema puede comprender además una parte de preservación 40 para conservar los datos procesados en la parte de procesamiento 20. La parte de preservación 40 comprende programa y base de datos, que son para su uso en detección de cáncer.

Ejemplos de la parte de almacenamiento 30 incluyen una placa de Petri, una placa de cultivo y un chip que tiene canales de micro flujo. Sin embargo, el tipo de la parte de almacenamiento no está limitado, siempre que sea capaz de almacenar nematodos y una muestra.

El sistema comprende al menos una parte de detección 10 capaz de tomar la imagen en movimiento de al menos un nematodo en tiempo real. La parte de detección 10 es un dispositivo para obtener datos como la imagen de nematodos, el número de nematodos y las pistas de movimientos. La parte de detección 10 comprende un microscopio o una cámara, por ejemplo, un microscopio de fluorescencia, un microscopio digital, una cámara digital, etc. El microscopio y la cámara pueden comprender un sistema de seguimiento automático (siguiente) capaz de rastrear el movimiento de los nematodos, y este sistema rastrea un solo nematodo, o rastrea simultáneamente una pluralidad de nematodos. A continuación, a partir de las pistas obtenidas, se mide la distancia de movimiento de los nematodos. Como alternativa, se fotografían los nematodos que se reúnen en un área predeterminada y, a continuación, se cuenta el número de nematodos. Por otra parte, el microscopio y la cámara también pueden comprender un sensor capaz de detectar la intensidad de la fluorescencia.

El sistema puede medir el movimiento de los nematodos en función de una imagen en tiempo real, y también puede medir el movimiento de los mismos en función de una imagen estática (fotografía). Al tomar la imagen de los nematodos en tiempo real, es posible buscar dinámicamente la posición de los nematodos.

La Figura 16B es un diagrama de configuración que muestra la parte de procesamiento 20 del sistema. La parte de procesamiento 20 está compuesta por un medio de cálculo 110 y una base de datos 120. El medio de cálculo 110 comprende (i) un medio de determinación de condición de prueba 111, (ii) un medio de prueba de reacción de nematodo 112, (iii) un medio de determinación de cáncer 113, y (iv) un medio de visualización de resultado de prueba 114.

(i) Medio de determinación de condición de prueba 111

El medio de determinación de la condición de prueba 111 es un medio para introducir las condiciones necesarias para el cálculo desde un ratón o un teclado de acuerdo con la IGU (interfaz gráfica de usuario), y la información introducida se puede confirmar con un gráfico.

Por este medio de determinación de la condición de prueba, el sistema de la presente invención se ha permitido previamente almacenar condiciones predeterminadas, que dependen del propósito de la prueba. Los ejemplos de tales condiciones predeterminadas incluyen el número de nematodos, las características de los nematodos, la aplicación o no aplicación del índice de quimiotaxis y el tiempo de medición.

Las características de los nematodos incluyen: mutantes por delección; cepas en las que se inhibe una expresión génica o similar; y la introducción de un gen que codifica una proteína fluorescente (por ejemplo, un gen GFP, un gen RFP, etc.) para la medición. Sin embargo, las condiciones no se limitan a ellas, y se pueden determinar, según sea apropiado, según el propósito de la prueba.

(ii) Medio de prueba de reacción de nematodo 112

El medio de prueba de reacción de nematodos 112 es un medio para seleccionar una fórmula de cálculo para detectar o identificar cáncer (por ejemplo, índice de quimiotaxis) del medio de determinación de condición de prueba 111 o la base de datos 120, y calcular la reacción de los nematodos de acuerdo con cada fórmula de cálculo. De esta manera, se llevan a cabo la medición del número de nematodos en un área predeterminada, la medición de la

distancia total en la que se ha movido un nematodo individual, la detección de la intensidad de fluorescencia emitida por un solo nematodo, etc., y se registra el comportamiento de un(os) nematodo(s) que reacciona(n) a una muestra de prueba. Por ejemplo, centrándose en un solo nematodo, se mide la distancia obtenida cuando el nematodo ha sido atraído hacia una muestra y se ha movido hacia la misma y, a continuación, se suman las distancias de movimiento de los nematodos individuales para obtener una suma. Como alternativa, cuando se han introducido genes de proteínas fluorescentes en los nematodos, se mide la intensidad de fluorescencia de los nematodos que han reaccionado a una muestra. En este caso también, se puede medir la intensidad de fluorescencia de un solo nematodo, y a continuación, se puede obtener, de este modo, la suma de nematodos. También puede ser posible medir la intensidad de fluorescencia emitida por todos los nematodos, que se reúnen en un área determinada, en una unidad de área.

(iii) Medio de determinación de cáncer 113

El medio de determinación de cáncer 113 es un medio para detectar la presencia o ausencia de cáncer basándose en la reacción de los nematodos a un olor, o para identificar el tipo de cáncer.

Cuando se adopta el número de nematodos como condición de prueba, se obtiene una diferencia entre la relación de la cantidad de nematodos que se transfirieron a un área diana de la prueba y la cantidad de nematodos que se transfirieron a un área de control. Cuando se adopta la distancia de movimiento como condición de prueba, se puede obtener el porcentaje por el cual la distancia de movimiento del nematodo en cuestión aumenta en comparación con la distancia de movimiento de un nematodo control, en el cual el nematodo en cuestión reacciona a un olor, es decir, la diferencia o la relación entre las distancias de movimiento. Si se ha determinado previamente el valor constante tal como una diferencia o proporción como un valor límite, este valor límite puede usarse como un criterio para la determinación del cáncer. Por otra parte, cuando se adopta la intensidad de fluorescencia como condición de prueba, se puede determinar el porcentaje en el cual la intensidad de fluorescencia del nematodo en cuestión aumenta en comparación con la intensidad de fluorescencia de un nematodo control, en el cual el nematodo en cuestión reacciona a un olor, etc. como un valor límite, como en el caso de la distancia de movimiento descrita anteriormente.

Se realiza una comparación entre los datos medidos, el valor límite y la información de la muestra (información sobre los tipos de cáncer, etc.), de modo que se determina si la muestra tiene o no un cierto cáncer.

(iv) Medio de extracción de resultados de determinación 114

El medio de extracción de resultados de determinación 114 es un medio para extraer información relevante, en función de los tipos de cáncer detectados o identificados o la presencia o ausencia de cáncer, y muestra los tipos de cáncer y la probabilidad (riesgo). Los resultados pueden mostrarse en un gráfico o en una tabla. También se puede mostrar una animación del comportamiento de los nematodos, que se ha calculado en el anterior (ii).

(v) Medio de almacenamiento de datos

Las condiciones de prueba introducidas y los resultados de la prueba están correlacionados entre sí, y se conservan como medios de almacenamiento de datos en la base de datos 120.

Las condiciones de prueba y los resultados de cálculo así preservados pueden leerse nuevamente en la base de datos 120, o en los medios de determinación de condiciones de prueba 111 y en los medios de visualización de resultados de determinación 114.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente en los siguientes ejemplos. Sin embargo, la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

[Ejemplo 1]

Detección del cáncer

(i) Cría de nematodos

Se colocaron cinco o seis nematodos adultos de tipo silvestre N2 en una placa petri de 6 cm (que contenía un medio NGM, en el que se había dispersado *Escherichia coli*), y a continuación, se cultivaron a 20 °C durante 4 días. Aproximadamente de 300 a 500 nematodos de la nueva generación se les permitió crecer hasta lombrices adultas.

(ii) Análisis de la quimiotaxis

El formato mostrado en la Figura 2 se produjo en una placa de Petri de 9 cm, y a continuación, se colocaron 0,5 µl de azida de sodio (NaN₃) en cada uno de los cuatro puntos de la placa de Petri.

Posteriormente, se aplicó 1 ml de tampón de lavado sobre una placa de cría de nematodos y se recuperaron en un tubo los nematodos flotantes, junto con el tampón. Cuando los nematodos así recuperados se dejaron durante un tiempo, se fueron al fondo. Por lo tanto, se descartó el sobrenadante después de que los nematodos hubieran bajado al fondo. Posteriormente, se colocó 1 ml de tampón de lavado en el tubo y se descartó el sobrenadante después de que los nematodos hubieran bajado al fondo. Esta operación de lavado se repitió tres veces para eliminar *Escherichia coli*.

Se colocó 1 µl de cada muestra de orina, que se había diluido 10 veces con agua esterilizada, en la marca "+" en la placa de Petri de 9 cm.

Posteriormente, se colocaron aproximadamente 100 nematodos en el centro de la placa de Petri y los nematodos se criaron (se les permitió nadar) durante 1 hora. La temperatura ambiente se ajustó a $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Una hora más tarde, se contó el número de nematodos en el lado + y el número de nematodos en el lado -, y, a continuación, se calculó el índice de quimiotaxis.

Para una muestra, se realizaron los análisis cinco veces. A continuación, se calculó un valor medio de las 5 veces de los índices de quimiotaxis.

(iii) Resultados

En la Figura 1 se muestran los resultados. Tal como se muestra en la Figura 1, se mostró un índice de quimiotaxis negativo (-) (reacción de evitación) en todas las muestras de orina derivadas de sujetos sanos que se usaron como controles (c1 a c10), mientras que se mostró un índice de quimiotaxis positivo (+) (reacción de atracción) en todas las muestras de orina derivadas de los pacientes con cáncer (p1 a p20). Por lo tanto, el cáncer se pudo detectar con una precisión del 100%.

Debe entenderse que, en la Figura 1, la barra de error indica EEM.

[Ejemplo 2]

Imágenes de calcio

En un experimento de imagen que utiliza canales de micro flujo, debido a que una muestra de orina debía pasar a través de un tubo delgado, los precipitados y los sólidos contenidos en la orina se eliminaron mediante centrifugación y filtración (tamaño de poro: 0,22 µm, Millex GP, Merck Millipore). Para monitorizar las neuronas AWC y AWA, mediante el uso de los promotores odr-1 y odr-10, respectivamente, se permitió que un gen Yellow Cameleon (YC3.60) se expresara en las neuronas. La toma de imágenes de calcio se llevó a cabo de acuerdo con un método conocido (Uozumi, T. et al. Temporally-regulated quick activation and inactivation of Ras is important for olfactory behaviour. *Sci Rep* 2, 500 (2012); Shinkai, Y. et al. Behavioral choice between conflicting alternatives is regulated by a receptor guanylyl cyclase, GCY-28, and a receptor tyrosine kinase, SCD-2, in AIA interneurons of *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 31,3007-3015 (2011)).

Se inmovilizó un nematodo en un microcanal, de modo que la porción de la cabeza del nematodo se pudiera sacar del microcanal (Figura 5). Usando un solo nematodo, se probó la reacción del nematodo individual a la orina control y a la orina derivada de pacientes con cáncer.

La imagen de fluorescencia de YC3.60 se obtuvo utilizando un microscopio Leica DMI3000B (lente objetivo de 40 veces) y una cámara digital ORCA-D2 (Hamamatsu). Todas las imágenes se obtuvieron a un tiempo de exposición de 200 ms. Las intensidades de fluorescencia de CFP e YFP se obtuvieron de la neurona AWC o AWA. La relación de la intensidad de fluorescencia de YFP y la intensidad de fluorescencia de CFP se analizó utilizando el software Metamorph (Molecular devices). Esta relación de intensidad de fluorescencia se calculó como intensidad de YFP/intensidad de CFP (= R), y se estableció un promedio de las proporciones de ventanas de 10 s (-10-0 s) en R0.

Los resultados obtenidos al examinar la reacción de las neuronas olfatorias AWC de los nematodos a la orina derivada de pacientes con cáncer se muestran en las Figuras 7 y 8.

En la figura 7, dos paneles de la izquierda muestran los resultados de una prueba realizada con orina control y dos paneles de la derecha muestran los resultados de una prueba realizada con orina derivada de un paciente con cáncer gástrico. La Figura 7 es una vista que muestra un cambio en la concentración de calcio de la neurona olfativa AWC (un cambio en la relación YFP/CFP de Yellow Cameleon) a la estimulación de orina (con orina → sin orina). En comparación con la orina de un sujeto sano (control), se encontró una reacción significativamente fuerte a la orina de un paciente con cáncer. La Figura 8 muestra un cambio en la cantidad de la relación de intensidad de fluorescencia media (relación YFP/CFP). El símbolo *** indica que es significativo en $p < 0,001$.

En el presente ejemplo, los precipitados y los sólidos contenidos en la orina se eliminaron mediante centrifugación y

filtración. Estos tratamientos no influyeron en la quimiotaxis de los nematodos (Figura 9).

Incluso en el caso de la neurona olfativa AWA, la respuesta se observó como resultado de la adición de orina (Figuras 10 y 11).

Estos resultados demuestran que la neurona olfativa de un nematodo desempeña un papel importante en la distinción entre la orina control y la orina derivada de un paciente con cáncer. Las figuras 7 a 11 muestran que el cáncer puede detectarse utilizando la neurona olfativa de un nematodo. Debe entenderse que, en las Figuras 8, 9 y 11, la barra de error indica EEM.

[Ejemplo 3]

En el presente ejemplo, las líneas celulares de cáncer establecidas y los medios de cultivo o las soluciones de preservación se utilizaron como modelos de sustancias relacionadas con la biología derivadas del sujeto, y se llevó a cabo un experimento de detección de cáncer.

(1) Detección de cáncer utilizando líneas celulares de cáncer

Con el fin de detectar el cáncer utilizando un sobrenadante de cultivo de células cancerosas humanas, se usaron SW480, COLO201 y COLO205 como células de cáncer de intestino grueso (cáncer de colon rectal); se usó MCF7 como células de cáncer de mama; y se usaron NUGC4, MKN1 y MKN7 como células de cáncer gástrico.

SW480, COLO201 y COLO205 fueron adquiridas del Instituto Nacional de Innovación Biomédica, JCRB Cell Bank Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (Tokyo, <http://cellbank.nibio.go.jp>), y los otros tipos de células se adquirieron del Centro de Recursos Celulares para la Investigación Biomédica, Institute of Development, Aging and Cancer (Tohoku University, Sendai, Japan)). Usando medio RPMI 1640 con FBS al 10%, se mantuvieron todas las líneas celulares en una condición en la que no eran confluentes a 37 °C en una aireación con un 5% de CO₂. Se utilizó en la prueba una solución de cultivo, que era una capa clara en la porción superior del medio. El medio después del cultivo de células se observó en la posición "+" en una placa de ensayo (Figura 12). Para eliminar la influencia del olor del medio en sí, se colocó una solución de cultivo de control, que se había diluido a la misma concentración que la descrita anteriormente, en una posición en el lado opuesto a la posición donde se colocó el medio de cultivo celular (Figura 12).

La quimiotaxis de los nematodos se probó en una placa de ensayo de la misma manera que en el Ejemplo 1. Como resultado, los nematodos de tipo silvestre (*C. elegans*) mostraron un comportamiento de atracción al medio de cultivo (diluido de 1/10⁶ to 1/10⁷) en el que se habían cultivado las células cancerosas (Figura 13).

En la figura 13, la barra izquierda muestra los resultados obtenidos utilizando un medio de cultivo de células cancerosas diluidas en 1/10⁶, y la barra derecha muestra los resultados obtenidos utilizando un medio de cultivo de células cancerosas diluidas en 1/10⁷. Además, el símbolo * indica que es significativo en p < 0,05; ** indica que es significativo en p < 0,01; y *** indica que es significativo en p < 0,001 (prueba de Dunnett). Por otra parte, en la Figura 13, la barra de error indica EEM.

Una solución de cultivo o una solución conservante de fibroblastos (células no cancerosas) también se probó de la misma manera como se describe anteriormente. Como resultado, se demostró que los nematodos no mostraban un comportamiento de atracción a la solución de cultivo o solución conservante (evitación débil) (Figura 13). Esto significa que los nematodos no muestran un comportamiento de atracción a una "secreción de células humanas", sino que muestran un comportamiento de atracción a una "secreción de células cancerosas".

MEM, EMEM y RPMI indican un medio solo. KMST-6 y CCD-112CoN indican fibroblastos (que fueron adquiridos de RBC y ATCC, respectivamente).

(2) Quimiotaxis para medios de cultivo de fibroblastos y medios de cultivo de células cancerosas

Por otra parte, también se examinaron la quimiotaxis en los medios de cultivo de fibroblastos y en los medios de cultivo de células cancerosas, que tenían diversas concentraciones, y la quimiotaxis de nematodos en tejidos de cáncer humanos. Los métodos para ello son los siguientes.

Un medio de cultivo de fibroblastos y un medio de cultivo de células cancerosas se diluyeron cada uno con agua para dar como resultado diversas concentraciones (que iban desde su solución madre hasta 10⁻⁹), y se observó la quimiotaxis de nematodos de tipo silvestre en medios de cultivo individuales. Con respecto a los tejidos cancerosos humanos y a los tejidos normales, después de obtener el consentimiento informado, estos tejidos se extirparon de un paciente con cáncer, y se fragmentaron en muestras, cada una con un diámetro de 0,1 a 0,8 mm, y a continuación, se utilizaron.

Como resultado, los nematodos no mostraron un comportamiento de atracción a todas las concentraciones de

fibroblastos, pero se observó que los nematodos mostraban un comportamiento de atracción significativo a las células cancerosas que tenían concentraciones de 10^{-6} y 10^{-7} (Figuras 17 y 18).

Con respecto a la quimiotaxis de nematodos en tejidos cancerosos humanos, los nematodos mostraron un comportamiento de atracción a una sección de tejido canceroso, pero mostraron un comportamiento de evitación a los tejidos normales (tejidos más alejados de los tejidos cancerosos) del mismo paciente que el que tenía los tejidos cancerosos antes mencionados (Figura 19). También se encontró que cuando los tejidos cancerosos se colocan en un lado y los tejidos normales se colocan en el otro lado, los nematodos se acercan a los tejidos cancerosos.

(3) Quimotaxis para solución conservadora salina fisiológica que contiene una sección de tejido canceroso

Se añadió una sección de tejido canceroso humano a una solución salina fisiológica y la solución obtenida se conservó a -20°C (período de conservación: 3 meses). Posteriormente, se estudió la quimiotaxis de los nematodos a una dilución de la solución salina fisiológica.

Tras obtener el consentimiento informado, los tejidos cancerosos que tenían un diámetro de 0,5 cm se extirparon de un paciente con cáncer y luego se agregaron a 20 ml de solución salina fisiológica. La solución salina fisiológica resultante se diluyó con agua para dar lugar a concentraciones de 10^{-2} a 10^{-4} , y a continuación, se observó la quimiotaxis de los nematodos de tipo silvestre en estas soluciones diluidas.

Como resultado, los nematodos mostraron un comportamiento de atracción a la solución salina fisiológica que contenía tejidos cancerosos, pero mostraron un comportamiento de evitación a una solución salina fisiológica que contenía tejidos normales (Figura 20).

Debido a que el mutante odr-3 no mostró un comportamiento de atracción a la solución salina fisiológica que contenía tejidos cancerosos, se puede decir que los nematodos sienten el olor.

[Ejemplo 4]

Prueba a mediana escala

Para confirmar la alta precisión del método de la presente invención, se llevó a cabo una prueba utilizando 242 muestras de orina (218 muestras de control y 24 muestras derivadas de pacientes con cáncer) (Tabla 1). La tabla 1 muestra los antecedentes de los sujetos.

Tabla 1

a, Características de los antecedentes de los participantes para el examen final

	NSDT(+)			NSDT(+)	NSDT(-)	Valor p de NSDT positivo frente a negativo	
	Cáncer 2 años antes	Cáncer dentro de 2 años	Cáncer no encontrado				
n	19	5	11	35	207		
Género (masculino)	12	3	2	17	87	0,68	NS
Edad (años) (mediana)	47-89(68)	53-70(60)	41-73(53)	41-89(66)	26-78(46)	1.3E-08	P<0,001
Historia de cancer	0	0	0	0	6	0,67	NS
Dolencias							
Tos o esputo	0	1	1	2	7	0,85	NS
Pérdida de apetito	1	1	0	2	0	0,02	P<0,05
Malestar abdominal	0	0	1	1	6	0,60	NS
Malestar	1	1	2	4	15	0,61	NS
Malestar de pecho	1	1	1	3	4	0,11	NS
Alteración intestinal	3	1	0	4	9	0,19	NS
Dolor de cabeza	0	1	3	4	12	0,38	NS
Secreción sangrienta	1	0	0	1	1	0,67	NS

a, Características de los antecedentes de los participantes para el examen final

	NSDT(+)			NSDT(+)	NSDT(-)	Valor p de NSDT positivo frente a negativo	
	Cáncer 2 años antes	Cáncer dentro de 2 años	Cáncer no encontrado				
Embarazo	0	0	0	0	3	0,91	NS
Costumbre de beber	6	1	1	8	81	0,07	NS
Costumbre de fumar	3	2	1	6	40	0,76	NS
Enfermedades distintas de cáncer							
Hipertensión	11	4	1	16	32	3.3E-05	P<0,001
Hiperlipidemia	6	0	0	6	17	0,10	NS
Diabetes	3	0	0	3	12	0,80	NS
Hiperuricemia	1	0	1	2	6	0,73	NS
Insuficiencia cardíaca isquémica	0	1	0	1	3	0,91	NS
Infarto Cerebral	2	0	0	2	0	0,02	P<0,05
Enfermedad del colágeno	0	0	0	0	1	0,31	NS
Tiropatía	0	0	0	0	2	0,67	NS
Asma bronquial	0	0	0	0	3	0,91	NS
Úlcera gastroduodenal	0	0	0	0	1	0,31	NS
Pancreatitis crónica	0	0	0	0	1	0,31	NS
Hepatitis crónica	0	0	1	1	4	0,77	NS
Osteoartritis	0	1	1	2	4	0,46	NS
Mioma uterino	0	0	0	0	2	0,67	NS
Trastorno mental	0	0	0	0	1	0,31	NS
Enfermedad oftalmológica	0	0	0	0	7	0,58	NS
Datos de laboratorio							
WBC (x10 ² /μl) (mediana)	47-110(55)	50-91(57)	44-80(56)	44-110(56)	34-141(60)	0,91	NS
Hgb (g/dl) (mediana)	5,1-17,2(13,9)	13,2-16,7(14,6)	9,3-15,3(13,1)	5,1-17,2(13,4)	8,4-17,6(14,1)	0,02	P<0,05
Plt (X10 ⁴ μl) (mediana)	13,6-41,1(20,5)	15,6-31,1(18,5)	19,9-41,8(24,2)	13,6-41,8(21,4)	10,7-46,1(23,2)	0,41	NS
Creatinina en orina (mg/dl) (mediana)	0,32-1,63(0,85)	0,25-0,77(0,54)	0,10-1,26(0,64)	0,10-1,63(0,73)	0,12-2,56(0,89)	0,04	P<0,05
CRP (>0,31 mg/dl)	5	0	1	6	17	0,10	NS
CEA(>5,0ng/ml)	5	1	0	6	8	0,002	P<0,01
Ab Anti-p53 (>130U/ml)	4	0	2	6	18	0,12	NS
DiAcSpm/Cre Masculino>243,Femenino >354 (nmol/g•Cre)	4	0	0	4	10	0,12	NS

a, Características de los antecedentes de los participantes para el examen final

	NSDT(+)			NSDT(+)	NSDT(-)	Valor p de NSDT positivo frente a negativo	
	Cáncer 2 años antes	Cáncer dentro de 2 años	Cáncer no encontrado				
Positivo en algunos marcadores tumorales	10	1	2	13	34	0,004	P<0,01

Todas las muestras de orina se diluyeron 10 veces y la prueba de quimiotaxis con nematodos se llevó a cabo tres veces para cada muestra.

- 5 Como resultado, los nematodos mostraron una reacción de atracción a todas las muestras de orina derivadas de pacientes con cáncer (24/24) y la sensibilidad de detección fue del 100% (Figura 14). Por otro lado, el nematodo mostró un comportamiento de evitación en casi todas las muestras de orina de control (207/218) (Figura 14). En la figura 14, las barras naranjas (números 1, 2, 41, 44, 54, 56, 90, 157, 196, 202, 208, 213, 220, 226, 232-239, 241 y 242) indican muestras derivadas de pacientes con cáncer y las barras azules (los números que no sean los números mencionados anteriormente) indican muestras de control. Por otra parte, en la Figura 14, la barra de error indica EEM.

El presente inventor también ha estudiado otros marcadores tumorales para los mismos sujetos.

- 15 Los marcadores tumorales utilizados como dianas del estudio fueron CEA en suero, Anticuerpos anti-p53 en suero (Anti-p53 Ab) y N¹,N¹²-diacetilspermina de orina (DiAcSpm). Cuando se comparó con estos marcadores tumorales, el método de la presente invención (NSDT) tenía una sensibilidad extremadamente alta (Figura 15 y Tabla 2). Cabe señalar que la sensibilidad (%) indica la proporción de respuestas positivas a las muestras derivadas de pacientes con cáncer.

20

Tabla 2

Tabla 3 de datos extendidos La precisión de los marcadores tumorales en el examen final

	Fase	n	CEA	Ab Anti-p53	DiAcSpm	Algunos TM	NSDT
Cáncer esofágico.	0	1	0	0	0	0	1
	Total	1	0	0	0	0	1
Cáncer Gástrico.	I	4	0	1	0	1	4
	IV	1	1	0	0	1	1
	Total	5	1	1	0	2	5
Cáncer colorrectal.	0	2	1	0	0	1	2
	I	1	0	0	0	0	1
	II	2	0	1	0	1	2
	III	4	1	0	1	2	4
	IV	1	1	1	1	1	1
	Total	10	3	2	2	5	10
Cáncer de mama.	I	2	0	1	0	1	2
	II	3	1	0	0	1	3
	Total	5	1	1	0	2	5
Cáncer pancreático.	IV	1	1	0	1	1	1
	Total	1	1	0	1	1	1
Cáncer del conducto biliar.	I	1	0	0	1	1	1
	Total	1	0	0	1	1	1
Cáncer de próstata.	I	1	0	0	0	0	1
	Total	1	0	0	0	0	1
Todos los cánceres	0	3	1	0	0	1	3
	I	9	0	2	1	3	9
	II	5	1	1	0	2	5
	III	4	1	0	1	2	4
	IV	3	3	1	2	3	3
	Total	24	6	4	4	11	24

Tabla 3 de datos extendidos La precisión de los marcadores tumorales en el examen final

	Fase	n	CEA	Ab Anti-p53	DiAcSpm	Algunos TM	NSDT
Sensibilidad	Fase		CEA	Ab Anti-p53	DiAcSpm	Algunos TM	NSDT
	0		33,3 %	0,0 %	0,0 %	33,3 %	100 %
	I		0,0 %	22,2 %	11,1 %	33,3 %	100 %
	II		20,0 %	20,0 %	0,0 %	40,0 %	100 %
	III		25,0 %	0,0 %	25,0 %	50,0 %	100 %
	IV		100 %	33,3 %	66,7 %	100 %	100 %
	Total		25,0 %	16,7 %	16,7 %	45,8 %	100 %
Especificidad			96,3 %	86,2 %	95,4 %	83,9 %	95,0 %
Valor predictivo positivo			42,9 %	17,4 %	28,6 %	23,9 %	68,6 %
Eficacia			89,3 %	83,9 %	87,6 %	80,2 %	95,5 %

La tabla 2 incluye pacientes con cáncer en las etapas 0 y 1. Esto significa que el método de la presente invención también es útil para la detección del cáncer temprano.

5 [Ejemplo 5]

Estudios sobre la concentración óptima de la orina. Método:

10 Se diluyeron con agua tres muestras como muestras de orina de sujetos sanos (c1, c2 y c3) y cinco muestras como muestras de orina de pacientes con cáncer (p2, p5, p8, p17 y p18) para dar lugar a varios tipos de concentraciones (que van desde la solución madre de la misma a 10^{-5}), y posteriormente, se estudió la quimiotaxis de los nematodos de tipo silvestre en las mismas.

Resultados:

15 Tal como se muestra en la Figura 21, se demostró que es preferible una dilución de 10 veces. En la figura 21, en el gráfico de barras que muestra cada concentración, las tres barras en el lado izquierdo muestran los resultados obtenidos utilizando orina derivada de sujetos sanos, y las cinco barras en el lado derecho muestran los resultados obtenidos utilizando orina derivada de pacientes con cáncer.

20 [Ejemplo 6]

Identificación del receptor

25 (1) Materiales y métodos

Cultivo de nematodos y cepas de nematodos

30 Excepto por el mutante eri-1 que se cultivó con *Escherichia coli* (*E. coli*) OP50, los nematodos (*C. elegans*) se cultivaron a 20 °C en condiciones estándar en una placa de medio de crecimiento de nematodos (NGM) (36) que comprende *Escherichia Coli* NA22 como fuente de alimento. Los nematodos de tipo silvestre utilizados fueron de una cepa Bristol N2. Como otras cepas de nematodos, se usaron GR1373: eri-1 (mg366), VC2123: sri-14 (ok2865), CX3410: odr-10 (ky225) y MT7929: unc-13 (e51).

35 ARN de interferencia y ensayo de quimiotaxis

El ensayo de ARNi se llevó a cabo realizando un método de ARNi que involucra la alimentación (método de alimentación de ARNi) de eri-1 (mg366) (19), utilizando una biblioteca Ahringer (37).

40 Se colocaron nueve mutantes eri-1 adultos en una placa NGM que contenía isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (0,19 g/l), ampicilina (60 mg/l) y *Escherichia coli* (*E. coli*) y a continuación, se cultivaron durante 4 días. Posteriormente, los gusanos adultos se utilizaron en un ensayo de quimiotaxis. El ensayo de quimiotaxis se llevó a cabo como se indica anteriormente (6, 17). En el ensayo de quimiotaxis, el presente inventor ha utilizado de 30 a 50 gusanos en cada experimento en el que se usaron 1 μ l de odorante diluido a 10^{-3} o a 10^{-4} (baja concentración), o 1 y 45 5 μ l de odorantes sin diluir (alta concentración).

Los resultados del análisis de ARNi se analizaron estadísticamente de la siguiente manera.

50 Se calcularon la puntuación z y un valor de control en cada prueba individual de 2SD cada día (Tabla 3) o todos los días. La puntuación z se usó como un umbral que indica una gran diferencia (-1.96 y 1.96, $P < 0,05$). Sin embargo,

parecía que la inhibición de un receptor no causaba efectos notables. En consecuencia, el presente inventor ha utilizado la puntuación $z \pm 1$ (-0.96 y 0.96, $P < 0.33$) como un umbral más débil.

Evitación de la presión osmótica

5 El presente inventor ha utilizado NaCl 4 M para el estímulo osmótico y ha analizado un comportamiento de evitación de la presión osmótica, como se indica anteriormente (38).

Desactivación de la función específica de células de sri-14

10 Se construyó un gen para desactivar la función de sri-14 en neuronas específicas, como se indica anteriormente (24). La región diana de sri-14 (una secuencia del genoma de 1,6 kb) se amplificó utilizando los dos cebadores siguientes:

15 Tf: 5'-ggcgccgataattgctaa-3' (SEQ ID NO: 1), y
Tr: 5'-ctgctgcgttttctgtatca-3' (SEQ ID NO: 2).

La expresión génica de ASH se llevó a cabo utilizando un promotor sra-6 (20), y la de AWC se llevó a cabo utilizando los promotores ceh-36 (39) y srd-17.

20 Ablación genética e inhibición de neuronas

El presente inventor ha utilizado la caspasa-1 de ratón (mCasp1) para la ablación de las neuronas AWA, AWB, AWC y ASH. mCasp1 se expresó en cada una por los promotores odr-10 (11), str-1 (15), ceh-36 (39) y sra-6 (20), respectivamente. Por otra parte, para la inhibición de las interneuronas, se utilizó unc-103 (gf). La expresión específica de AIA, AIB, AIY o AIZ de unc-103 (gf) se llevó a cabo utilizando un promotor gcy-28.d (29), npr-9 (40), ttx-3 (41, 42), o lin-11 (43, 44), respectivamente. Preparación y amplificación del ADNc de sri-14

30 El ARN total, que se había aislado usando PureLink RNA Minikit (Ambion), se convirtió en ADNc mediante la mezcla maestra de qPCR ReverTra Ace usando el ADNg Remover (Toyobo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc de sri-14 se amplificó utilizando los dos cebadores siguientes, a continuación, se digirió con Nhe I y Kpn I, y luego se insertó en un vector pPD-DEST (Invitrogen):

35 5'-gagaGCTAGCaaaaatgcctgcaggtccac-3' (SEQ ID NO: 3), y
5'-gagaGGTACctattgaattctcggtg-3' (SEQ ID NO: 4).

Imágenes de calcio

40 Para monitorear la respuesta de las neuronas AWA, AWB, AWC y ASH, el presente inventor ha producido cepas que expresan YC3.60, utilizando los promotores odr-10, str-1, odr-3 y sra-6 (11, 15, 20, y 45), respectivamente. Como se informó anteriormente (33, 46, 47), las imágenes de calcio se llevaron a cabo utilizando un dispositivo microfluídico. En un experimento que utiliza un dispositivo microfluídico de este tipo, se capturó un nematodo por un microcanal de manera que la nariz del nematodo se expuso a agua corriente que contenía una solución de diacetilo [diluido a 10^{-5} (baja concentración) y diluido a 10^{-3} (alta concentración)], o una solución sin olor, y a continuación, se inmovilizó cada nematodo. La temperatura ambiente se ajustó de 20°C a 23°C. La imagen de fluorescencia de YC3.60 se tomó utilizando Zeiss Axioplan 2 que comprende lentes objetivas 40 x y una cámara digital 3CCD (C7780, Hamamatsu Photonics). Todas las imágenes se recuperaron a un tiempo de exposición de 200 ms. Las pilas de tiempo de los cuerpos celulares AWA, AWB, AWC y ASH se capturaron y, posteriormente, utilizando el software AquaCosmos (ver. 2.6, Hamamatsu Photonics), se analizó la relación de emisión entre una proteína fluorescente amarilla (YFP) y una proteína fluorescente cian (CFP). Esta relación se calculó como intensidad de intensidad de YEP/intensidad de CFP (R), y se estableció un promedio de las proporciones de ventanas de 10 segundos (de -10 a 0 segundos) en R0.

(2) Resultados

55 Análisis de ARN de interferencia de pares de olor -receptor

Con el fin de identificar exhaustivamente los receptores olfativos necesarios para la respuesta a determinados odorantes, el presente inventor ha llevado a cabo un análisis sistemática de ARN de interferencia (ARNi). El ARNi en las neuronas de los nematodos (*C. elegans*) no es eficaz para los nematodos de tipo silvestre debido a la baja sensibilidad de las neuronas del nematodo (*C. elegans*) al ARNi (18). Por lo tanto, se utilizó en el presente documento la cepa de nematodo eri-1 potenciada con ARNi (mg366) (19).

65 El presente inventor ha demostrado que, como resultado del ARNi del mutante eri-1, la desactivación de odr-10 causa un defecto específico en la respuesta a una baja concentración (diluido a 10^{-3}) de diacetilo, y el inventor ha confirmado que esta cepa de nematodo se puede utilizar de manera eficaz para el análisis de ARNi de genes de

receptores olfativos (Figura 22). Se analizaron los genes que codifican 822 receptores olfativos supuestos, incluida la familia SRH, (en donde todos los genes codifican GPCR). Se probó la respuesta a 11 odorantes de los nematodos tratados con ARNi. Debido a que los nematodos (*C. elegans*) pueden cambiar la preferencia dependiendo de la concentración de un odorante (17), se examinó adicionalmente su respuesta a concentraciones más altas de los odorantes (1 µl y 5 µl de odorantes sin diluir) (en donde los odorantes causan un comportamiento de atracción a nematodos, cuando se utilizan en bajas concentraciones). Los odorantes incluyeron bajas concentraciones de seis atrayentes (6), altas concentraciones de tres atrayentes que inducen evitación en altas concentraciones (17) y altas concentraciones de dos repelentes (6, 20) (Figura 22).

La prueba se realizó de manera repetida en una cepa de nematodo tratada con ARNi, que presentaba anomalías en la respuesta de movimiento inducida por la sensación química a un odorante (véase la sección "Materiales y método") (Tabla 3). Como resultado del tercer análisis, debido a que los ARNi de los genes que codifican 194 receptores olfativos supuestos causaron una respuesta más débil a uno o más odorantes que un control, se consideró que los genes codifican los receptores olfativos candidatos (Figura 22 y Tabla 4).

Debido a que los genes, que se expresan en las neuronas sensoriales, es probable que actúen como receptores olfativos, se examinaron a continuación, los patrones de expresión de estos genes.

Usando indicadores fluorescentes ligados a los promotores de genes que codifican receptores olfativos individuales, el presente inventor ha analizado los patrones de expresión de los genes que codifican 16 receptores olfativos supuestos, cuya desactivación había causado defectos graves en los movimientos inducidos por sensación química (Figura 22C y Figura 23A -L). Por otra parte, con respecto a los patrones de expresión de 19 genes de receptores olfativos, se utilizó la información divulgada en WormBase (<http://www.wormbase.org>). Entre estos 35 genes, se expresaron 30 genes en neuronas. Entre los 16 genes analizados en función de la expresión indicadora, 15 genes se expresaron en neuronas sensoriales asociadas con el sentido del olfato (Tabla 5).

Identificación del receptor olfativo SRI-14 que responde a una alta concentración de diacetilo

ODR-10 es un receptor de diacetilo y un mutante odr-10 tiene un defecto en la quimiotaxis a una baja concentración de diacetilo (11). Como se indicó anteriormente (11), el presente inventor había confirmado que el mutante odr-10 muestra una quimiotaxis normal a una alta concentración de diacetilo (Figura 24A). Esto sugiere que están presentes otros receptores con respecto a diacetilo y que ODR-10 puede ser específica a una baja concentración de diacetilo (21). Como resultado del análisis de ARNi, Se obtuvieron 5 genes candidatos del receptor olfativo (srh-25, srh-79, srh-216, srh-281 y sri-14 asociados con una alta concentración de diacetilo (Tabla 3 y Figura 25). Por lo tanto, el presente inventor ha analizado la expresión usando promotores cadena arriba. Como resultado, no se pudo detectar la expresión de srh-79 y srh-216 y se observó la expresión de srh-25 y srh-281 en las neuronas sensoriales ADL, que no se asociaron con el comportamiento de evitación a una alta concentración de diacetilo (Tabla 5). En consecuencia, con el fin de entender cómo los diversos receptores causan reacciones dependientes de la concentración a un solo odorante, el presente inventor se ha centrado en sri-14. Esto se debe a que el ARNi de este gen causó un defecto significativamente fuerte en la evitación a una alta concentración de diacetilo (Figura 24B).

SRI-14 está codificado por un gen que tiene 7 exones y de acuerdo con WormBase, ok2685 es un mutante por delección que se predice que es una pérdida de función (Figura 26A). En referencia a la secuencia de aminoácidos putativa de SRI-14 (SEQ ID NO: 5), se encontró que la proteína tiene un dominio putativo de 7-transmembrana (Figura 26B y C). El análisis del comportamiento de un mutante sri-14 (ok2865) en condiciones de alta presión osmótica demostró que los nematodos exhiben un comportamiento normal de evitación a la presión osmótica alta. Sin embargo, el mutante sri-14 mostró un defecto en la respuesta de evitación a una alta concentración de diacetilo, como en el caso de los nematodos sri-14 tratados con ARNi (Figura 24A). Por otra parte, cuando se comparó con el mutante odr-10, el mutante sri-14 mostró un defecto en la quimiotaxis específica para una alta concentración de diacetilo (Figura 24A). El mutante sri-14 mostró una respuesta normal a otros repelentes y a altas concentraciones de otros atrayentes (Figura 24C). Esto sugiere que el SRI-14 se asocia solo con la detección de una alta concentración de diacetilo, entre los odorantes examinados.

Como resultado del análisis de la expresión indicadora, se encontró que sri-14 se expresa en las neuronas quimiosensoriales AWC y ASH (Figura 24D). Se considera que las neuronas AWC son necesarias para la detección de un gran número de atrayentes que comprenden diacetilo diluido 10 veces (22, 23), y las neuronas ASH se asocian con la evitación de un repelente (9) y una alta concentración de alcohol isoamílico (17). Con el fin de aclarar si SRI-14 funciona en las neuronas AWC o ASH en la respuesta a una alta concentración de diacetilo, el presente inventor ha llevado a cabo la desactivación específica de sri-14 en las neuronas AWC y ASH (24). Como resultado, la desactivación de sri-14 específica de ASH causó un defecto en la evitación del diacetilo, pero en el caso de la desactivación específica de AWC, no se observó ninguna anomalía (Figura 24E).

Adicionalmente, se rescató un defecto en la evitación del mutante sri-14 de una alta concentración de diacetilo por la expresión del ADNc de sri-14 específica de ASH, pero se rescató parcialmente o no se rescató por la expresión específica en las neuronas olfativas AWA, AWB o AWC (Figura 24F). Estos resultados demuestran que la función de SRI-14 en las neuronas sensoriales ASH es necesaria y suficiente para mediar la evitación de una alta

concentración de diacetilo. La respuesta de evitación a condiciones de alta presión osmótica está mediada por las neuronas ASH (25, 26). El resultado de que esta es una respuesta normal en el caso del mutante sri-14 (Figura 26D) indica que las neuronas ASH son normales con respecto a la detección de otras estimulaciones de evitación y la respuesta a las mismas. Además, se localizó una proteína de fusión de SRI-14 y una proteína verde fluorescente (GFP) en los cilios sensoriales de las neuronas ASH (Figura 24G). Esto demuestra que SRI-14 funciona como un factor para la señalización olfativa en los cilios sensoriales de ASH.

Identificación de neuronas sensoriales e interneuronas asociadas con el cambio de preferencia en función de la concentración de odorante

Las neuronas AWA (6) detectan una baja concentración de diacetilo (solución diluida a 10^{-4}) y las neuronas AWC (22, 23) detectan una concentración intermedia de diacetilo (solución diluida a 10^{-1}). Ambas neuronas median la atracción. Sin embargo, no se sabe qué neuronas sensoriales detectan una alta concentración de diacetilo (sin diluir) y se asocian con una respuesta de evitación. En los estudios previos, se había demostrado que las neuronas sensoriales ASH y AWB detectan una alta concentración de alcohol isoamílico (17) y median la evitación. Además, las neuronas AWC y AWB están asociadas tanto con la atracción como con la evitación (17, 27).

Por lo tanto, el presente inventor ha examinado la implicación de las neuronas sensoriales ASH, AWB y AWC con la respuesta de evitación a una alta concentración de diacetilo. Los nematodos, de los cuales AWB o AWC habían sido sometidos a eliminación genética, no mostraron un defecto en la quimiotaxis de responder a una alta concentración de diacetilo (Figura 27A). Sin embargo, cuando se eliminaron las neuronas ASH, se inhibió este comportamiento de evitación (Figura 27A). Estos resultados demuestran que las neuronas ASH detectan principalmente una alta concentración de diacetilo, y los resultados son consistentes con los resultados de que SRI-14 funciona en las neuronas ASH.

Con el fin de examinar si las neuronas AWA median o no la evitación al diacetilo y la atracción al diacetilo, el presente inventor ha analizado la respuesta de comportamiento de los nematodos, a partir de aquellos en los que las neuronas AWA se habían eliminado específicamente. Los nematodos, de aquellos en los que las neuronas AWA se habían eliminado, mostraron una disminución en la evitación de una alta concentración de diacetilo (Figura 27A), y una disminución en la atracción a una baja concentración de diacetilo (Figura 27B). Esto es similar a la capacidad de las neuronas AWC y AWB, que funcionan tanto para la atracción como para la evitación (17, 27). La doble eliminación de AWA y ASH causa un defecto más grave que en el caso de una sola eliminación y estos resultados muestran que tanto AWA como ASH funcionan en paralelo, en la respuesta a una alta concentración de diacetilo (Figura 27A).

Con el fin de aclarar la contribución de las interneuronas a un cambio de preferencia dependiente del olor y la concentración, el presente inventor ha examinado la participación de las interneuronas AIA, AIB, AIY y AIZ que tienen una unión sináptica directa o una unión gap con las neuronas sensoriales AWA o ASH, o con ambas neuronas sensoriales (Figura 27C). Estas interneuronas se inhibieron individualmente por la expresión específica de neuronas de unc-103 (gf) que proporciona hiperpolarización (28, 29). La inhibición funcional de las interneuronas AIA, AIY o AIZ cambió la respuesta de los nematodos expuestos a una alta concentración de diacetilo de una respuesta de evitación a una respuesta de atracción (Figura 27D), y la inhibición de AIB atenuó la respuesta de evitación. Estos resultados muestran que estas interneuronas desempeñan un papel importante en un cambio de preferencia dependiente del olor y la concentración, y se corresponden con el informe anterior de que AIB, AIY y AIZ son importantes para diferentes respuestas de comportamiento a una alta concentración de y a una baja concentración de alcohol isoamílico (17). Por el contrario, la atracción a una baja concentración de diacetilo no fue influenciada por la inhibición de estas interneuronas, excepto por AIY (Figura 27E). Esto sugiere que un circuito neural para mediar la atracción a una concentración más baja de diacetilo es diferente de un circuito neuronal para mediar la evitación de una alta concentración de diacetilo.

Uso adecuado de los receptores olfativos dependiendo de la concentración del olor

Los resultados de los experimentos de comportamiento de nematodos realizados por el presente inventor y los resultados del estudio anterior (11) sugieren que un cambio de preferencia dependiente de la concentración a diacetilo está mediado por dos tipos de receptores, concretamente, ODR-10 en las neuronas AWA y SRI-14 en las neuronas ASH. Por lo tanto, el presente inventor ha monitoreado la respuesta de las neuronas AWA y ASH a diversas concentraciones de diacetilo mediante imágenes de calcio, en las cuales se usó un indicador de calcio codificado genéticamente Yellow Cameleon (YC) 3.60 (30) en nematodos de tipo silvestre, mutantes odr-10 y mutantes sri-14.

En las neuronas AWA de los nematodos de tipo silvestre o de los mutantes sri-14, el calcio intracelular aumentó después de que los nematodos se hubieran expuesto a una baja concentración de diacetilo (29) (Figura 28A y B). Sin embargo, los mutantes odr-10 no respondieron a una concentración tan baja de diacetilo (Figura 28A y B). Estos resultados concuerdan con los hallazgos de que ODR-10 funciona como un receptor específico para una baja concentración de diacetilo en las neuronas AWA (21). Por el contrario, las neuronas AWA de los mutantes odr-10 y los nematodos de tipo silvestre respondieron normalmente a una alta concentración de diacetilo (Figura 28C y D).

Estos resultados son consistentes con los hallazgos de que los mutantes odr-10 mostraron una quimiotaxis normal a una alta concentración de diacetilo (Figura 24A). Debido a que la eliminación de estas neuronas redujo las respuestas tanto de atracción como de evitación (Figura 27A y B), estos resultados sugieren ampliamente que otros receptores distintos de ODR-10 están presentes en las neuronas AWA y detectan una alta concentración de diacetilo.

El presente inventor ha monitoreado una respuesta transitoria de Ca^{2+} en las neuronas ASH. En las neuronas ASH de los nematodos de tipo silvestre, se detectó una respuesta de Ca^{2+} solo a una alta concentración de diacetilo (Figura 29A). Para aclarar si la respuesta de ASH a una alta concentración de diacetilo está o no influenciada por otras neuronas, el presente inventor ha analizado la respuesta de Ca^{2+} en la ASH de mutantes unc-13 (e51) que tienen un defecto en la exocitosis de vesículas sinápticas (31). La respuesta de calcio de las neuronas ASH de los mutantes unc-13 a una alta concentración de diacetilo fue significativamente mayor que la de las neuronas ASH de los nematodos de tipo silvestre, y se prolongó (Figura 30A, B y D). Esto sugiere que las señales de otras neuronas inhiben la actividad de ASH en la respuesta al diacetilo.

Debido a que se ha observado que la respuesta al diacetilo se modifica en los nematodos con eliminación de AWA (Figura 27, A y B), el presente inventor ha probado adicionalmente los efectos de la eliminación de AWA sobre la respuesta de calcio de las neuronas de ASH a una alta concentración de diacetilo. Como resultado, el inventor ha encontrado que la eliminación de las neuronas AWA mejora la respuesta de calcio de las neuronas ASH (Figura 30A, C y D). Esto sugiere que AWA está asociada con un circuito inhibitorio de respuesta de ASH.

Posteriormente, el presente inventor ha monitoreado la respuesta de Ca^{2+} de las neuronas ASH de nematodos mutantes a una alta concentración de diacetilo. La respuesta de Ca^{2+} se indujo normalmente en las neuronas ASH del mutante odr-10, pero dicha respuesta se redujo significativamente en las neuronas ASH del mutante sri-14 (Figura 29B y C). Se rescató un defecto en la respuesta de ASH del mutante sri-14 a una alta concentración de diacetilo fue rescatado por la expresión específica de ASH de un gen de sri-14 de tipo silvestre (Figura 29B y C). Por otra parte, cuando se eliminó sri-14 específicamente de ASH en nematodos de tipo silvestre, se redujo la respuesta de Ca^{2+} de ASH a una alta concentración de diacetilo (Figura 29B y C). Estos resultados demuestran que SRI-14 funciona como un componente principal para la recepción de una alta concentración de diacetilo en las neuronas ASH.

Debido que se ha observado la expresión de sri-14 en las neuronas AWC y en las neuronas ASH (Figura 24D), el presente inventor ha monitoreado la respuesta de AWC a una alta concentración de diacetilo. Un aumento en la concentración de Ca^{2+} en AWC fue causado por la eliminación del olor (32). Como tal, el presente inventor ha probado la respuesta de las neuronas AWC después de la eliminación de una alta concentración de diacetilo, y como resultado, el inventor ha encontrado que se produce una respuesta de Ca^{2+} en las neuronas AWC (Figura 31). Estos resultados concuerdan con el informe anterior de que AWC y AWA (22,23) detectan el diacetilo. Sin embargo, la eliminación de AWC no influyó en la evitación de una alta concentración de diacetilo (Figura 27A). Esto sugiere que la respuesta de las neuronas AWC no es importante para la evitación del diacetilo. Debido a que la respuesta de comportamiento a una alta concentración de diacetilo no se vio influenciada por la expresión específica de AWC de sri-14 o la reducción específica de AWC de sri-14 (Figura 24E y F), se considera que habrá otros receptores distintos a SRI-14, que median la respuesta de AWC a una alta concentración de diacetilo.

En general, las neuronas AWB están asociadas con un comportamiento de evitación (15). En los estudios previos, se había indicado que la respuesta de Ca^{2+} de las neuronas AWB se produce después de la eliminación de nonanona o una alta concentración de alcohol isoamílico (17,33). Por lo tanto, el presente inventor ha llevado a cabo la expresión ectópica del ADNc de sri-14 en las neuronas AWB y ha monitoreado la respuesta de Ca^{2+} a diversas concentraciones de diacetilo.

El presente inventor ha observado una ligera respuesta de Ca^{2+} después de la eliminación del olor en ambos casos de baja concentración y alta concentración de diacetilo en las neuronas AWB de tipo silvestre. Cuando se compara con una respuesta tan débil en las neuronas AWB de tipo silvestre, la respuesta de Ca^{2+} de las neuronas AWB después de la eliminación de una alta concentración de diacetilo se mejoró significativamente por la expresión ectópica de SRI-14. Sin embargo, la expresión ectópica de SRI-14 no cambió la respuesta a la eliminación de una baja concentración de diacetilo (Figura 32A y B). Estos resultados respaldan nuestra conclusión de que SRI-14 contribuye a la detección de una alta concentración de diacetilo. Además, estos hallazgos sugieren que ODR-10 en las neuronas AWA y SRI-14 en las neuronas ASH responden a una concentración baja y una concentración alta de diacetilo, respectivamente, y que funcionan como receptores para mediar los comportamientos de atracción y evitación (Figura 33).

(3) Consideración

Con el fin de identificar exhaustivamente los receptores olfativos odorantes específicos, el presente inventor ha usado el análisis del ARNi. Debido a que los nematodos (*C. elegans*) tienen receptores olfativos y señalización olfativa, que son similares a los de los mamíferos (23, 34), se consideran organismos modelo para el análisis olfativo. Por otra parte, se describen todas las redes neuronales capaces de seguir rutas en las que se transmiten

señales olfativas en los circuitos neurales (35). Sin embargo, la relación de correspondencia de la mayoría de los odorantes con receptores específicos u oligómeros del receptor no se conoce y tampoco se conoce el mecanismo de la interacción entre los odorantes y los receptores olfativos. Como consecuencia, no se entiende cómo se introducen las señales de olor, cómo se transmiten las señales olfativas en los circuitos neurales y cómo un pequeño número de ORN en los nematodos (*C. elegans*) pueden distinguir un gran número de odorantes. Un análisis adicional de los candidatos a receptores obtenidos como resultado del análisis de ARNi es útil para identificar los receptores olfativos para los odorantes específicos y comprender estos mecanismos.

El presente inventor había indicado previamente que diferentes neuronas sensoriales funcionan dependiendo de la concentración de un olor (17). En este estudio, el presente inventor ha encontrado que, con respecto a la recepción de diacetilo, ODR-10 y SRI-14 funcionan respectivamente como receptores específicos a una baja concentración y una alta concentración de diacetilo en ORN específicas (Figura 33). Se supone que es probable que SRI-14 tenga una afinidad más baja por el diacetilo que la de ODR-10. Sin embargo, estos receptores no tienen una secuencia homóloga en un sitio de reconocimiento de odorantes, y por lo tanto, el mecanismo que es la base de la capacidad de estos receptores para distinguir las mismas sustancias químicas que tienen diferentes concentraciones sigue siendo desconocido.

En el experimento de imágenes de calcio, se ha demostrado que las neuronas sensoriales AWA responden tanto a una concentración baja como a una alta concentración de diacetilo. La eliminación genética de las neuronas AWA causó un defecto en la evitación de una alta concentración de diacetilo y en la atracción a una baja concentración de diacetilo. Estos resultados sugieren que las neuronas AWA contribuyen a detectar el diacetilo que tiene un amplio rango de concentraciones y producir un comportamiento opuesto a una concentración diferente. Estos hallazgos y los hallazgos indicados previamente con respecto a las neuronas AWB (16) y las neuronas AWC (26), muestran que estas ORN de los nematodos (*C. elegans*) pueden mediar tanto un comportamiento de atracción como un comportamiento de evitación. ODR-10 estaba presente en las neuronas AWA (11) y el mutante odr-10 exhibió una atracción reducida a una baja concentración de diacetilo, pero mostró una evitación normal a una alta concentración de diacetilo. Estos resultados sugieren que las neuronas AWA tienen una pluralidad de receptores de diacetilo, particularmente para una alta concentración de diacetilo.

Hay candidatos de receptores para una alta concentración de diacetilo, distintos de SRI-14, que se obtuvieron por el presente inventor de acuerdo con el análisis de ARNi. Es probable que el análisis de estos otros candidatos provoque la identificación de otros receptores de diacetilo y la adición de estrategias por medio de las cuales los diferentes receptores actúan dependiendo de la concentración de un olor.

Tabla 3

	laa	Bz	Bu	Pd	Pz	Tmt	Nona	Oct	laa alto	Bz alto	Da alto
Control	0,56 ± 0,019	0,48 ± 0,019	0,65 ± 0,021	0,49 ± 0,020	0,49 ± 0,019	0,64 ± 0,015	-0,91 ± 0,009	-0,68 ± 0,013	-0,84 ± 0,011	-0,91 ± 0,007	-0,62 ± 0,012
srh-4	0,36	0,30	0,65	0,53	0,26	0,80	-0,87	-0,17	-0,73	-0,75	-0,81
srh-7	0,55	0,92	0,91	0,84	0,77	0,76	-0,78	-0,65	-0,86	-1,00	-0,83
srh-8	0,91	0,67	0,93	0,66	0,52	0,59	-0,86	-0,80	-0,94	-0,93	-0,63
srh-10	0,12	0,12	-0,65	0,68	0,67	0,88	-0,88	-0,45	-0,96	-0,95	0,20
srh-11	0,05	-0,11	-0,15	0,75	0,87	0,85	-0,65	-0,19	-0,79	-0,78	-0,65
srh-15	0,59	-0,13	0,55	0,44	0,78	0,91	-0,25	-0,85	-0,60	-0,41	-0,54
srh-16	0,86	0,83	0,74	0,95	0,82	0,49	-0,63	-0,89	-0,74	-0,88	-0,65
srh-18	0,67	0,05	0,52	0,96	0,73	0,91	-0,26	-0,65	-0,78	-0,88	-0,74
srh-19	0,67	0,64	0,89	0,64	0,33	0,88	-0,80	-0,33	-0,89	-1,00	-0,43
srh-22	0,58	0,28	0,19	0,42	0,82	0,75	-0,89	-0,48	-0,81	-0,80	-0,74
srh-23	0,54	0,54	0,67	0,48	0,43	0,78	-0,77	-0,90	0,88	-0,88	-0,87
srh-24	0,58	0,69	0,59	0,59	0,57	0,92	-0,79	-0,56	-1,00	-1,00	-0,67
srh-25	0,28	0,36	0,72	0,95	0,64	0,95	-0,06	-0,90	0,13	-0,73	-0,22
srh-27	0,48	-0,16	0,63	0,27	0,32	0,71	-0,79	-0,68	-0,92	-0,96	-0,80
srh-28	0,63	0,68	0,55	0,22	0,23	0,92	-0,71	-0,73	-0,64	-0,75	-0,58
srh-36	0,37	0,42	0,37	0,26	0,53	0,51	-0,57	-0,72	-0,59	-0,95	-0,46
srh-37	0,57	0,65	0,37	0,60	0,88	0,87	-0,89	-0,88	-0,69	-1,00	-0,34
srh-39	0,56	-0,08	0,48	-0,24	0,11	0,45	-0,90	-0,5	-0,79	-0,84	-0,51
srh-40	0,79	0,50	0,94	0,47	0,51	0,73	-0,83	-0,92	-0,88	-0,87	-0,46
srh-41	0,57	0,49	0,64	0,57	0,71	0,85	-0,62	-0,80	-0,56	-0,89	-0,21
srh-44	0,71	0,51	0,82	0,52	0,44	0,90	-0,58	-0,52	0,00	-0,48	-0,25
srh-45	0,55	0,40	0,73	0,26	0,74	0,73	-0,91	-0,87	-0,97	-0,96	-0,47
srh-46	0,58	0,17	0,82	0,03	-0,04	0,83	-0,87	-0,87	-0,91	-0,82	-0,82
srh-48	0,77	0,29	0,55	0,38	0,15	0,65	-0,79	-0,83	-0,67	-0,80	-0,49
srh-49	0,58	0,42	0,80	0,60	0,52	0,59	-0,91	-0,57	-0,59	-0,76	-0,62

ES 2 707 977 T3

	laa	Bz	Bu	Pd	Pz	Tmt	Nona	Oct	laa alto	Bz alto	Da alto
srh-50	0,60	0,40	0,87	0,53	0,83	0,84	-0,96	-0,89	-0,93	-1,00	-0,52
srh-51	0,41	0,44	0,70	0,63	0,31	0,64	-0,90	-0,89	-0,85	-0,96	-0,73
srh-52	0,50	0,26	0,69	0,51	0,55	0,55	-0,85	-0,79	-0,96	-1,00	-0,78
srh-55	0,49	0,68	0,43	0,49	0,56	0,66	-0,96	-0,95	-0,95	-0,98	-0,78
srh-59	0,31	-0,35	0,51	-0,14	0,04	0,37	-0,79	-0,55	-0,87	-0,91	-0,24
srh-60	0,66	0,32	0,79	0,22	0,52	0,79	-0,83	-0,52	-0,77	-0,98	-0,64
srh-61	0,52	0,62	0,74	0,40	0,27	0,70	-0,68	-0,77	-0,82	-0,92	-0,57
srh-67	0,55	0,29	0,85	0,41	0,39	0,63	-0,61	-0,66	-0,96	-0,97	-0,58
srh-68	0,75	0,49	0,67	0,21	0,36	0,57	-0,65	-0,79	-0,67	-0,87	-0,49
srh-69	0,63	0,33	0,66	0,13	0,35	0,75	-0,84	-0,61	-0,94	-0,87	-0,76
srh-70	0,42	0,28	0,43	0,25	0,41	0,78	-0,81	-0,80	-0,40	-0,94	-0,87
srh-71	0,19	0,00	0,76	0,14	0,56	0,85	-0,80	-0,60	-0,76	-0,91	-0,38
srh-72	0,52	0,74	0,58	0,29	0,50	0,58	-0,87	-0,62	-0,55	-0,98	-0,73
srh-74	0,50	0,55	0,76	0,42	0,26	0,44	-0,96	-0,89	-0,51	-0,95	-0,54
srh-75	0,69	0,32	0,76	0,53	0,71	0,54	-0,86	-0,59	-0,50	-0,94	-0,42
srh-77	0,16	0,17	0,70	0,32	0,44	0,52	-0,74	-0,31	-0,69	-0,89	-0,34
srh-79	0,39	0,23	0,58	0,53	0,12	0,42	-0,61	-0,17	-0,22	-0,80	0,35
srh-80	0,45	0,20	0,64	0,41	0,40	0,39	-0,81	-0,39	-0,31	-0,87	-0,48
srh-82	0,77	0,25	0,79	0,49	0,31	0,71	-0,96	-0,65	-0,53	-0,88	-0,36
srh-83	0,51	0,38	0,71	0,72	0,38	0,86	-0,70	-0,33	0,34	-0,45	-0,23
srh-97	0,49	0,20	0,80	0,71	0,66	0,77	-0,66	-0,64	-0,51	-0,86	-0,42
srh-99	0,48	0,23	0,75	0,54	0,29	0,65	-0,82	-0,61	-0,33	-0,74	-0,24
srh-100	0,76	0,73	0,80	0,35	0,30	0,62	-0,48	-0,46	-0,64	-0,94	-0,75
srh-104	0,48	0,19	0,48	-0,30	-0,18	0,65	-0,71	-0,36	-0,48	-0,91	-0,39
srh-105	0,58	0,33	0,76	0,27	0,32	0,66	-0,80	-0,61	-0,76	-0,96	-0,58
srh-109	0,59	0,22	0,89	0,65	0,32	0,76	-0,84	-0,91	-0,68	-0,87	-0,59
srh-111	0,44	0,10	0,59	0,39	-0,23	0,37	-0,71	-0,44	-0,08	-0,79	-0,35
srh-113	0,39	-0,32	0,30	0,14	0,35	0,83	-0,91	-0,43	-0,36	-0,95	-0,62
srh-115	0,40	0,41	0,70	0,39	0,19	0,47	-0,75	-0,82	-0,38	-0,89	-0,57
srh-116	0,76	0,11	0,56	0,22	0,35	0,56	-0,69	-0,82	-0,45	-0,91	-0,36
srh-118	0,59	0,79	0,60	0,44	0,36	0,73	-0,89	-0,37	-0,54	-0,82	-0,64
srh-119	0,39	-0,22	0,50	0,18	0,37	0,71	-0,84	-0,35	-0,83	-0,93	-0,78
srh-120	0,34	0,52	0,78	0,80	0,54	0,72	-0,68	-0,37	-0,80	-0,89	-0,66
srh-122	0,25	0,21	0,58	0,24	0,47	0,44	-0,84	-0,61	-0,84	-0,74	-0,53
srh-123	0,46	0,40	0,84	0,30	0,63	0,56	-0,90	-0,32	-0,49	-0,93	-0,55
srh-125	0,35	0,52	0,76	0,08	0,39	0,70	-0,77	-0,56	-0,69	-0,96	-0,59
srh-128	0,25	0,36	0,69	0,49	0,54	0,62	-0,89	-0,47	-0,53	-0,95	-0,48
srh-129	0,69	0,36	0,63	0,15	0,71	0,69	-0,90	-0,56	-0,72	-0,91	-0,69
srh-130	0,60	0,20	0,82	0,36	0,22	0,70	-0,94	-0,68	-0,76	-0,73	-0,37
srh-131	0,59	0,33	0,80	0,26	0,63	0,77	-0,45	-0,49	-0,57	-0,63	-0,34
srh-132	0,43	0,23	0,26	0,10	0,22	0,57	-0,84	-0,19	-0,89	-1,00	-0,83
srh-139	0,73	0,41	0,44	0,06	0,29	0,75	-0,91	-0,73	-0,39	-0,94	-0,42
srh-140	0,46	0,07	0,70	-0,08	-0,06	0,50	-0,80	-0,78	-0,67	-0,87-0,	-0,46
srh-141	0,70	0,23	0,56	0,47	0,33	0,81	-0,94	-0,49	-0,87	-0,98	-0,77
srh-142	-0,14	0,17	0,68	0,36	0,61	0,47	-0,94	-0,59	-0,90	-0,89	-0,49
srh-145	0,78	0,61	0,93	0,39	0,46	0,79	-0,44	-0,64	-0,87	-0,90	-0,85
srh-148	0,49	0,21	0,78	0,39	0,36	0,54	-0,78	-0,67	-0,71	-0,89	-0,69
srh-154	0,79	0,42	0,82	0,58	0,61	0,61	-0,58	-0,65	-0,75	-0,82	-0,65
srh-159	0,54	0,27	0,78	0,38	0,22	0,57	-0,48	-0,79	-0,94	-0,74	-0,45
srh-165	0,27	0,17	0,75	0,44	0,57	0,58	-0,40	-0,49	-0,58	-0,89	-0,79
srh-166	0,44	0,19	0,54	0,08	0,23	0,74	-1,00	-0,74	-0,76	-0,83	-0,83
srh-167	0,02	-0,31	0,25	-0,16	0,33	0,43	-1,00	-0,28	-0,44	-0,83	-0,89
srh-169	0,65	0,34	0,04	0,20	0,11	0,63	-0,92	-0,62	-0,90	-1,00	-0,92
srh-174	0,76	0,23	0,70	0,51	0,76	0,73	-0,92	-0,45	-0,92	-0,89	-0,69
srh-179	0,53	0,61	0,77	0,44	0,40	0,75	-0,97	-0,60	-0,83	-0,95	-0,87
srh-182	0,71	0,57	0,61	0,52	0,26	0,59	-0,98	-0,86	-0,46	-0,94	-0,86
srh-186	0,51	0,58	0,65	0,72	0,73	0,80	-0,93	-0,64	-0,92	-0,94	-0,80
srh-190	0,57	0,28	0,53	0,11	0,17	0,63	-1,00	-0,64	-0,82	-0,97	-0,91
srh-193	0,64	0,53	0,85	0,60	0,55	0,62	-0,84	-0,92	-0,88	-0,90	-0,53
srh-195	0,61	0,67	0,31	0,36	0,70	0,93	-0,98	-0,47	-0,90	-0,89	-0,80
srh-201	0,81	0,67	0,82	0,79	0,46	0,83	-0,97	-0,93	-0,93	-1,00	-0,95
srh-203	0,67	0,42	0,63	0,36	0,50	0,68	-0,84	-0,47	-0,90	-0,98	-0,94

	laa	Bz	Bu	Pd	Pz	Tmt	Nona	Oct	laa alto	Bz alto	Da alto
<i>srh-204</i>	0,72	0,39	0,13	0,21	0,33	0,75	-1,00	-0,90	-0,89	-1,00	-0,89
<i>srh-206</i>	0,53	0,43	0,59	0,24	0,27	0,61	-1,00	-0,94	-0,82	-0,97	-0,79
<i>srh-207</i>	0,75	0,68	0,44	0,78	0,71	0,72	-1,00	-0,81	-0,88	-1,00	-0,87
<i>srh-208</i>	0,82	0,83	0,78	0,68	0,67	0,82	-0,82	-0,60	-0,96	-0,93	-0,76
<i>srh-209</i>	0,29	-0,20	0,48	0,18	0,18	0,62	-0,84	-0,60	-0,85	-0,85	-0,70
<i>srh-210</i>	0,92	0,66	0,67	0,38	0,47	0,45	-0,66	-0,77	-0,82	-0,96	-0,56
<i>srh-214</i>	0,63	0,57	0,85	0,88	0,72	0,78	-0,96	-0,98	-0,93	-0,66	-0,60
<i>srh-216</i>	0,76	0,47	0,86	0,65	0,60	0,73	-0,83	-0,68	-0,95	-0,95	-0,61
<i>srh-217</i>	-0,12	0,76	0,69	0,92	0,94	0,60	-0,44	-0,82	-0,93	-0,92	-0,50
<i>srh-220</i>	0,81	0,61	0,81	0,67	0,40	0,52	-0,28	-0,47	-0,53	-0,84	-0,42
<i>srh-222</i>	0,80	0,76	0,62	0,46	0,65	0,58	-0,82	-0,77	-0,91	-0,85	-0,66
<i>srh-223</i>	0,51	0,49	0,88	0,23	0,43	0,76	-0,74	-0,75	-0,78	-0,73	-0,50
<i>srh-227</i>	0,43	0,56	0,37	0,60	0,35	0,76	-0,59	-0,43	-0,37	-0,75	-0,41
<i>srh-229</i>	-0,20	-0,21	0,60	0,12	0,09	0,69	-0,27	-0,70	-0,89	-1,00	-0,66
<i>srh-233</i>	0,36	-0,11	0,50	0,33	0,49	0,38	-0,21	-0,17	-0,74	-0,92	-0,70
<i>srh-235</i>	0,64	0,32	0,76	0,51	0,73	0,58	-0,24	-0,23	-0,81	-0,94	-0,29
<i>srh-236</i>	0,41	0,31	0,71	0,37	0,44	0,64	-0,25	-0,44	-0,55	-0,80	-0,41
<i>srh-239</i>	0,57	0,34	0,59	0,49	0,54	0,84	-0,61	-0,58	-0,68	-0,98	-0,45
<i>srh-241</i>	0,63	0,66	0,63	0,63	0,78	0,85	-0,76	-0,64	-0,85	-0,82	-0,70
<i>srh-243</i>	0,46	0,30	0,72	0,00	0,48	0,63	-0,98	-0,89	-0,89	-0,88	-0,70
<i>srh-244</i>	0,74	0,43	0,73	0,19	0,34	0,76	-0,79	-0,74	-0,86	-0,91	-0,59
<i>srh-247</i>	0,60	0,40	0,85	0,38	0,49	0,54	-0,81	-0,55	-0,93	-0,45	-0,70
<i>srh-250</i>	0,47	0,40	0,79	0,58	0,55	0,58	-0,90	-0,58	-0,93	-0,94	-0,75
<i>srh-251</i>	0,75	0,70	0,92	0,32	0,32	0,64	-0,80	-0,76	-0,84	-0,92	-0,68
<i>srh-252</i>	0,59	0,71	0,86	0,65	0,87	0,64	-0,67	-0,74	-0,96	-0,96	-0,47
<i>srh-258</i>	0,78	0,40	0,56	0,35	0,44	0,75	-0,92	-0,57	-0,96	-0,94	-0,83
<i>srh-261</i>	0,51	0,45	0,60	0,27	0,57	0,72	-0,86	-0,70	-0,81	-0,92	-0,65
<i>srh-264</i>	0,61	0,38	0,56	0,46	0,85	0,74	-0,88	-0,50	-0,91	-0,79	-0,52
<i>srh-266</i>	0,25	0,32	-0,31	0,00	-0,14	0,25	-0,97	-0,52	-0,92	-0,95	-0,74
<i>srh-274</i>	0,44	0,45	-0,59	0,82	0,12	0,60	-0,93	-0,83	-0,93	-0,97	-0,65
<i>srh-275</i>	0,39	0,16	-0,29	0,57	0,42	0,53	-0,97	-0,84	-0,79	-0,90	-0,59
<i>srh-276</i>	0,58	0,56	0,30	0,45	0,44	0,59	-1,00	-0,81	-0,87	-1,00	-0,24
<i>srh-277</i>	0,54	0,49	-0,09	0,83	0,81	0,65	-1,00	-0,77	-0,79	-0,94	-0,92
<i>srh-279</i>	0,53	0,34	0,89	0,55	0,01	0,61	-0,91	-0,57	-0,92	-0,96	-0,76
<i>srh-281</i>	0,51	0,33	0,49	0,64	0,01	0,55	-0,88	0,03	-0,62	-0,79	-0,52
<i>srh-282</i>	0,52	0,24	0,80	0,73	0,55	0,79	-0,83	-0,70	-0,89	-1,00	-0,65
<i>srh-283</i>	0,34	0,21	0,65	0,15	0,26	0,56	-0,89	-0,29	-0,73	-0,88	-0,86
<i>srh-284</i>	0,73	0,29	0,73	0,36	0,49	0,59	-0,89	-0,41	-0,79	-0,84	-0,48
<i>srh-291</i>	0,80	0,58	0,86	0,48	0,82	0,91	-0,81	-0,12	-0,47	-0,80	-0,59
<i>srh-292</i>	0,43	0,48	0,80	0,52	0,43	0,78	-0,86	-0,62	-0,59	-0,93	-0,55
<i>srh-293</i>	0,71	0,31	0,75	0,00	0,59	0,82	-0,81	-0,50	-0,70	-0,96	-0,70
<i>srh-297</i>	0,42	0,63	0,84	0,32	0,29	0,56	-0,94	-0,80	0,17	-0,90	-0,42
<i>srh-298</i>	0,68	0,66	0,65	0,68	0,33	0,82	-0,37	-0,50	-0,83	-0,94	-0,68
<i>srh-308</i>	0,56	0,14	0,04	0,39	0,15	0,30	-0,87	-0,63	-0,86	-0,86	-0,62

Tabla 3. Datos sin procesar con respecto al análisis de ARNi de los genes de la familia de receptores olfativos *srh*

- 5 Los índices de quimiotaxis de nematodos, cuyos genes de la familia *srh* se trataron con ARNi en el primer (A), el segundo (B) y el tercer análisis (C), a 11 odorantes. Los 11 odorantes incluyen: bajas concentraciones de seis atrayentes [alcohol isoamílico (laa), benzaldehído (Bz), butanona (Bu), pentanodiona (Pd), pirazina (Pz) y trimetiltiliazol (Tmt)]; dos repelentes [nonanona (Nona) y octanol (Oct)]; y altas concentraciones de tres atrayentes [alcohol isoamílico (alto laa), benzaldehído (Bz alto) y diacetilo (Da alto)]. Los tonos azul, naranja y verde indican diferencias estadísticas, respectivamente, comparadas con el valor de control en la misma fecha, comparadas con el
- 10 promedio de los valores de control en todos los días y comparadas con estos dos valores (véase la sección "Materiales y método").

Tabla 4

Gen	Odorante	1º	2º	3º
<i>sra-1</i>	Da alto	-0,22	-0,09	-0,71

ES 2 707 977 T3

Gen	Odorante	1°	2°	3°
sra-2	Da alto	-0,56	-0,31	-0,63
sra-6	Bu	-0,73	-0,15	0,44
sra-7	Da alto	0,46	-0,47	-0,29
sra-8	Da alto	-0,12	-0,32	-0,62
sra-9	Da alto	-0,43	-0,59	-0,67
sra-12	Pz	0,45	-0,37	0,52
sra-17	laa	0,33	-0,26	0,08
sra-18	Bz	0,24	-0,14	0,29
	Tmt	0,19	0,18	0,44
sra-20	Bz	0,28	-0,19	0,12
	Pz	-0,16	0,10	0,36
	Nona	-0,52	-0,90	-0,84
sra-24	laa	0,34	0,29	0,38
	Pz	-0,02	0,14	0,76
	Tmt	-0,27	0,35	0,64
sra-26	Pz	0,21	0,47	0,72
sra-27	Pz	0,26	0,32	0,57
sra-38	Bz alto	-0,87	-0,65	-0,19
srd-5	Bu	-0,36	-0,45	0,29
srd-15	Tmt	0,60	0,14	0,63
srd-17	laa	0,71	0,43	0,48
	Pz	0,53	0,19	0,13
	Tmt	0,59	-0,27	0,49
srd-18	Bz	0,30	0,02	-0,17
srd-19	Pz	0,39	0,09	0,23
srd-21	Da alto	-0,49	-0,45	-0,71
srd-23	Pz	0,31	0,22	0,50
	Oct	0,03	-0,51	-0,36
srb-1	Pd	0,55	0,12	0,22
srb-2	Pz	0,49	0,15	0,45
srv-11	Pd	0,38	0,14	0,21
srv-12	Bz alto	-0,91	-0,56	0,53
srx-3	Pz	0,54	0,47	0,45
srx-9	Pd	0,24	0,46	0,14
srx-14	Pd	0,70	0,37	0,37
srz-1	Pz	0,51	0,36	0,39
srz-2	Pz	0,63	-0,09	0,40
	Tmt	0,66	-0,40	0,51

ES 2 707 977 T3

Gen	Odorante	1°	2°	3°
srz-6	Pd	0,30	0,57	-0,30
srz-10	Bz	0,61	-0,06	0,16
srz-47	Da alto	-0,44	-0,57	-0,71
srz-48	Bz	0,42	0,02	-0,07
	Pd	0,68	0,21	0,08
	Bz alto	-0,87	-0,41	-0,90
srz-66	Da alto	-0,14	-0,58	-0,76
srz-94	Pz	0,49	0,38	0,25
srz-95	Pz	0,34	0,17	0,37
	Tmt	0,52	-0,11	0,47
srbc-3	Pd	0,10	0,24	-0,04
srbc-11	Pd	0,17	0,17	0,04
srbc-29	Oct	-0,29	-0,29	-0,48
srbc-61	Bz	0,30	0,21	0,11
srbc-66	Bz	0,47	0,29	0,04
srbc-75	Pd	0,58	0,13	0,36
srbc-82	Bz	0,29	0,13	0,45
srsx-11	Pd	0,76	-0,55	-0,83
srsx-26	Bu	-0,44	-0,54	-0,32
srsx-32	Pz	0,30	0,09	0,46
srsx-33	Pd	0,57	0,06	0,28
	Pz	0,52	0,30	0,42
srsx-34	Bz	0,04	0,07	0,43
srsx-37	Pd	0,52	0,49	0,27
srr-1	Pz	0,39	0,56	0,39
srr-8	Pd	0,28	0,49	0,19
srr-9	Pz	0,26	0,54	-0,01
srw-22	Bu	-0,32	-0,42	-0,32
srw-24	Pd	0,28	0,56	0,45
	Oct	-0,51	-0,30	-0,28
srw-26	Pd	0,25	-0,31	0,36
srw-29	Bz	0,33	-0,41	0,50
	Bu	-0,24	-0,46	-0,31
srw-31	Bu	-0,15	-0,61	-0,48
srw-33	Pz	-0,51	0,49	0,37
srw-58	Oct	-0,39	-0,33	-0,43
srw-117	Bz	0,26	-0,25	0,26
srw-121	Bu	-0,26	-0,54	-0,38

ES 2 707 977 T3

Gen	Odorante	1°	2°	3°
<i>srw-132</i>	Bu	-0,23	-0,64	-0,36
<i>srw-142</i>	Pz	0,27	0,38	0,31
<i>sru-4</i>	laa	0,13	0,23	0,74
<i>sru-12</i>	laa	0,42	0,06	0,64
<i>sru-31</i>	Pd	0,17	-0,05	0,23
<i>sru-37</i>	Bu	-0,51	-0,23	-0,53
<i>sru-38</i>	Bu	-0,57	-0,12	-0,33
<i>srh-7</i>	Bz	0,92	0,33	0,33
<i>srh-10</i>	laa	-0,12	0,44	0,19
	Bz	0,12	0,26	0,13
	Pd	0,68	0,06	-0,07
	Pz	0,67	0,50	0,25
<i>srh-18</i>	Tmt	0,91	0,52	-0,07
<i>srh-25</i>	Da alto	-0,22	-0,49	0,32
<i>srh-27</i>	Bz	-0,16	-0,08	0,20
	Pz	0,32	-0,07	0,21
<i>srh-28</i>	laa	0,63	-0,10	0,41
	Pd	0,22	-0,31	0,14
	Tmt	0,92	0,26	0,49
<i>srh-39</i>	Bz	-0,08	-0,33	-0,09
<i>srh-40</i>	laa	0,79	0,07	0,51
	Bz	0,50	-0,28	-0,02
<i>srh-59</i>	Tmt	0,37	0,69	0,69
<i>srh-68</i>	Pd	0,21	0,39	0,08
<i>srh-79</i>	Da alto	0,35	-0,63	-0,68
<i>srh-111</i>	Bz	0,10	0,13	0,20
<i>srh-119</i>	Bz	-0,22	-0,63	0,18
	Oct	-0,35	-0,60	-0,39
<i>srh-139</i>	Pd	0,06	0,41	0,09
<i>srh-140</i>	Bz	0,07	-0,25	0,45
<i>srh-214</i>	Da alto	-0,60	-0,63	-0,63
<i>srh-216</i>	Da alto	-0,61	-0,78	-0,77
<i>srh-236</i>	Da alto	-0,41	-0,67	-0,67
<i>srh-276</i>	Pz	0,44	-0,24	0,44
<i>srh-281</i>	Pz	0,01	0,42	0,74
	Da alto	-0,52	-0,42	-0,60
<i>srh-283</i>	Oct	-0,29	-0,78	-0,54
<i>srh-292</i>	Pz	0,43	0,12	0,68

ES 2 707 977 T3

Gen	Odorante	1°	2°	3°
<i>srh-293</i>	Pd	0,00	0,21	-0,21
<i>srh-297</i>	Pz	0,29	-0,12	0,46
<i>srh-298</i>	Oct	-0,50	-0,81	0,81
<i>srh-308</i>	Pz	0,15	0,29	0,36
<i>sri-6</i>	Pd	0,42	-0,20	0,13
	Pz	0,33	0,07	0,56
<i>sri-13</i>	Bz	0,23	0,28	0,26
<i>sri-14</i>	Da alto	-0,36	-0,46	-0,62
<i>sri-17</i>	Pz	0,36	0,30	0,30
<i>sri-21</i>	Da alto	-0,76	-0,59	-0,68
<i>sri-36</i>	Pz	-0,05	0,18	0,50
<i>sri-38</i>	Bz	0,19	-0,33	0,15
<i>sri-43</i>	Pd	0,27	-0,20	0,23
<i>sri-47</i>	Pz	0,50	-0,54	0,47
	Tmt	0,96	0,13	0,45
<i>sri-51</i>	Bz	0,21	0,05	-0,01
	Pz	0,14	-0,39	0,43
<i>sri-69</i>	Tmt	0,32	0,20	0,74
<i>srj-14</i>	Bz	0,06	-0,17	0,12
	Bu	0,54	0,57	0,06
<i>srj-22</i>	Bz	-0,21	0,25	0,27
	Bu	0,31	0,47	-0,06
	Pd	0,11	0,17	0,46
<i>srj-23</i>	Tmt	0,30	0,24	0,25
<i>srj-26</i>	Tmt	0,18	0,54	0,65
<i>srj-27</i>	Bu	0,58	0,60	-0,42
	Pd	0,29	0,17	0,37
<i>srj-39</i>	Oct	-0,38	-0,43	-0,42
<i>srj-57</i>	Bu	0,15	0,46	-0,39
<i>sre-13</i>	Da alto	-0,32	-0,56	-0,65
<i>sre-23</i>	Pz	0,38	-0,05	0,09
<i>sre-26</i>	Tmt	0,42	0,50	0,58
<i>sre-37</i>	Bz	0,00	0,15	0,26
<i>sre-38</i>	Bz	0,12	0,19	0,27
<i>sre-54</i>	Da alto	-0,36	-0,35	-0,72
<i>sre-56</i>	Pd	-0,18	-0,58	0,28
	Da alto	-0,38	-0,29	-0,77
<i>srab-4</i>	Pd	0,00	-0,56	0,12

ES 2 707 977 T3

Gen	Odorante	1°	2°	3°
<i>srab-7</i>	Bz	0,16	-0,18	-0,48
	Pd	0,00	0,13	-0,43
	Pz	0,11	0,17	-0,15
<i>srab-13</i>	Bz	0,16	-0,21	-0,30
<i>srab-18</i>	Pd	0,17	0,00	0,15
<i>srab-20</i>	Pd	-0,01	0,07	0,22
<i>srx-2</i>	Pd	-0,29	-0,14	-0,39
<i>srx-13</i>	laa	0,10	-0,31	0,43
	Pz	-0,15	0,18	0,43
<i>srx-46</i>	Pz	0,08	0,21	0,48
<i>srx-47</i>	Da alto	-0,60	-0,19	-0,69
<i>srx-118</i>	Da alto	-0,62	-0,29	-0,53
<i>srt-18</i>	Da alto	-0,38	-0,09	-0,57
<i>srt-25</i>	Da alto	-0,42	-0,36	-0,37
<i>srt-35</i>	Pz	0,07	0,22	0,46
<i>srg-10</i>	Pz	0,13	0,46	0,25
<i>srg-13</i>	Pz	0,22	0,06	0,44
<i>srg-20</i>	Pz	0,31	0,44	-0,05
<i>srg-37</i>	Pz	0,43	-0,10	0,40
<i>srg-46</i>	Pz	0,03	0,25	0,45
<i>srg-51</i>	Pz	-0,07	0,37	0,46
<i>srg-56</i>	Bu	0,52	0,40	-0,31
<i>srg-64</i>	laa	0,22	-0,09	0,30
	Bz	-0,14	-0,03	0,41
<i>str-1</i>	Pz	-0,32	0,28	0,46
<i>str-2</i>	laa	0,84	0,46	0,63
	Bz	0,68	0,23	0,19
	Da alto	-0,63	-0,62	-0,63
<i>str-5</i>	Bz	0,55	0,12	0,48
<i>str-10</i>	Oct	0,35	-0,61	-0,48
<i>str-18</i>	Bz	0,14	0,20	0,13
<i>str-19</i>	Bz	-0,11	-0,25	0,01
<i>str-20</i>	Pz	0,35	0,14	0,47
<i>str-23</i>	Pd	0,36	0,35	-0,07
<i>str-30</i>	Bz	-0,10	-0,03	0,22
	Pz	0,43	-0,03	0,49
<i>str-31</i>	Bz	-0,19	0,13	-0,17
	Pd	0,37	0,29	0,13

ES 2 707 977 T3

Gen	Odorante	1°	2°	3°
	Pz	0,22	0,21	0,44
str-32	laa	0,68	0,10	0,20
	Bz	-0,49	0,39	0,18
	Pz	-0,19	0,32	0,31
str-37		0,41	0,38	-0,39
str-38	Bz	-0,54	0,44	-0,63
str-40	laa	0,73	0,16	-0,08
	Pz	0,40	-0,06	0,36
str-55	Da alto	-0,30	-0,20	-0,70
str-63	Pz	0,56	0,15	0,57
str-71	Bz alto	0,22	-0,87	-0,76
str-74	Pz	0,40	0,04	0,21
str-78	Bz alto	-0,89	-0,87	-0,74
str-82	Pz	0,48	0,43	0,30
str-92	Nona	-0,82	-0,88	-0,77
str-94	Pd	0,46	0,30	0,09
str-96	Da alto	-0,55	-0,43	-0,76
str-106	Bz	0,09	0,00	0,02
	Pd	0,15	-0,40	-0,35
	Tmt	-0,20	0,38	0,18
str-112	Pd	0,44	0,25	-0,13
str-113	laa	0,58	0,43	-0,67
str-115	Pz	0,09	0,56	0,41
	Tmt	0,04	0,49	0,47
str-116	laa	0,19	0,27	0,30
	Tmt	0,15	0,54	0,58
str-118	laa	0,00	0,41	0,41
str-122	Tmt	0,25	0,66	0,53
str-123	Bz	0,10	0,02	0,24
	Pd	0,18	0,22	0,12
	Tmt	0,22	0,30	0,52
str-129	Bz	0,33	0,07	-0,21
	Pd	0,02	0,21	-0,15
	Tmt	0,21	0,32	0,51
str-130	laa	0,83	0,30	0,35
str-136	Pd	0,11	0,37	0,09
str-139	Pd	-0,27	0,21	0,29
str-144	laa	0,47	0,30	0,41

Gen	Odorante	1º	2º	3º
<i>str-146</i>	Iaa	0,48	0,67	0,45
<i>str-148</i>	Bz	0,30	-0,17	0,26
<i>str-149</i>	Bz	0,27	0,23	0,11
	Bu	-0,93	-0,10	-0,56
<i>str-150</i>	Bu	-0,50	-0,23	-0,93
<i>str-151</i>	Oct	-0,14	-0,33	-0,03
<i>str-165</i>	Bz	0,45	0,14	0,24
<i>str-196</i>	Da alto	-0,29	-0,12	-0,72
<i>str-199</i>	Da alto	-0,74	-0,20	-0,88
<i>str-209</i>	Bz	0,00	0,37	-0,09
	Da alto	-0,42	-0,32	-0,79
<i>str-211</i>	Nona	-1,00	-0,81	-0,59
	Iaa alto	-0,87	-0,80	-0,82
<i>str-217</i>	Bz	-0,14	0,25	0,41
	Pz	0,53	0,29	0,37
	Tmt	0,76	-0,24	0,21
<i>str-220</i>	Iaa	0,52	0,02	-0,22
	Bz	0,75	-0,35	0,12
	Pz	0,56	-0,53	-0,08
	Tmt	0,33	-0,33	0,39
<i>str-223</i>	Bz	0,10	0,22	-0,61
<i>str-225</i>	Bz	0,34	-0,38	0,43
<i>str-231</i>	Oct	-0,80	-0,69	0,03
<i>str-256</i>	Pz	0,30	0,38	0,61
<i>str-264</i>	Bz	0,46	0,13	0,50

Tabla 4. Datos sin procesar con respecto al análisis de ARNi de 194 genes candidatos de receptores olfativos

Después del tercer análisis, se obtuvieron un total de 194 genes candidatos de receptores olfativos. Esta tabla muestra los índices de quimiotaxis de los nematodos, en los cuales estos genes se trataron con ARNi en el primer, segundo y tercer análisis. Se demostró que algunos genes están asociados con la detección de una pluralidad de odorantes.

Tabla 5

Genes	Odorantes	Células
		<i>Análisis-este estudio de gen indicador</i>
<i>sra-17</i>	Iaa	AWA, varias neuronas
<i>sru-4</i>	Iaa	ADL
<i>srd-17</i>	Iaa, Tmt	AWC
<i>srh-10</i>	Iaa, Bz, Pd, Pz	ASH, ASJ,
<i>srh-68</i>	Pd	ADL, varias neuronas

Genes	Odorantes	Células
srh-139	Pd	ADL, varias neuronas
srsx-37	Pd	ADL
srv-11	Pd	ASH
srz-6	Pd	ADL
srz-1	Pz	ASH,ADL
srh-18	Tmt	ASH, PHA, PHB
srx-47	Da alto	ASH, AWA
sri-14	Da alto	ASH, AWC
srh-25	Da alto	ADL
srh-281	Da alto	ADL
srw-29	Bu	Célula de la vaina
<i>Expresión de WormBase</i>		
srh-28	Iaa, Pd, Pz,	Neuronas de la cabeza
	Tmt, Oct, Da	
srab-13	Bz	Neuronas de la cabeza, vulva en desarrollo, hipodermis
sra-38	Bz	Neuronas de la cabeza, faringe, células de cabeza no identificadas
srab-7	Bz, Pd, Pz,	Anfidios, neuronas de la cabeza, intestino, músculo depresor, musculo de la vulva
sra-20	Bz, Pz, Nona	Neuronas de la cabeza
sra-6	Bu	Neuronas de la cabeza, neuronas mecanosensoras, células de cabeza no identificadas, células de cabeza no identificadas
srh-38	Bu	Anfidios, fásmidos, neuronas de la cabeza, neuronas de la cola, células intestinales
srx-14	Pd	Neuronas de la cabeza, faringe, intestino, células de la glándula rectal, hipodermis
srx-3	Pz	Neuronas de la cabeza, neuronas de la cola, células intestinales
srg-13	Pz	Neuronas del cuerpo, neuronas de la cola
srh-281	Pz, Da	Neuronas de la cabeza
srd-15	Tmt	Fásmidos, neuronas de la cabeza, neuronas de la cola, faringe, intestino, válvula permatoca-uterina
srh-79	Da	Anfidios, fásmidos, neuronas de la cabeza, neuronas de la cola
sra-7	Da	Neuronas de la cabeza, células de cabeza no identificadas, células de cabeza no identificadas
srx-47	Da	Anfidios, neuronas de la cabeza, intestino, células de cabeza no identificadas
srj-57	Bu	células intestinales
srz-94	Pz	Células intestinales, hipodermis, células de las arrugas
str-115	Pz, Tmt	células intestinales
sra-2	Da	Músculo intestinal, músculo depresor anal, hipodermis, células de cabeza no identificadas

Tabla 5. Patrones de expresión de 35 genes candidatos de receptores y odorantes relevantes.

- 5 Solo las neuronas sensoriales se enumeran con sus nombres. Otras neuronas se enumeran como varias neuronas que pertenecen a un solo grupo. Para fotografías que muestren la expresión de los genes analizados, véase la Figura 23. Los genes escritos con letras en negrita indican genes, que se expresaron (según la expresión de un gen indicador) en neuronas que muestran una respuesta quimiosensorial al diacetilo cuando se eliminaron. Bu, butanona; Bz, benzaldehído; Da, diacetilo; Iaa, alcohol isoamílico; Nona, nonanona; Oct, octanol; Pd, pentanodiona; Pz, pirazina; Tmt, trimetiltiliazol.

[Ejemplo 7]

El presente inventor ha llevado a cabo los ejemplos descritos anteriormente sobre las cepas de *C. elegans* que se habían recolectado en varios lugares. Como resultado, se encontró una cepa que no mostraba un comportamiento de atracción a la orina derivada de varios tipos de pacientes con cáncer. Se examinó la secuencia del genoma de esta cepa. Como resultado, se reveló que hay muchas sustituciones de nucleótidos individuales en el genoma.

Por lo tanto, en el presente ejemplo, la precisión de la detección del cáncer se ha estudiado utilizando la cepa mutante genética mencionada anteriormente, así como una cepa de tipo silvestre.

Método:

Se examinaron la quimiotaxis de una cepa de tipo silvestre y de una cepa mutante genética a las muestras de orina de pacientes con cáncer que tienen cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer del conducto biliar, cáncer de recto, cáncer de ciego, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pulmón y tumor del estroma gastrointestinal, a la muestra de orina de un sujeto sano y a la muestra de orina de un sujeto sano que mostraba falsos positivos en un experimento de mediana escala.

Resultados:

La cepa mutante genética no mostró un comportamiento de atracción a la orina de casi ningún tipo de cáncer (Figura 34).

Debido a que la cepa mutante genética muestra una quimiotaxis normal a otros olores, se puede decir que su sentido olfativo básico funciona. En consecuencia, se predice que la cepa mutante genética tendrá un defecto en un receptor para recibir el olor de los tipos de cáncer (Figura 35).

Por otra parte, la cepa mutante genética muestra un comportamiento de atracción normal hacia las muestras falsas positivas. Por lo tanto, se analizó una muestra que resultó positiva por la cepa de tipo salvaje (cepa N2) utilizando una cepa mutante genética, y cuando la cepa mutante genética dio negativo a la muestra, se diagnosticó que la muestra era cáncer y cuando la muestra resultó positiva por la cepa mutante genética, se diagnosticó como falso positivo. En consecuencia, al utilizar cepas mutantes genéticas, se puede mejorar la precisión de la detección del cáncer (Figura 35).

[Ejemplo 8]

Identificación de receptores candidatos asociados con la recepción de olores de especies de cáncer individuales

Usando el secuenciador de nueva generación (Illumina), se decodificó la secuencia del genoma completo de la cepa mutante genética obtenida en el Ejemplo 7. Posteriormente, la secuencia descodificada se comparó con la secuencia del genoma de N2 y se buscaron los genes receptores que tienen una mutación.

Como resultado, las mutaciones fuertes estaban comprendidas en los genes receptores (Tabla 6).

Tabla 6

Gen receptor olfativo	Cáncer gástrico	Cáncer de colon	Cáncer de mama	Cáncer de páncreas	Cáncer de recto	Cáncer de pulmón	Cáncer de próstata	GIST	Cáncer del conducto biliar	Cáncer de ciego
gen de la familia srh	☐	☐			☐	☐	☐	☐	☐	☐
gen de la familia srz				☐		☐	☐	☐	☐	
gen de la familia srg		☐	☐	☐						

Estos genes fueron desactivados por el ARNi específico de la neurona olfativa AWC (Esposito et al, Efficient and cell specific knock-down of gene function in targeted *C. elegans* neurons. *Gene* 395, 170-176, 2007) y a continuación, se midió la quimiotaxis a la orina de tipos de cáncer individuales.

5 Como resultado, se encontró que los receptores reactivos son diferentes dependiendo de las especies de cáncer.

De este modo, es posible especificar tipos de cáncer de acuerdo con una prueba de quimiotaxis de nematodos.

10 En la Figura 36 se muestran los resultados obtenidos al examinar la quimiotaxis de una cepa con el receptor desactivado en la orina de pacientes con cáncer de mama.

15 De estudios sobre perros detectores de cáncer, se predijo que los tipos de cáncer individuales tienen diferentes olores. Por lo tanto, los receptores olfativos de los nematodos a los olores de los tipos de cáncer individuales se identifican y a continuación, se producen los mutantes, que tienen la delección del receptor o de los receptores. Un ejemplo del método para producir tal mutante por delección incluye un método CRISPR/Cas9 (Friedland et al, Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system, *Nature Methods*, 2013).

En primer lugar, como ETAPA 1, la presencia o ausencia de cáncer se prueba utilizando una cepa N2.

20 A continuación, como ETAPA 2, se especifica un tipo de cáncer utilizando un mutante del receptor de cada tipo de cáncer. Por ejemplo, cuando un receptor mutante para el olor del cáncer de intestino grueso no muestra un comportamiento de atracción, se puede diagnosticar que se trata de cáncer de intestino grueso (Figura 37).

Referencias

- 25
1. A. Menini, Ed., *The Neurobiology of Olfaction* (CRC Press, Boca Raton, FL, 2010).
 2. L. Buck, R. Axel A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175-187 (1991).
 3. S. Serizawa, K. Miyamichi, H. Sakano, One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. *Trends Genet.* 20, 648-653 (2004).
 - 30 4. P. Mombaerts, Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 263-278 (2004).
 5. H. Saito, Q. Chi, H. Zhuang, H. Matsunami, J. D. Mainland, Odor coding by a Mammalian receptor repertoire. *Sci. Signal.* 2, ra9 (2009).
 - 35 6. C. I. Bargmann, E. Hartwig, H. R. Horvitz, Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* 74, 515-527 (1993).
 7. B. M. de, A. V. Maricq, Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 451-501 (2005).
 8. H. M. Robertson, J. H. Thomas, The putative chemoreceptor families of *C. elegans*. *WormBook*, 1-12 (2006).
 - 40 9. C. I. Bargmann, Chemosensation in *C. elegans*. *WormBook*, 1-29 (2006).
 10. E. R. Liman, Y. V. Zhang, C. Montell, Peripheral Coding of Taste. *Neuron* 81,984-1000 (2014).
 11. P. Sengupta, J. H. Chou, C. I. Bargmann, odr-10 encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. *Cell* 84, 899-909 (1996).
 - 45 12. K. Kim, K. Sato, M. Shibuya, D. M. Zeiger, R. A. Butcher, J. R. Ragains, J. Clardy, K. Touhara, P. Sengupta, Two chemoreceptors mediate developmental effects of dauer pheromone in *C. elegans*. *Science* 326, 994-998 (2009).
 13. P. T. McGrath, Y. Xu, M. Ailion, J. L. Garrison, R. A. Butcher, C. I. Bargmann, Parallel evolution of domesticated *Caenorhabditis* species targets pheromone receptor genes. *Nature* 477, 321-325 (2011).
 - 50 14. D. Park, I. O'Doherty, R. K. Somvanshi, A. Bethke, F. C. Schroeder, U. Kumar, D. L. Riddle, Interaction of structure-specific and promiscuous G-protein-coupled receptors mediates small-molecule signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 9917-9922 (2012).
 15. E. R. Troemel, B. E. Kimmel, C. I. Bargmann, Reprogramming chemotaxis responses: sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans*. *Cell* 91, 161-169 (1997).
 - 55 16. M. Y. Chao, H. Komatsu, H. S. Fukuto, H. M. Dionne, A. C. Hart, Feeding status and serotonin rapidly and reversibly modulate a *Caenorhabditis elegans* chemosensory circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101,15512-15517 (2004).
 17. K. Yoshida, T. Hirotsu, T. Tagawa, S. Oda, T. Wakabayashi, Y. Iino, T. Ishihara, Odour concentration-dependent olfactory preference change in *C. elegans*. *Nat. Commun.* 3, 739 (2012).
 - 60 18. R. S. Kamath, A. G. Fraser, Y. Dong, G. Poulin, R. Durbin, M. Gotta, A. Kanapin, B. N. Le, S. Moreno, M. Sohrmann, D. P. Welchman, P. Zipperlen, J. Ahringer, Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421, 231-237 (2003).
 19. S. Kennedy, D. Wang, G. Ruvkun, A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 427, 645-649 (2004).
 20. E. R. Troemel, J. H. Chou, N. D. Dwyer, H. A. Colbert, C. I. Bargmann, Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell* 83, 207-218 (1995).
 - 65 21. J. Larsch, D. Ventimiglia, C. I. Bargmann, D. R. Albrecht, High-throughput imaging of neuronal activity in

Caenorhabditis elegans. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, E4266-4273 (2013).

22. J. H. Chou, C. I. Bargmann, P. Sengupta, The *Caenorhabditis elegans* odr-2 gene encodes a novel Ly-6-related protein required for olfaction. Genetics 157, 211-224 (2001).

23. P. Sengupta, Generation and modulation of chemosensory behaviors in *C. elegans*. Pflugers Arch. 454, 721-734 (2007).

24. G. Esposito, S. E. Di, C. Bergamasco, P. Bazzicalupo, Efficient and cell specific knock-down of gene function in targeted *C. elegans* neurons. Gene 395, 170-176 (2007).

25. J. G. Culotti, R. L. Russell, Osmotic avoidance defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Genetics 90, 243-256 (1978).

26. C. I. Bargmann, J. H. Thomas, H. R. Horvitz, Chemosensory cell function in the behavior and development of *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 55, 529-538 (1990).

27. M. Tsunozaki, S. H. Chalasani, C. I. Bargmann, A behavioral switch: cGMP and PKC signaling in olfactory neurons reverses odor preference in *C. elegans*. Neuron 59, 959-971 (2008).

28. D. J. Reiner, D. Weinshenker, H. Tian, J. H. Thomas, K. Nishiwaki, J. Miwa, T. Gruninger, B. Leboeuf, L. R. Garcia, Behavioral genetics of *Caenorhabditis elegans* unc-103-encoded erg-like K(+) channel. J. Neurogenet. 20, 41-66 (2006).

29. Y. Shinkai, Y. Yamamoto, M. Fujiwara, T. Tabata, T. Murayama, T. Hirotsu, D. D. Ikeda, M. Tsunozaki, Y. Iino, C. I. Bargmann, I. Katsura, T. Ishihara, Behavioral choice between conflicting alternatives is regulated by a receptor guanylyl cyclase, GCY-28, and a receptor tyrosine kinase, SCD-2, in AIA interneurons of *Caenorhabditis elegans*. J. Neurosci. 31, 3007-3015 (2011).

30. T. Nagai, S. Yamada, T. Tominaga, M. Ichikawa, A. Miyawaki, Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 10554-10559 (2004).

31. J. E. Richmond, W. S. Davis, E. M. Jorgensen, UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans*. Nat. Neurosci. 2, 959-964 (1999).

32. S. H. Chalasani, N. Chronis, M. Tsunozaki, J. M. Gray, D. Ramot, M. B. Goodman, C. I. Bargmann, Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans*. Nature 450, 63-70 (2007).

33. H. I. Ha, M. Hendricks, Y. Shen, C. V. Gabel, C. Fang-Yen, Y. Qin, D. Colon-Ramos, K. Shen, A. D. Samuel, Y. Zhang, Functional organization of a neural network for aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. Neuron 68, 1173-1186 (2010).

34. C. I. Bargmann, Comparative chemosensation from receptors to ecology. Nature 444, 295-301 (2006).

35. J. G. White, E. Southgate, J. N. Thomson, S. Brenner, The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 314, 1-340 (1986).

36. S. Brenner, The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 77, 71-94 (1974).

37. A. G. Fraser, R. S. Kamath, P. Zipperlen, M. Martinez-Campos, M. Sohrmann, J. Ahringer, Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. Nature 408, 325-330 (2000).

38. A. Solomon, S. Bandhakavi, S. Jabbar, R. Shah, G. J. Beitel, R. I. Morimoto, *Caenorhabditis elegans* OSR-1 regulates behavioral and physiological responses to hyperosmotic environments. Genetics 167, 161-170 (2004).

39. A. Lanjuin, M. K. VanHoven, C. I. Bargmann, J. K. Thompson, P. Sengupta, Otx/otd homeobox genes specify distinct sensory neuron identities in *C. elegans*. Dev. Cell 5, 621-633 (2003).

40. W. G. Bendena, J. R. Boudreau, T. Papanicolaou, M. Maltby, S. S. Tobe, I. D. Chin-Sang, A *Caenorhabditis elegans* allatostatin/galanin-like receptor NPR-9 inhibits local search behavior in response to feeding cues. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 1339-1342 (2008).

41. O. Hobert, I. Mori, Y. Yamashita, H. Honda, Y. Ohshima, Y. Liu, G. Ruvkun, Regulation of interneuron function in the *C. elegans* thermoregulatory pathway by the ttx-3 LIM homeobox gene. Neuron 19, 345-357 (1997).

42. E. L. Tsalik, T. Niacaris, A. S. Wenick, K. Pau, L. Avery, O. Hobert, LIM homeobox gene-dependent expression of biogenic amine receptors in restricted regions of the *C. elegans* nervous system. Dev. Biol. 263, 81-102 (2003).

43. O. Hobert, T. D'Alberti, Y. Liu, G. Ruvkun, Control of neural development and function in a thermoregulatory network by the LIM homeobox gene lin-11. J. Neurosci. 18, 2084-2096 (1998).

44. Z. Altun-Gultekin, Y. Andachi, E. L. Tsalik, D. Pilgrim, Y. Kohara, O. Hobert, A regulatory cascade of three homeobox genes, ceh-10, ttx-3 and ceh-23, controls cell fate specification of a defined interneuron class in *C. elegans*. 128, 1951-1969 (2001).

45. K. Roayaie, J. G. Crump, A. Sagasti, C. I. Bargmann, The G alpha protein ODR-3 mediates olfactory and nociceptive function and controls cilium morphogenesis in *C. elegans* olfactory neurons. Neuron 20, 55-67 (1998).

46. N. Chronis, M. Zimmer, C. I. Bargmann, Microfluidics for *in vivo* imaging of neuronal and behavioral activity in *Caenorhabditis elegans*. Nat. Methods 4, 727-731 (2007).

47. T. Uozumi, T. Hirotsu, K. Yoshida, R. Yamada A. Suzuki, G. Taniguchi, Y. Iino, T. Ishihara, Temporally-regulated quick activation and inactivation of Ras is important for olfactory behaviour. Sci. Rep. 2, 500 (2012).

[Descripción de los signos]

10: Parte de detección, 20: Parte de procesamiento, 30: Parte de almacenamiento, 40: Parte de preservación

110: Medios de cálculo, 120: Base de datos

[Texto libre de listado de secuencias]

5 SEQ ID NO: 1: ADN sintético
SEQ ID NO: 2: ADN sintético
SEQ ID NO: 3: ADN sintético
SEQ ID NO: 4: ADN sintético

10 Además, la presente especificación incluye el contenido de las especificaciones de la Solicitud de Patente Japonesa No. 2013-255145 (presentada el 10 de diciembre de 2013) y la Patente de los Estados Unidos No. 61/982,341 (presentada el 22 de abril de 2014), basándose en que la presente solicitud reivindica prioridades.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Kyushu University
<120> Un método para detectar un cáncer usando el sentido olfativo de nematodo
<130> G1264WO
20 <150> JP2013-255145
<151> 10-12-2013
<150> US61/982.341
<151> 22-04-2014
25 <160> 5
<170> PatentIn versión 3.5
30 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
35 <220>
<223> ADN sintético
<400> 1
40 ggcgccgata taattgctaa 20
<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
45 <220>
<223> ADN sintético
<400> 2
50 ctgctgcggtt ttcgtatca 20
<210> 3
<211> 31
<212> ADN
55 <213> Artificial
<220>
<223> ADN sintético
60 <400> 3
gagagctagc aaaaaatgcc tgcaggtcca c 31
<210> 4
65 <211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

ES 2 707 977 T3

	<220>	
	<223> ADN sintético	
5	<400> 4 gagaggtacc ttattgaatt ctcggttg	28
	<210> 5	
	<211> 341	
	<212> PRT	
10	<213> Caenorhabditis elegans	
	<400> 5	

ES 2 707 977 T3

Met	Pro	Ala	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Ser	Ile	Pro	Thr	Tyr	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Leu	Thr	Leu	His	Ile	Ile	Gly	Gly	Ile	Ser	Ile	Pro	Ile	Asn	Leu	Ile
			20					25					30		
Gly	Phe	Tyr	Leu	Val	Trp	Phe	Gln	Ser	Pro	Lys	Met	Gln	Gly	Tyr	Lys
		35					40					45			
Tyr	Cys	Leu	Cys	Tyr	Leu	Gln	Leu	Val	Ser	Phe	Ile	Ala	Glu	Ile	Glu
	50					55					60				
Met	Ile	Phe	Ile	Cys	Pro	Ala	Phe	Tyr	Phe	Phe	Pro	Leu	Ile	Gly	Gly
65					70					75					80
Phe	Asn	Val	Gly	Ala	Asp	Ile	Ile	Ala	Asn	Asn	Ile	Ser	Ser	His	His
				85					90					95	
Thr	Met	Thr	Leu	Tyr	Val	Phe	Val	Phe	Thr	Phe	Glu	Leu	Pro	Ser	Thr
			100					105					110		
Leu	Leu	Cys	Phe	Ile	Phe	Arg	His	Asn	Ala	Ala	Gly	Lys	Val	Asp	Gln
		115					120					125			
Lys	Cys	Phe	Ser	Ser	Lys	Tyr	Leu	Lys	Lys	Phe	Ser	Leu	Val	Leu	Ala
	130					135					140				
His	Phe	Leu	Pro	Phe	Val	Thr	Ala	Phe	Cys	Phe	Trp	Asn	Ser	Arg	Leu
145					150					155					160
Thr	Ala	Lys	Glu	Arg	Met	Asp	Leu	Val	Met	Asn	Asn	Trp	Pro	Gln	Cys
				165					170					175	
Ala	His	Trp	Leu	Lys	Phe	Pro	Ala	Phe	Glu	Val	Tyr	Asp	Tyr	His	Leu
			180					185					190		
Asn	Pro	Trp	Leu	Ala	Val	Val	Gly	Ile	Gly	Ala	Phe	Phe	Val	Leu	Phe
		195					200					205			
Met	Val	Phe	Ser	Tyr	Cys	Ile	Phe	Leu	Gly	Val	Gln	Thr	Leu	Leu	Ile

ES 2 707 977 T3

210		215		220
Leu Gln Gln His Arg Lys Ser Met Ser Arg Gln Thr Tyr Gln Ala His				
225		230		235
				240
Lys Asn Ala Leu Phe Arg Leu Val Met Gln Ile Val Leu Pro Gly Val				
		245	250	255
Phe Ile Val Val Pro Leu Cys Ile Cys Met Phe Val Val Val Gln Gly				
	260		265	270
Asp Val His Leu Gln Glu Phe Ala Thr Asp Thr Met Phe Phe Val Ser				
	275		280	285
Ser His Ser Met Cys Ser Cys Ile Ile Met Ile Ile Ser Asn Pro Lys				
	290		295	300
Tyr Arg Ser Val Leu Arg Lys Lys Ile Leu Arg Ile Leu Gly Ile Ser				
305		310	315	320
Ala Lys Ser Lys Ser Asn Arg Arg Arg Gly Asn Thr Val Leu Pro Ser				
	325		330	335
Gln Pro Arg Ile Gln				
	340			

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para detectar cáncer, **caracterizado por** la detección de cáncer utilizando, como indicador, la reacción de los nematodos al olor de una sustancia relacionada con la biología derivada del sujeto o un producto procesado de la misma; en donde la sustancia relacionada con la biología o un producto procesado de la misma es una muestra biológica recolectada de un sujeto, o un producto procesado de la misma, en donde la muestra biológica es un fluido corporal, células, tejidos, sangre o espiración.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el nematodo es
 - (a) *Caenorhabditis elegans*; y/o
 - (b) un nematodo de tipo silvestre, un nematodo mutante o un nematodo transgénico.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde cuando el nematodo muestra una respuesta positiva al olor de la sustancia relacionada con la biología derivada del sujeto o un producto procesado de la misma, se determina que el sujeto tiene cáncer o tiene riesgo de padecer cáncer.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde cuando la respuesta de la neurona olfativa del nematodo es alta al olor de la sustancia relacionada con la biología derivada del sujeto o un producto procesado de la misma, se determina que el sujeto tiene cáncer o tiene riesgo de padecer cáncer.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la sustancia relacionada con la biología o un producto procesado de la misma es un fluido corporal tal como orina, células, tejidos, un cultivo de las células o tejidos, o una solución conservante de las células o tejidos tal como solución salina fisiológica.
6. Un método para identificar un receptor olfativo en nematodos, **caracterizado por** identificar un receptor olfativo usando nematodos; en donde se inhibe la expresión o función de un gen que codifica el receptor y se prueba la reacción del nematodo inhibido a un olor y, en donde
 - (a) el olor es el olor de los tipos de cáncer; y/o
 - (b) el tipo de receptor a identificar es diferente según los tipos de cáncer o la concentración de un odorante.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la expresión o función del gen receptor es inhibida por ARNi.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde el nematodo es *Caenorhabditis elegans*.
9. Un método para identificar tipos de cáncer, **caracterizado por** identificar tipos de cáncer utilizando, como indicador, la reacción de los nematodos al olor de una sustancia relacionada con la biología derivada del sujeto o un producto procesado de la misma; en donde el método comprende las siguientes etapas:
 - (a) detectar cáncer por el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
 - (b) probar la reacción de un nematodo modificado, que se ha preparado modificando un receptor identificado por el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, al olor de una muestra, que se ha detectado que tiene cáncer en la etapa (a) y
 - (c) determinar los tipos de cáncer correspondientes al receptor identificado como tipos de cáncer diana de la identificación cuando la reacción al olor es diferente entre el nematodo modificado y el nematodo utilizado en la etapa (a);
- en donde la sustancia relacionada con la biología o un producto procesado de la misma es una muestra biológica recolectada de un sujeto, o un producto procesado de la misma, en donde la muestra biológica es un fluido corporal, células, tejidos, sangre o espiración.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la modificación del receptor es al menos una seleccionada del grupo que consiste en la eliminación del receptor, la inhibición de la expresión o función del receptor y la alta expresión o alta funcionalización del receptor.
11. Uso de un kit para detectar o identificar cáncer, en el que el kit comprende nematodos.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el nematodo es:
 - (a) *Caenorhabditis elegans*; y/o
 - (b) un nematodo de tipo silvestre, un nematodo mutante o un nematodo transgénico.

13. Uso de un sistema para detectar cáncer, en donde el sistema comprende:

- un nematodo,
 - una parte de almacenamiento para almacenar una sustancia relacionada con la biología o un producto procesado de la misma y el nematodo, y
 - una parte de detección para detectar la reacción del nematodo a un olor en la parte de almacenamiento.
- 5

Figura 1

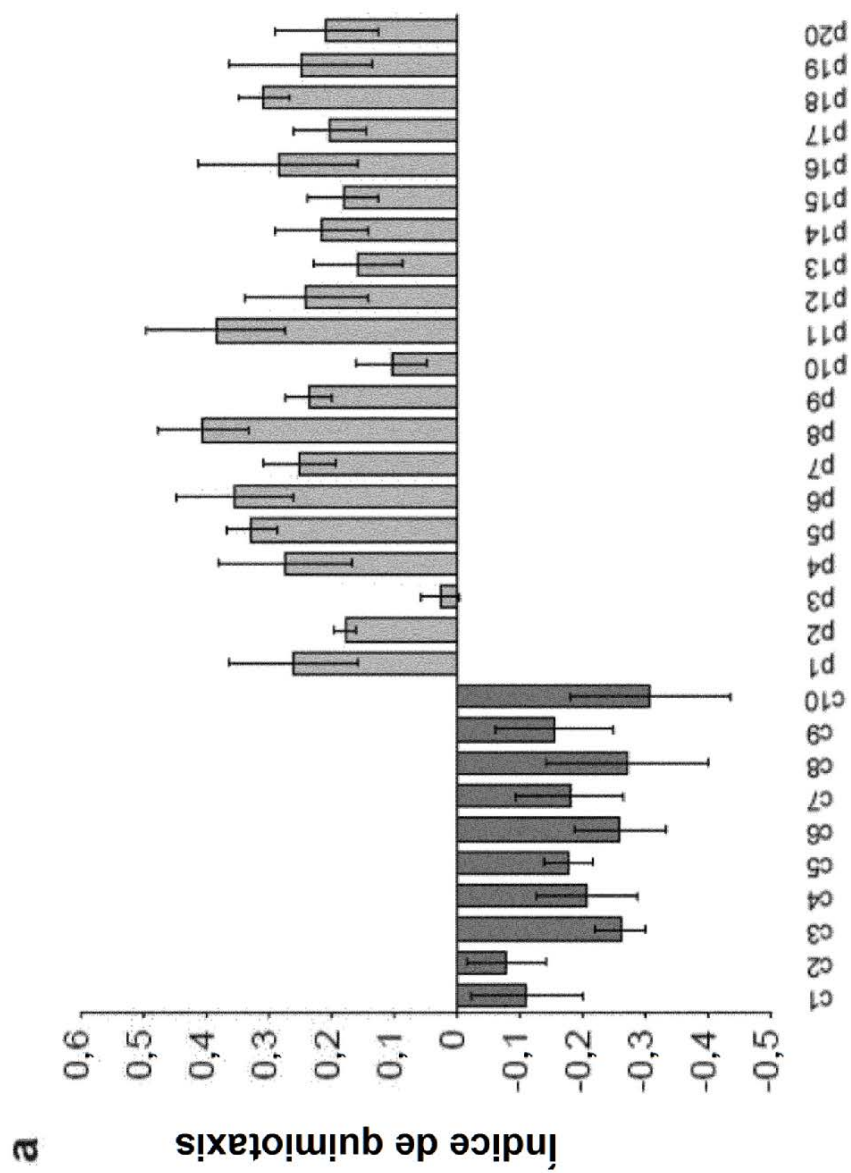


Figura 2

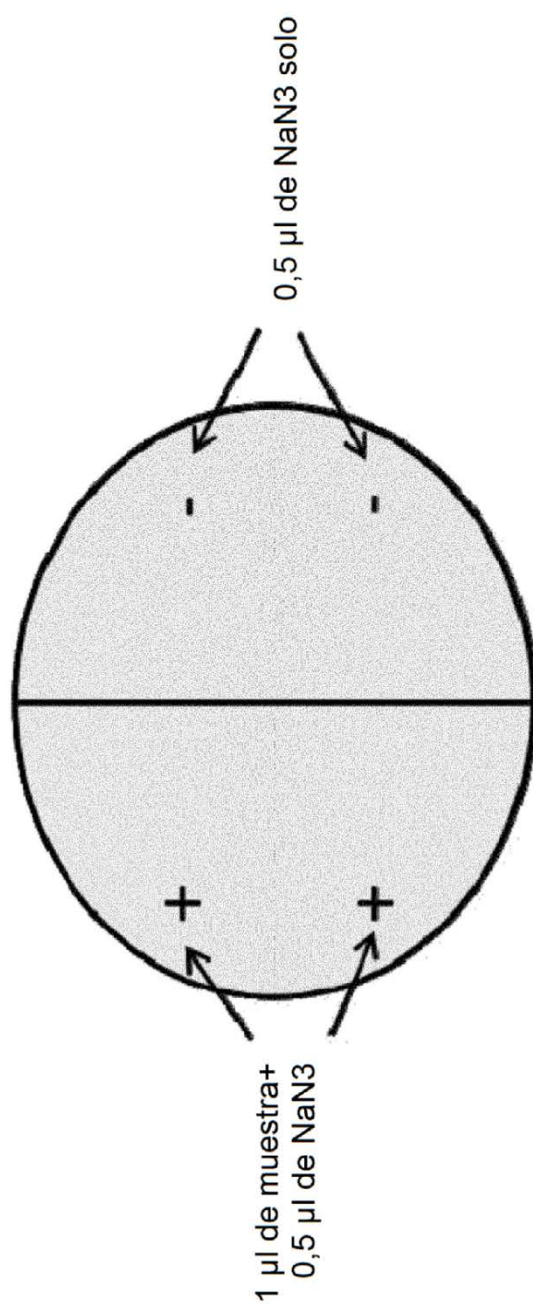


Figura 3

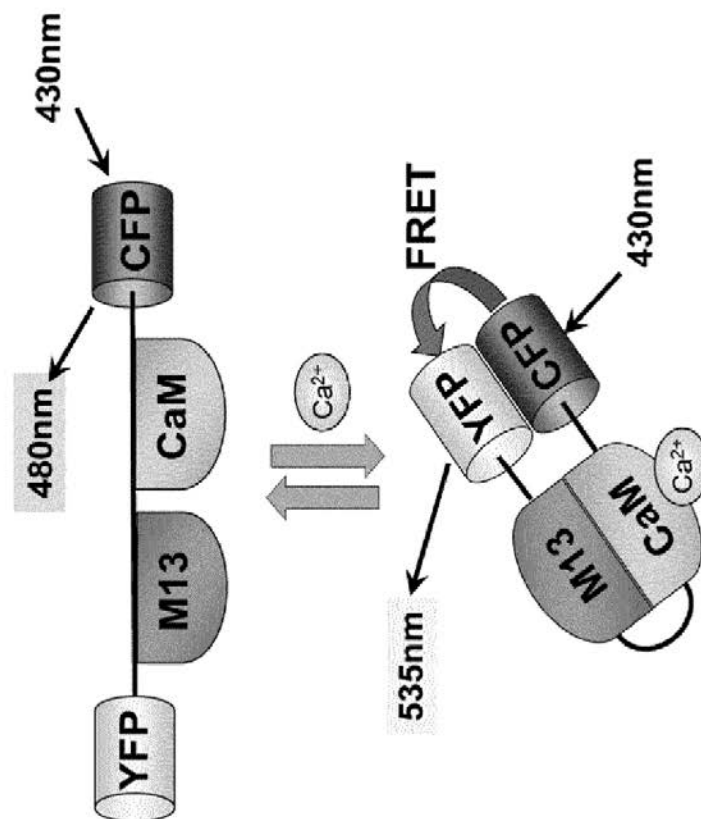


Figura 4

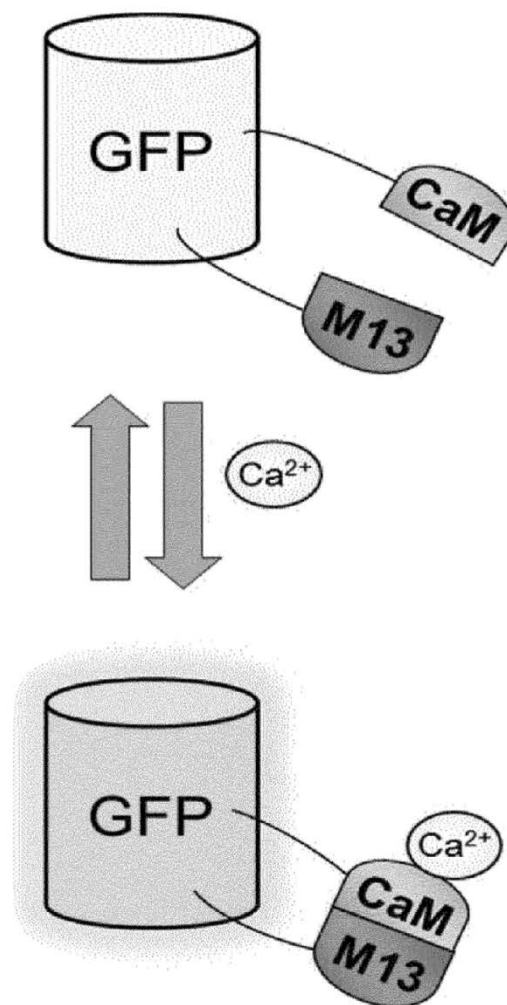


Figura 5

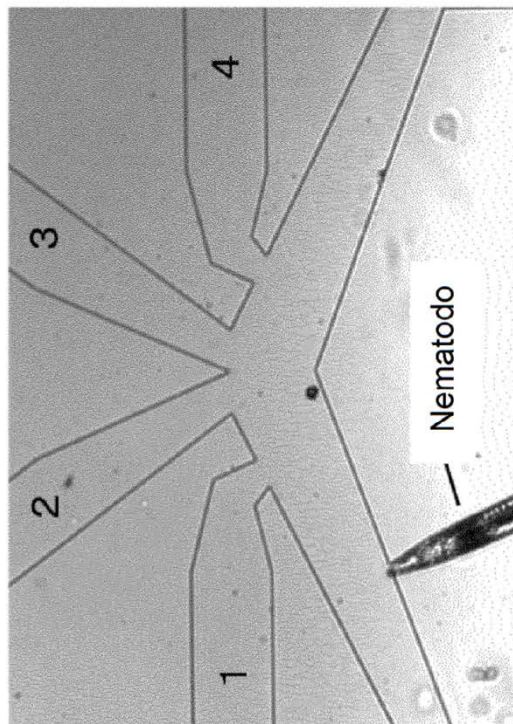


Figura 6

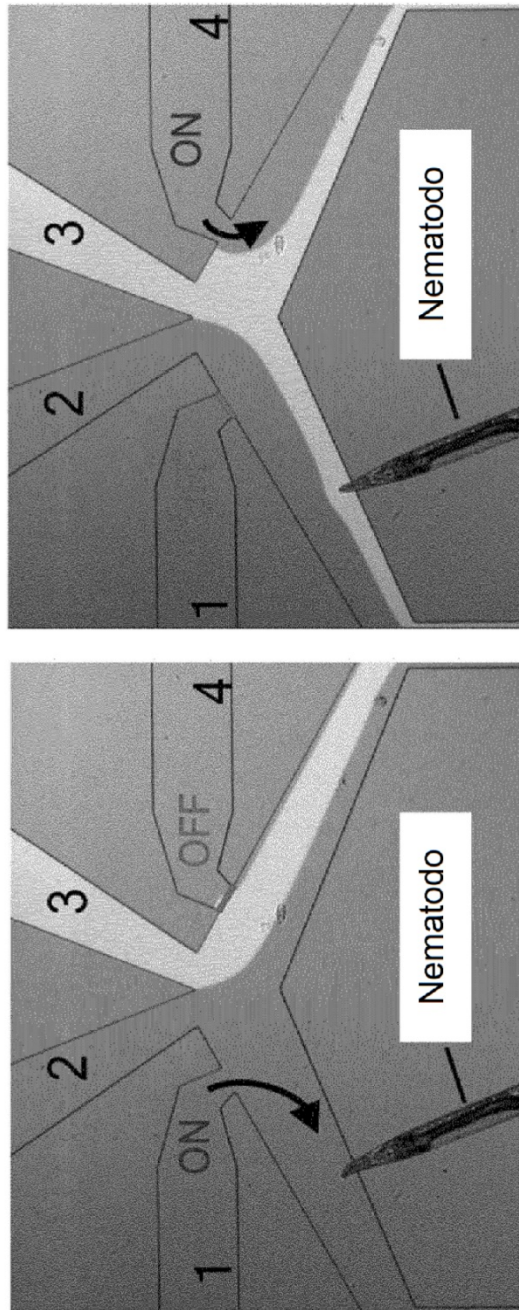


Figura 7

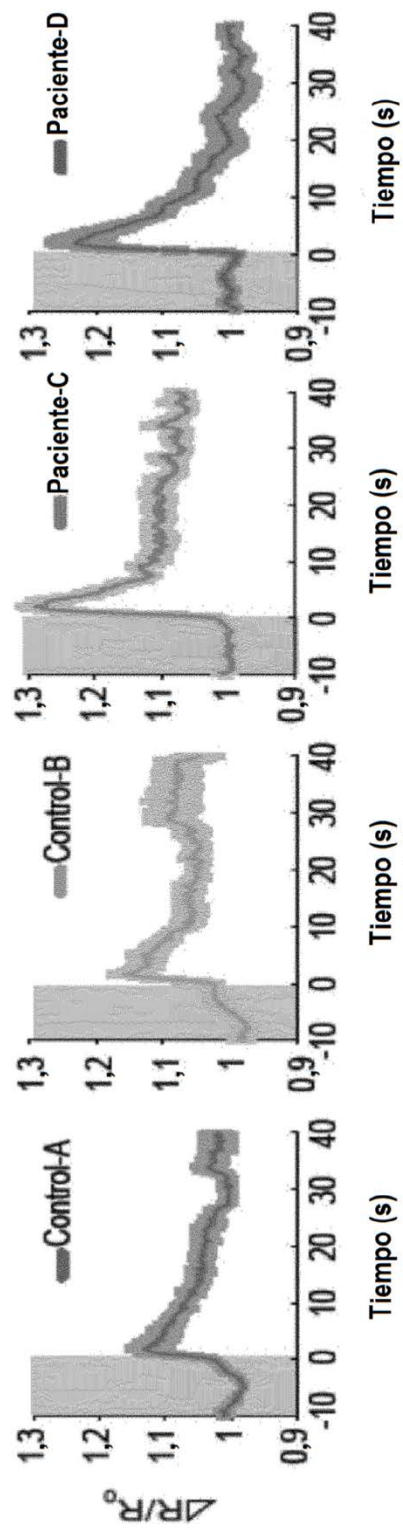


Figura 8

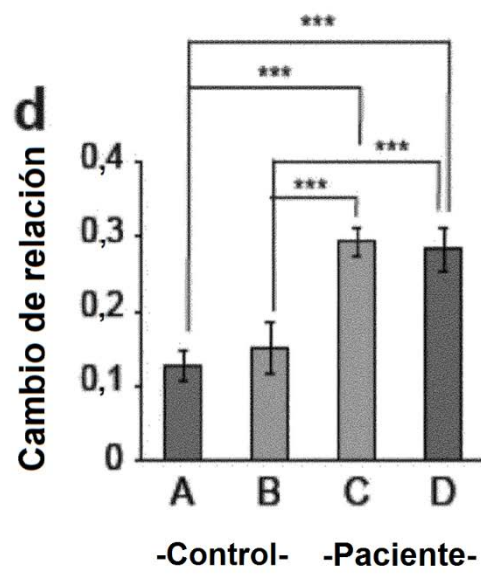


Figura 9

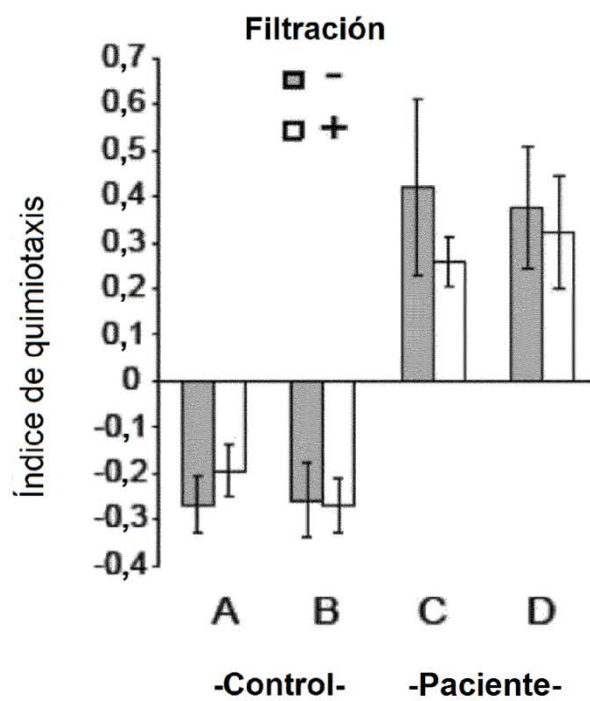


Figura 10

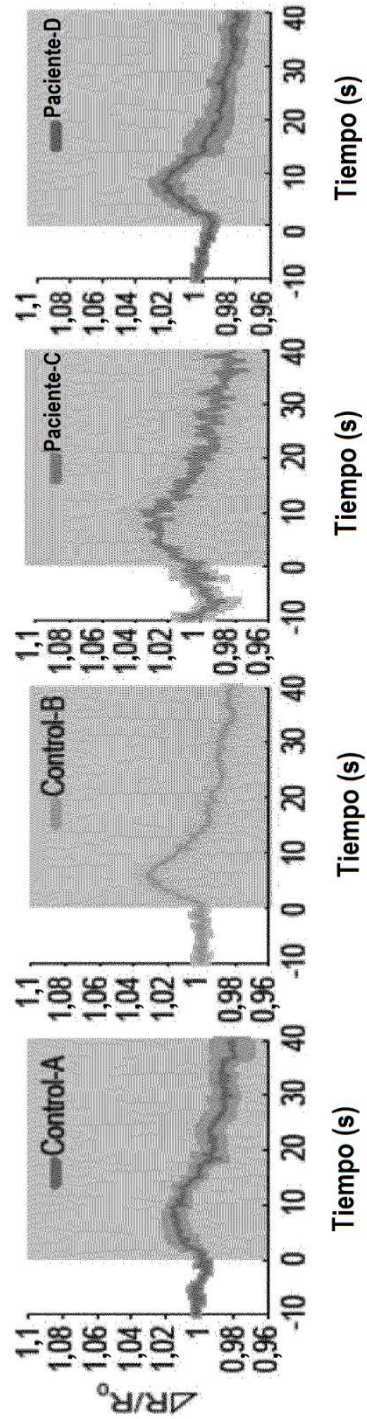


Figura 11

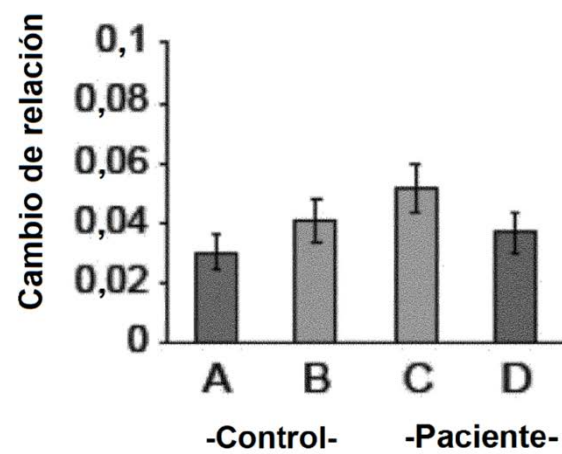


Figura 12

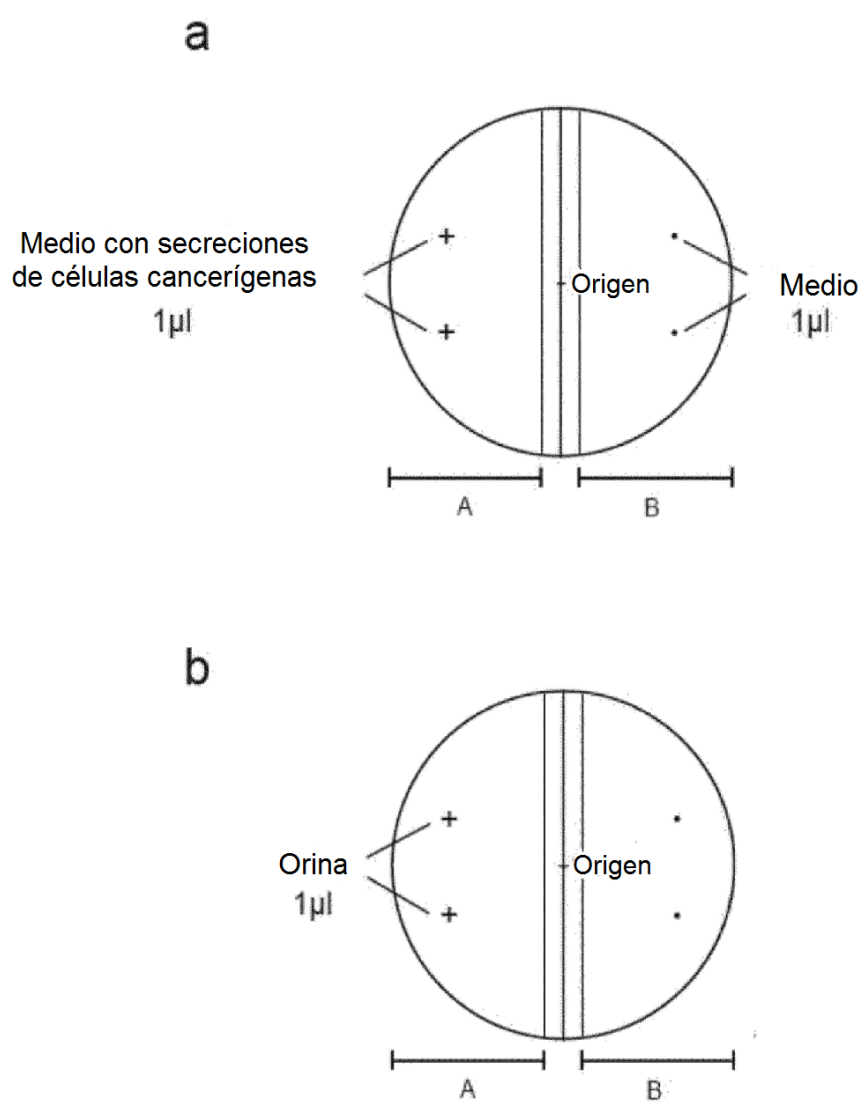


Figura 13

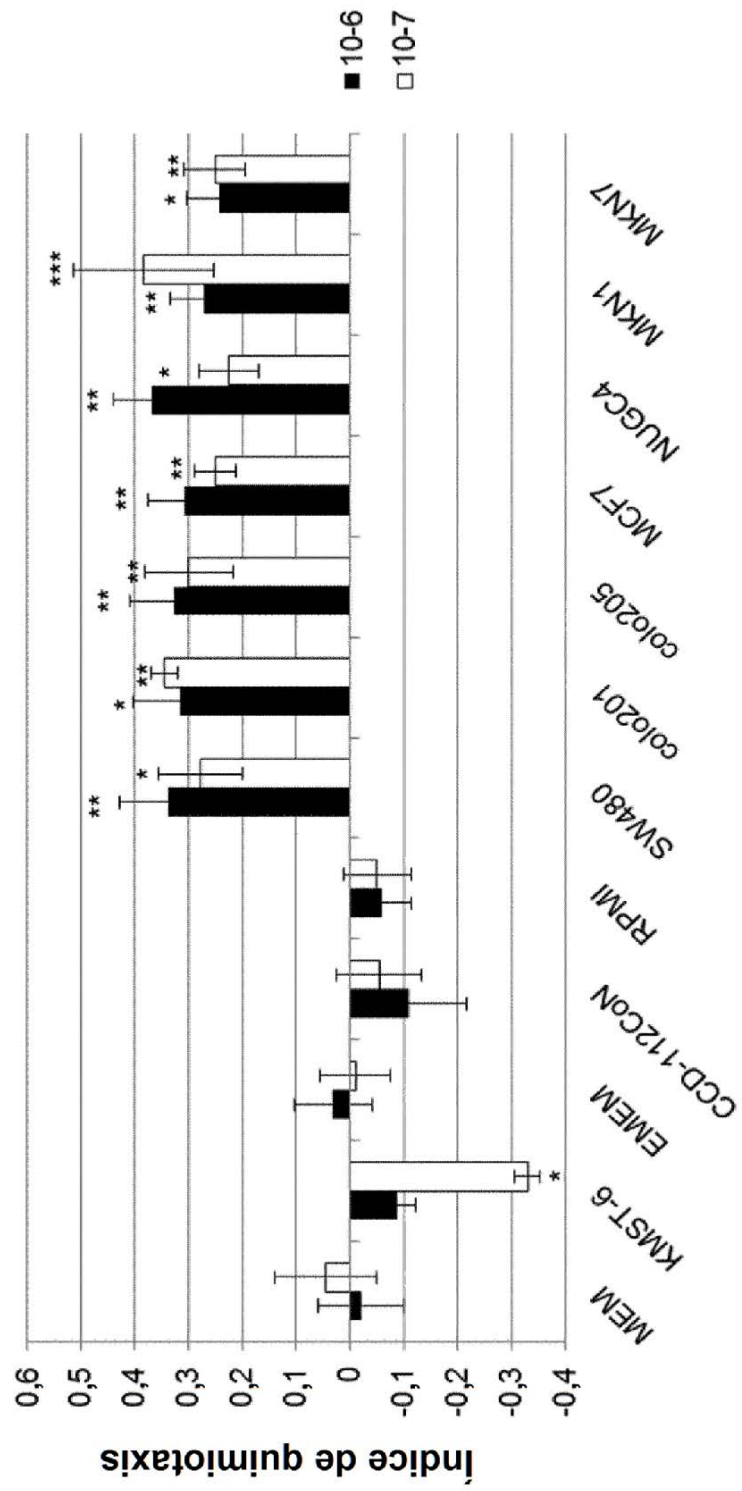


Figura 14

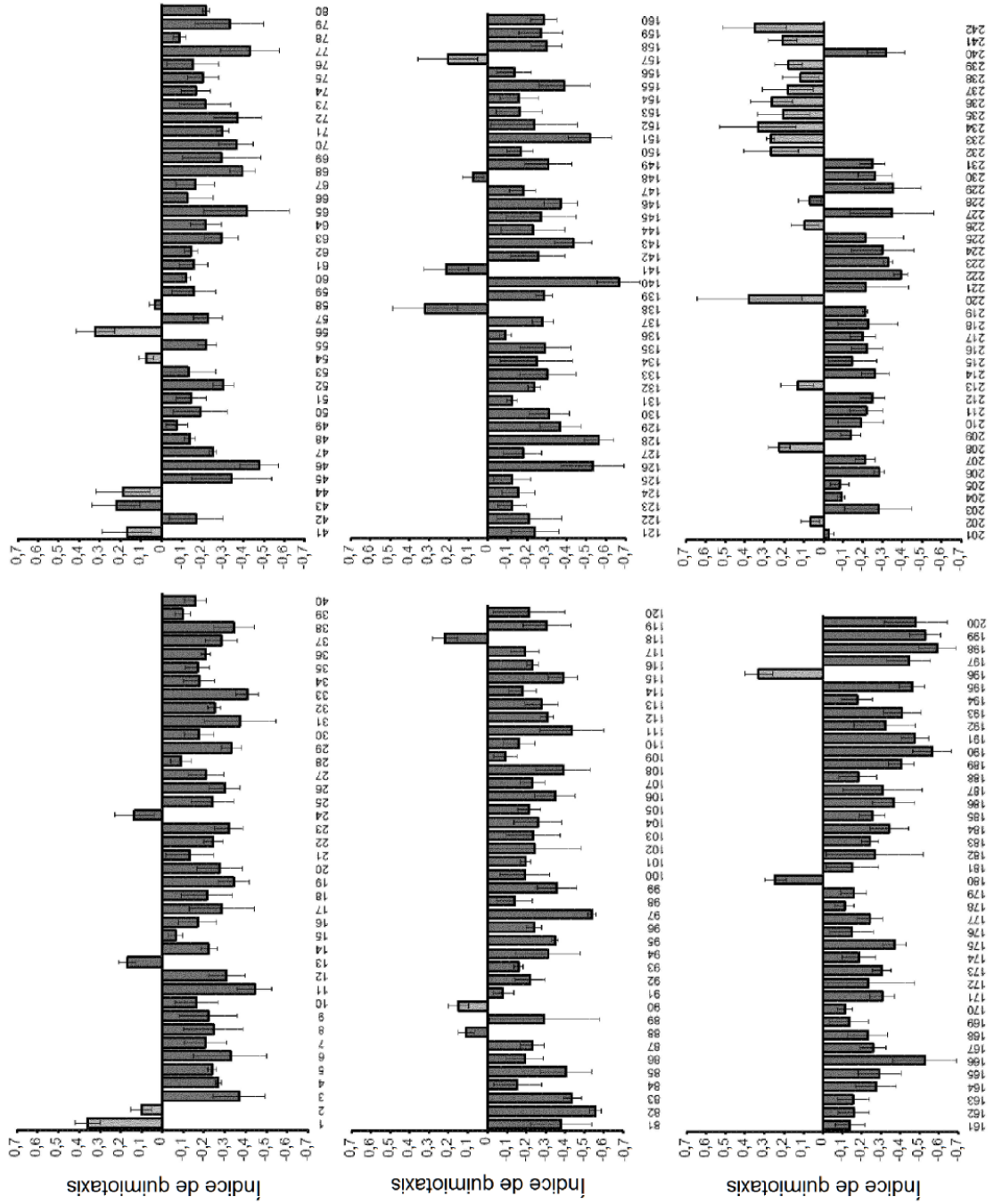


Figura 15

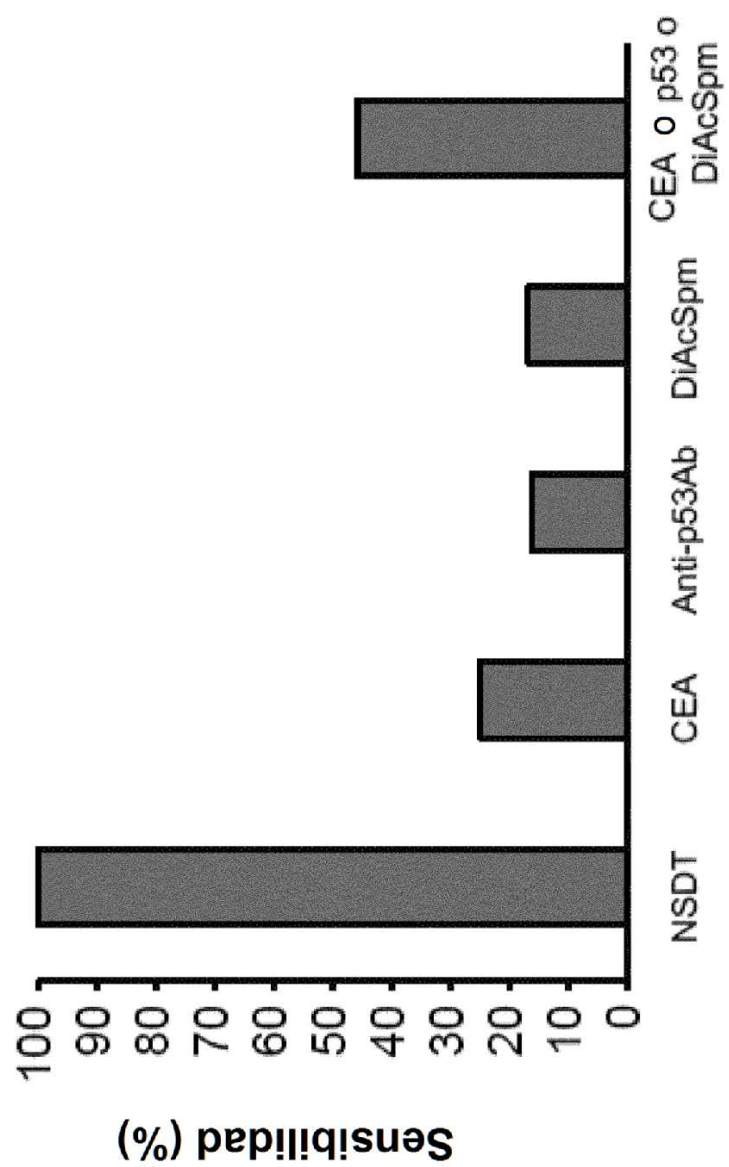


Figura 16A

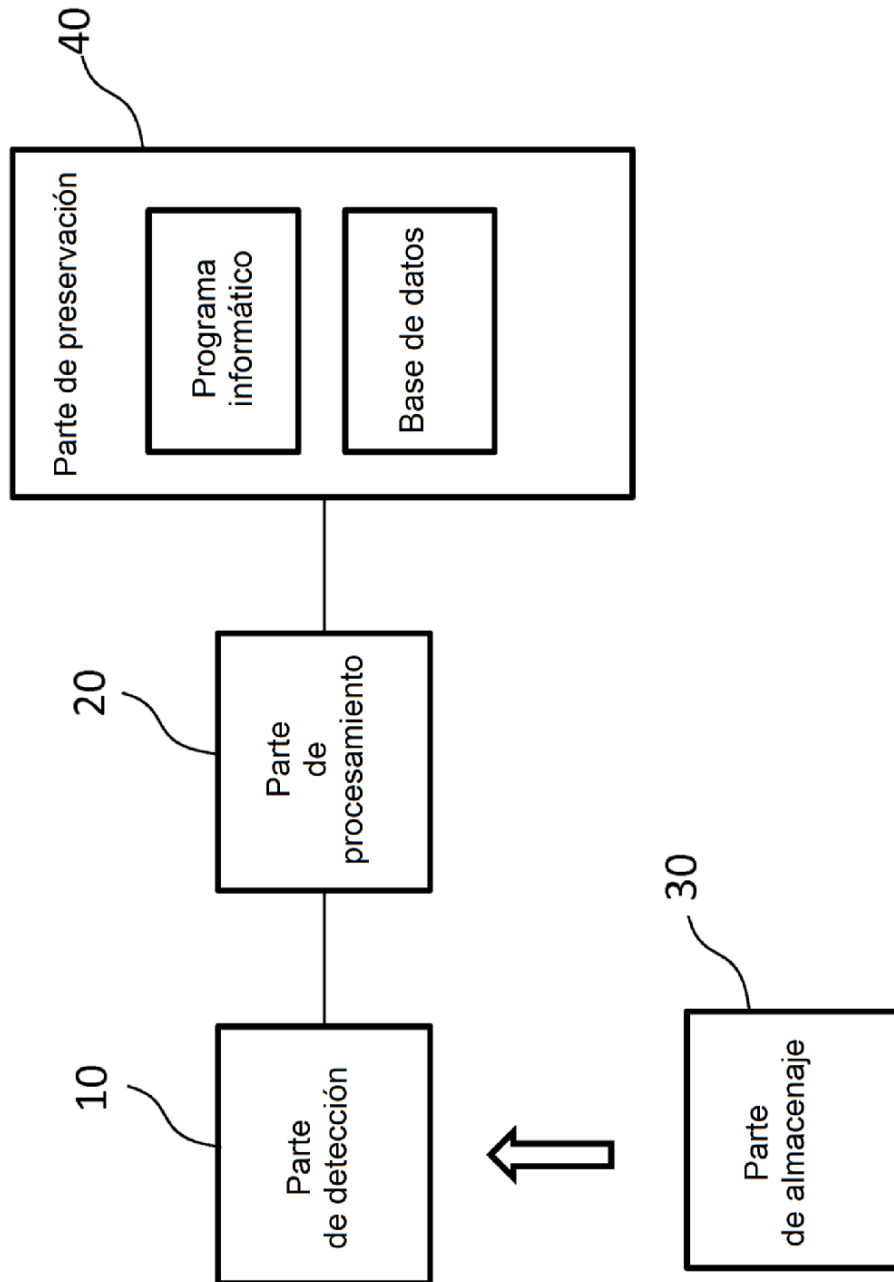


Figura 16B

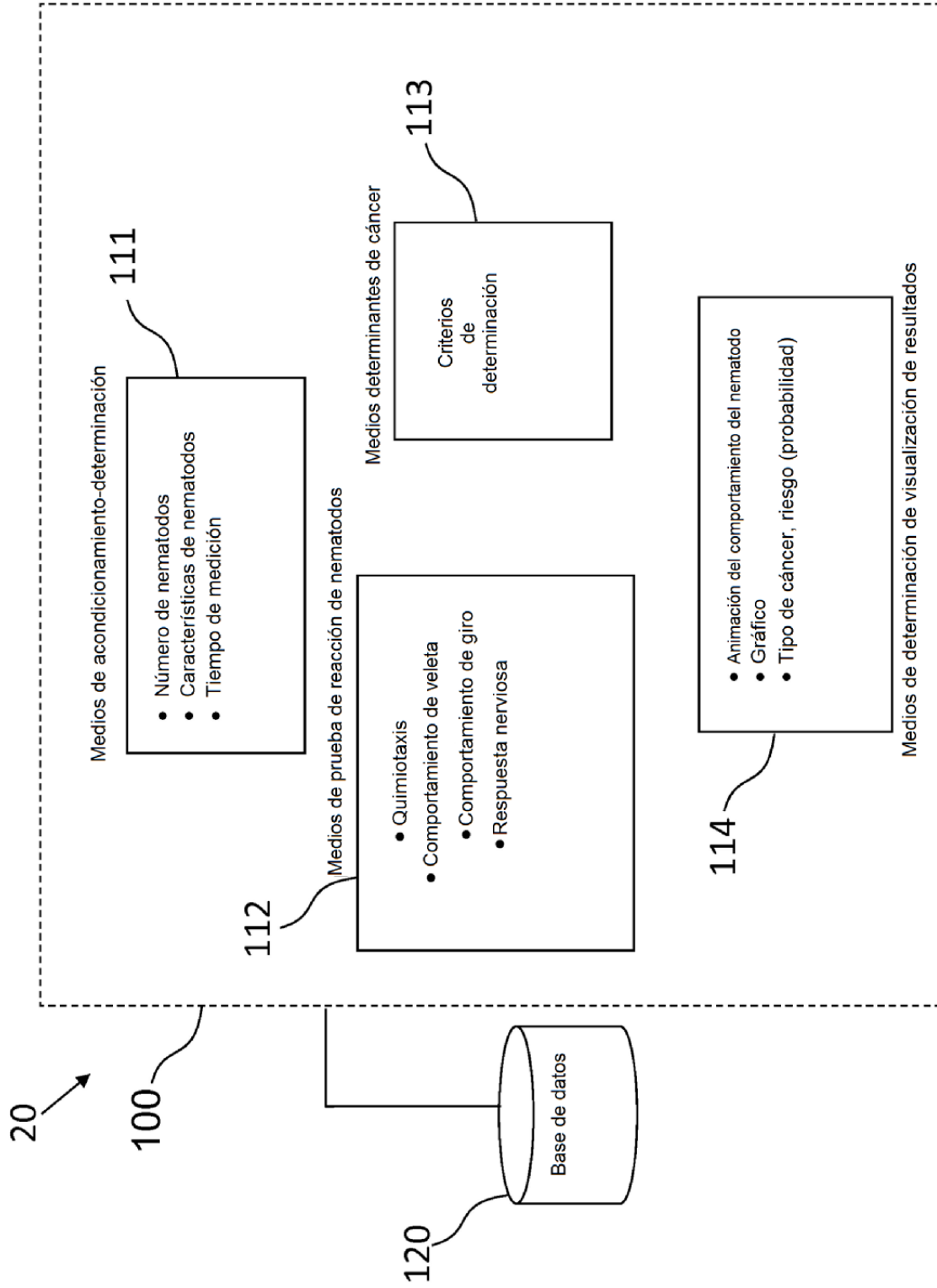


Figura 17

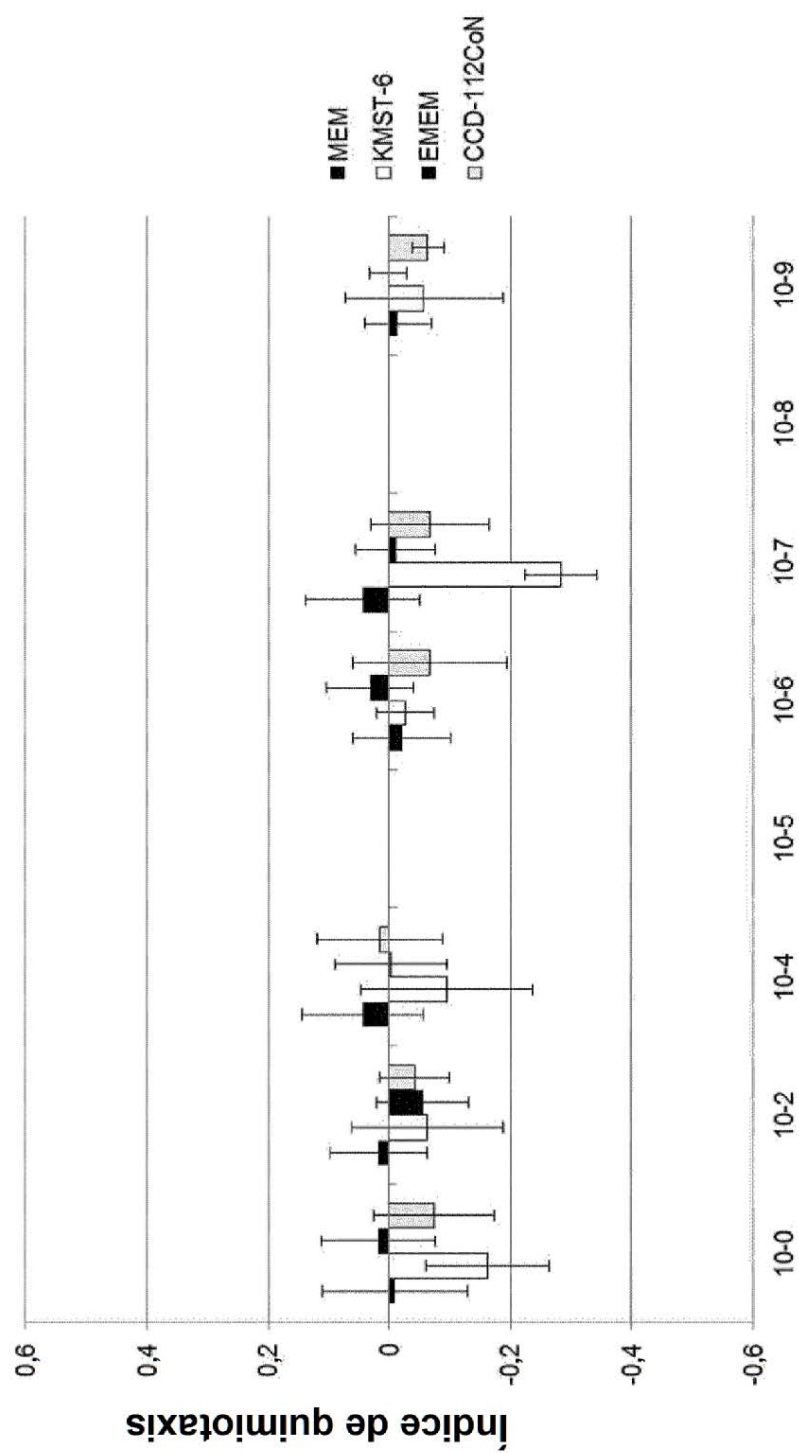


Figura 18

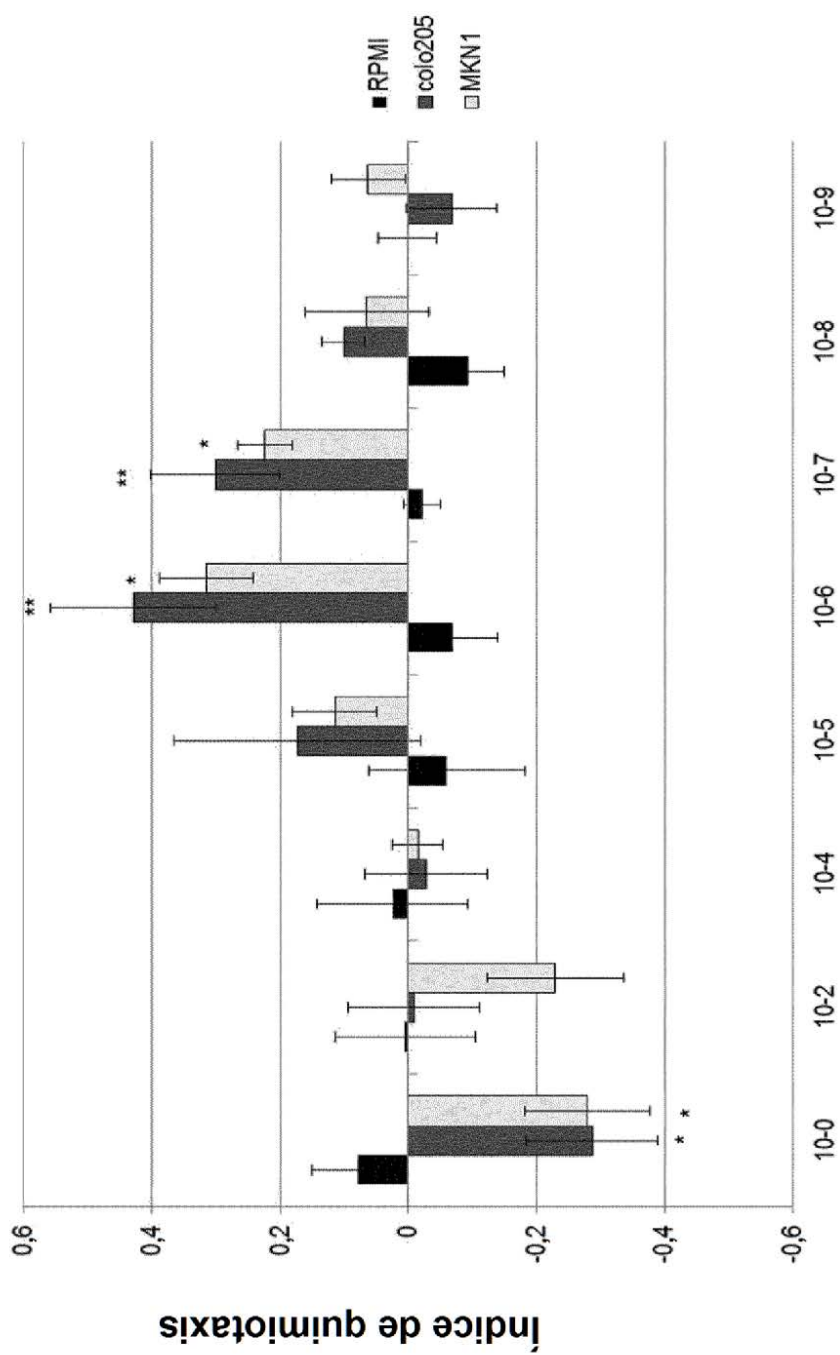


Figura 19

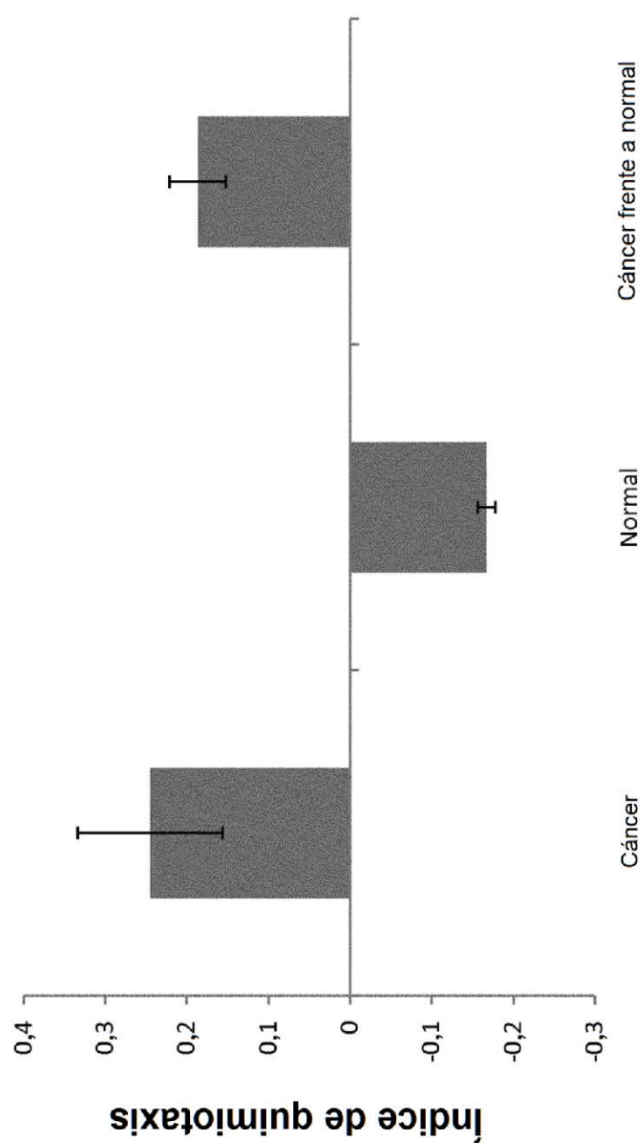


Figura 20

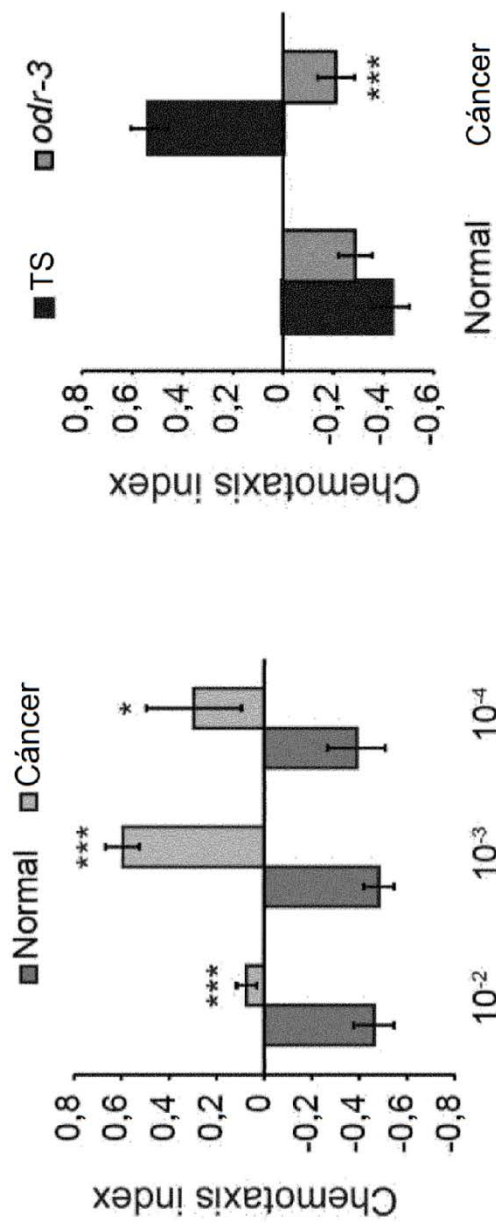


Figura 21

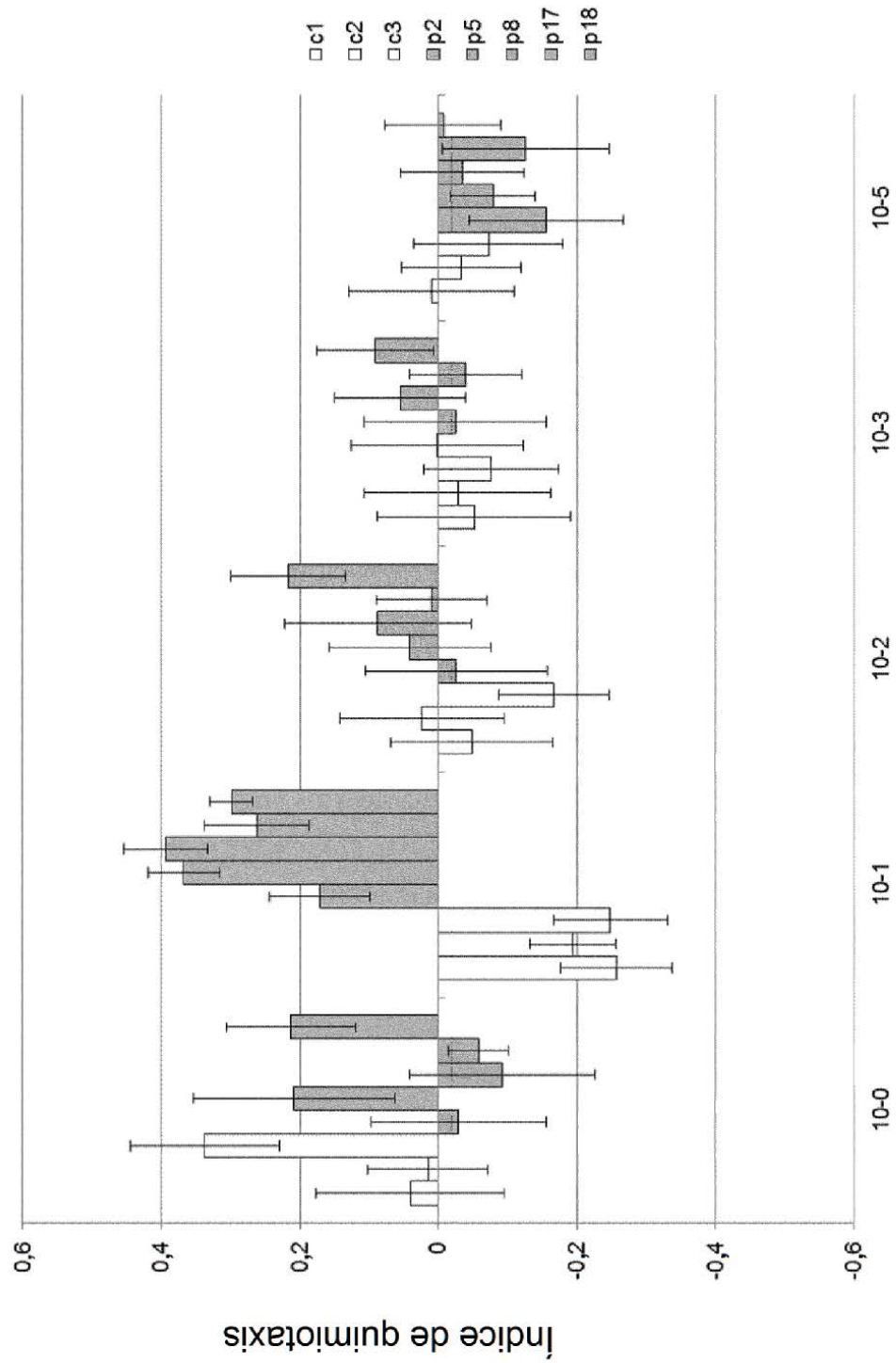
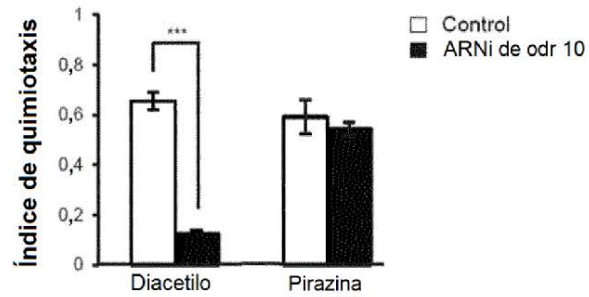


Figura 22**A****B**

Odorante	El número de genes candidatos
<i>Atrayentes</i>	
Alcohol isoamílico (Iaa)	21
Benzaldehído (Bz)	50
Butanona (Bu)	17
Pentanodiona (Pd)	39
Pirazina (Py)	56
Trimetiltiazol (Tmt)	22
<i>Repelentes</i>	
Nonanona (Nona)	4
Octanol (Oct)	10
Iaa elevado	1
Bz elevado	7
Diacetilo elevado (Da)	28

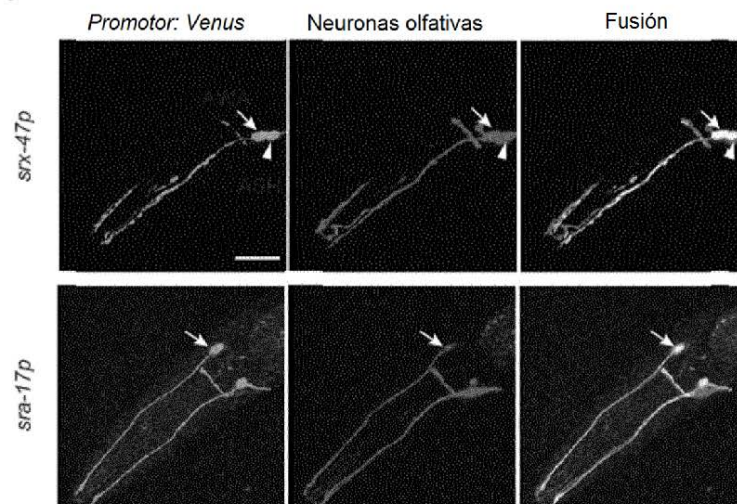
C

Figura 23

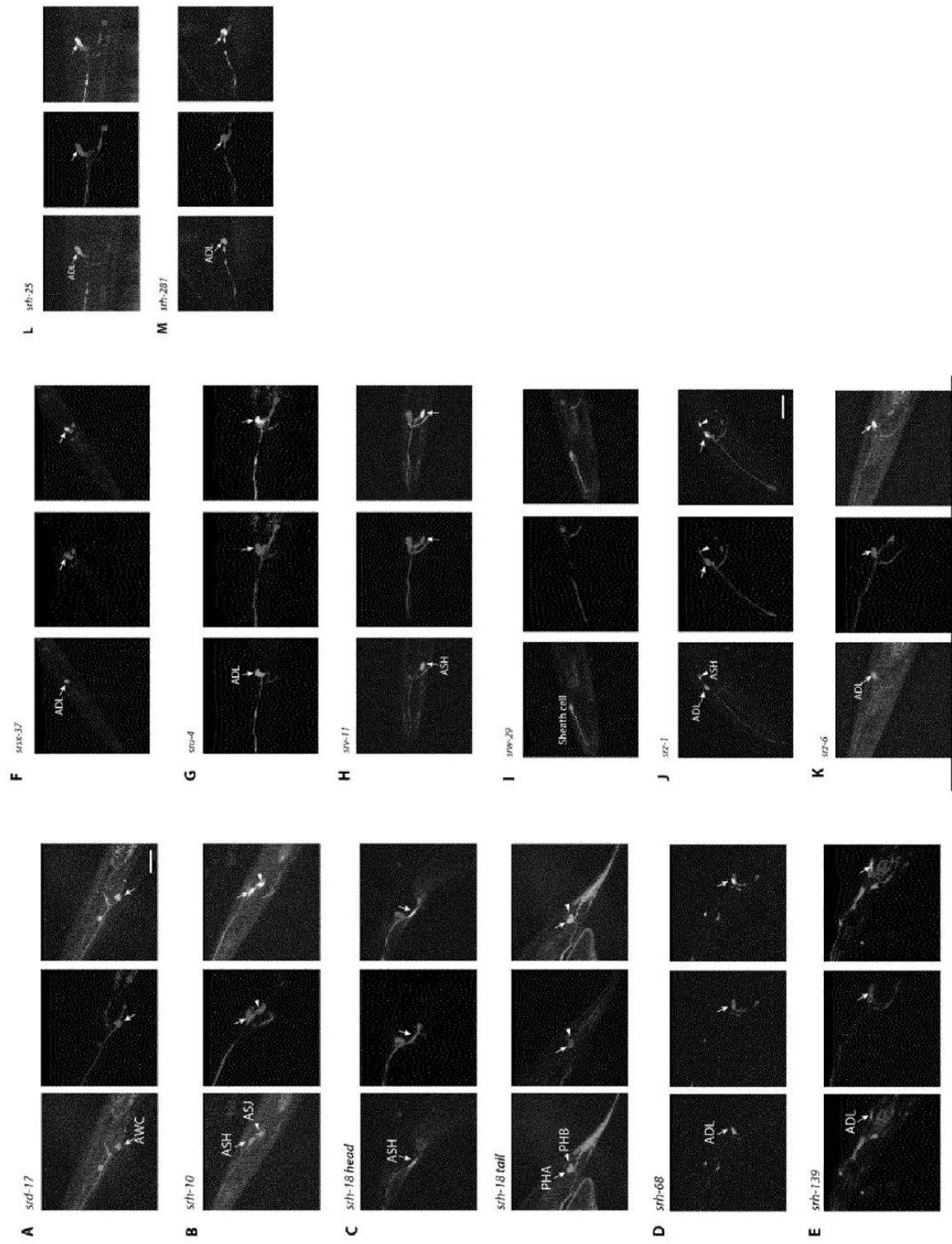


Figura 24

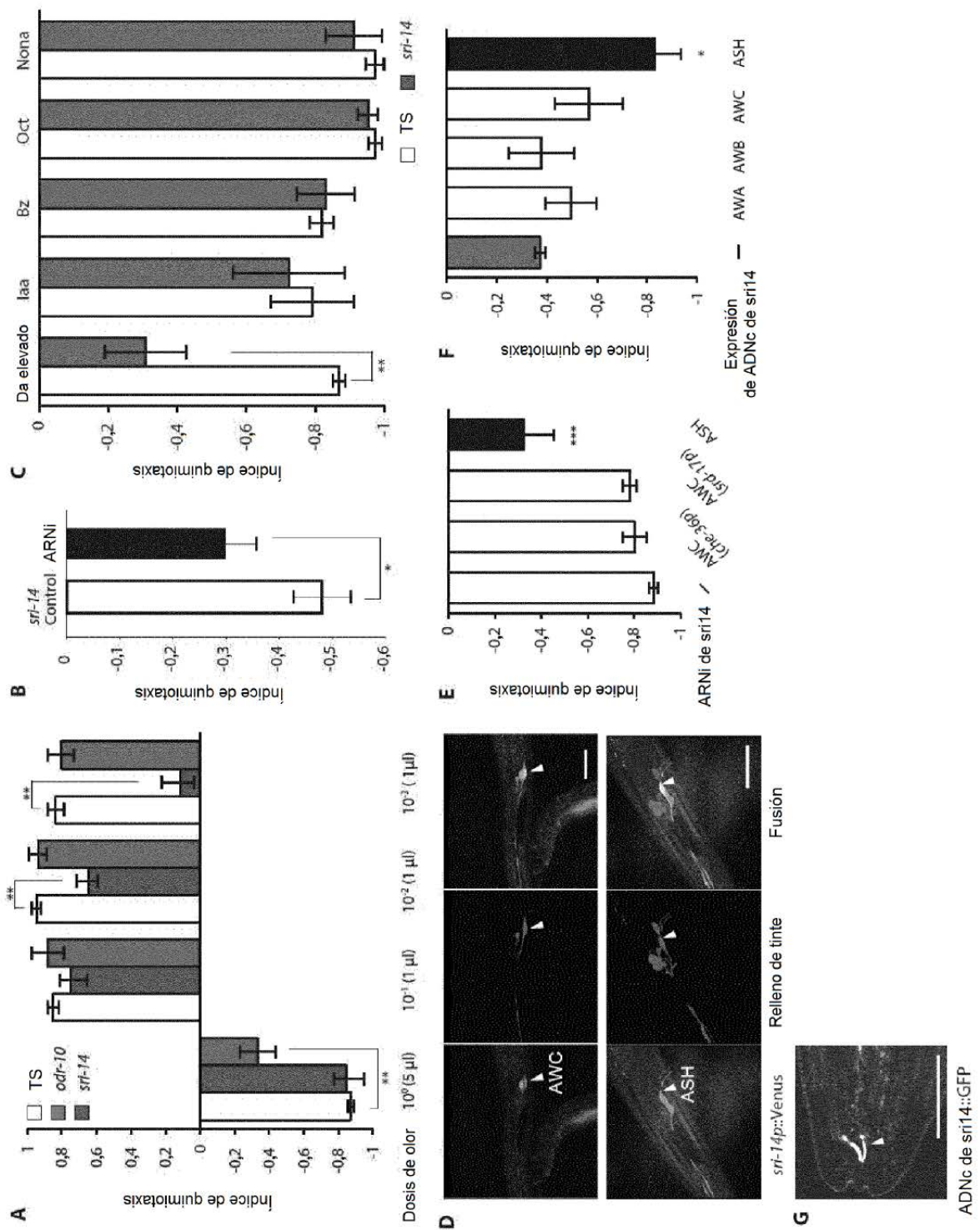


Figura 25

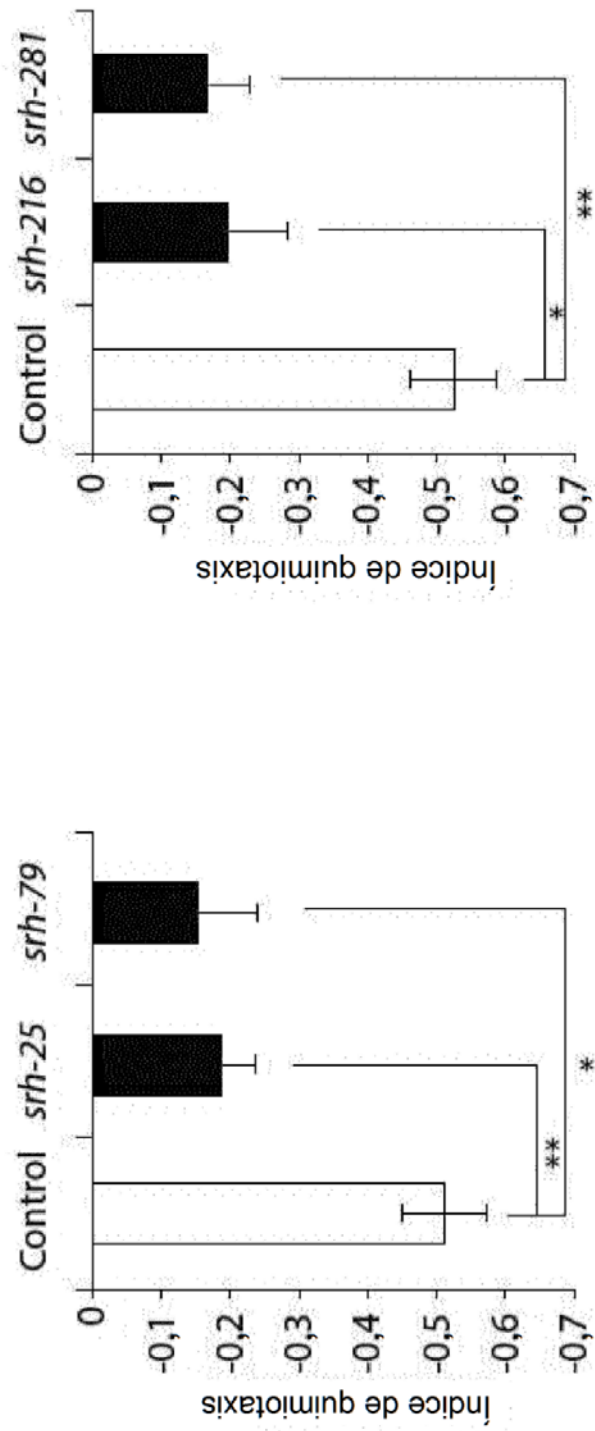


Figura 26

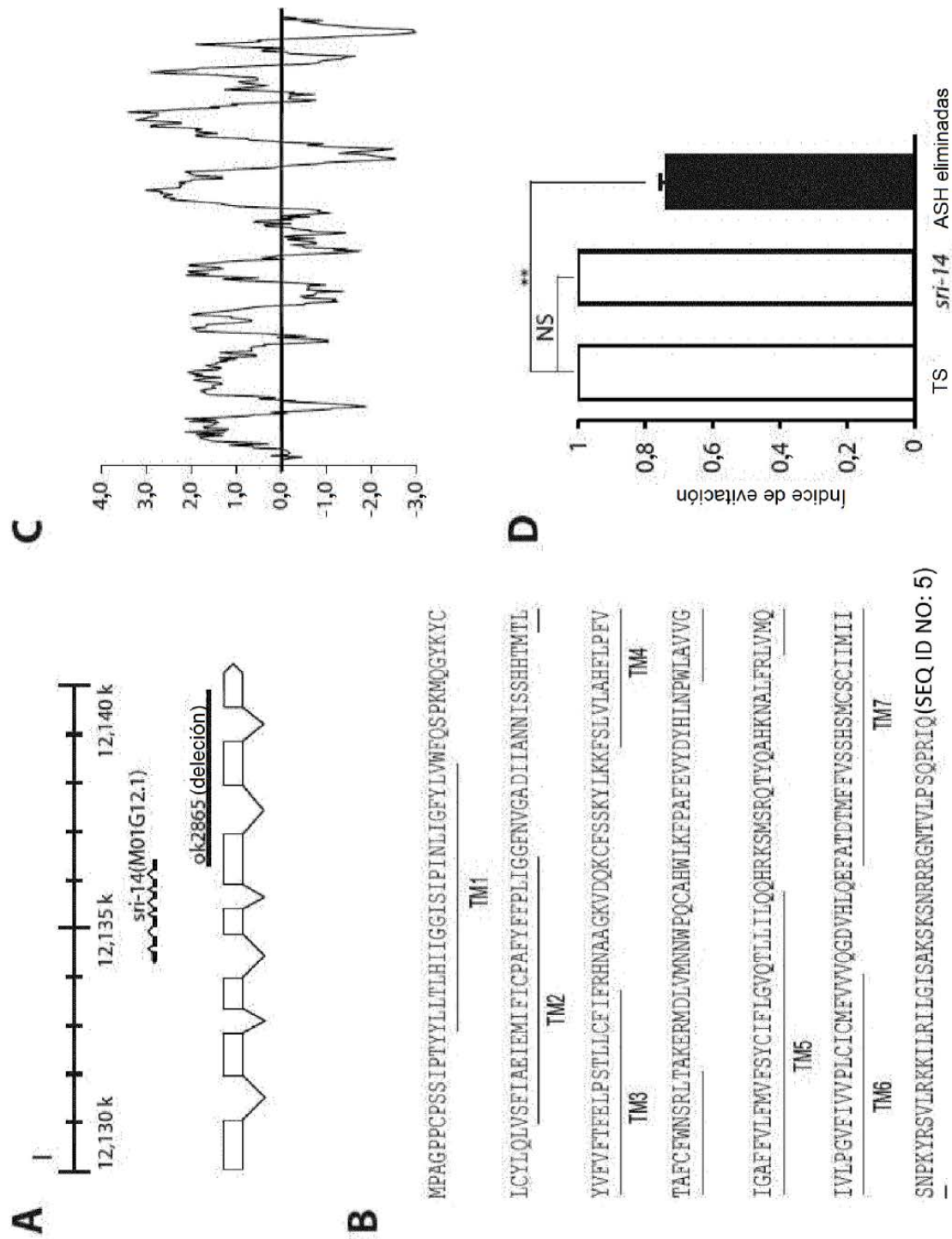


Figura 28

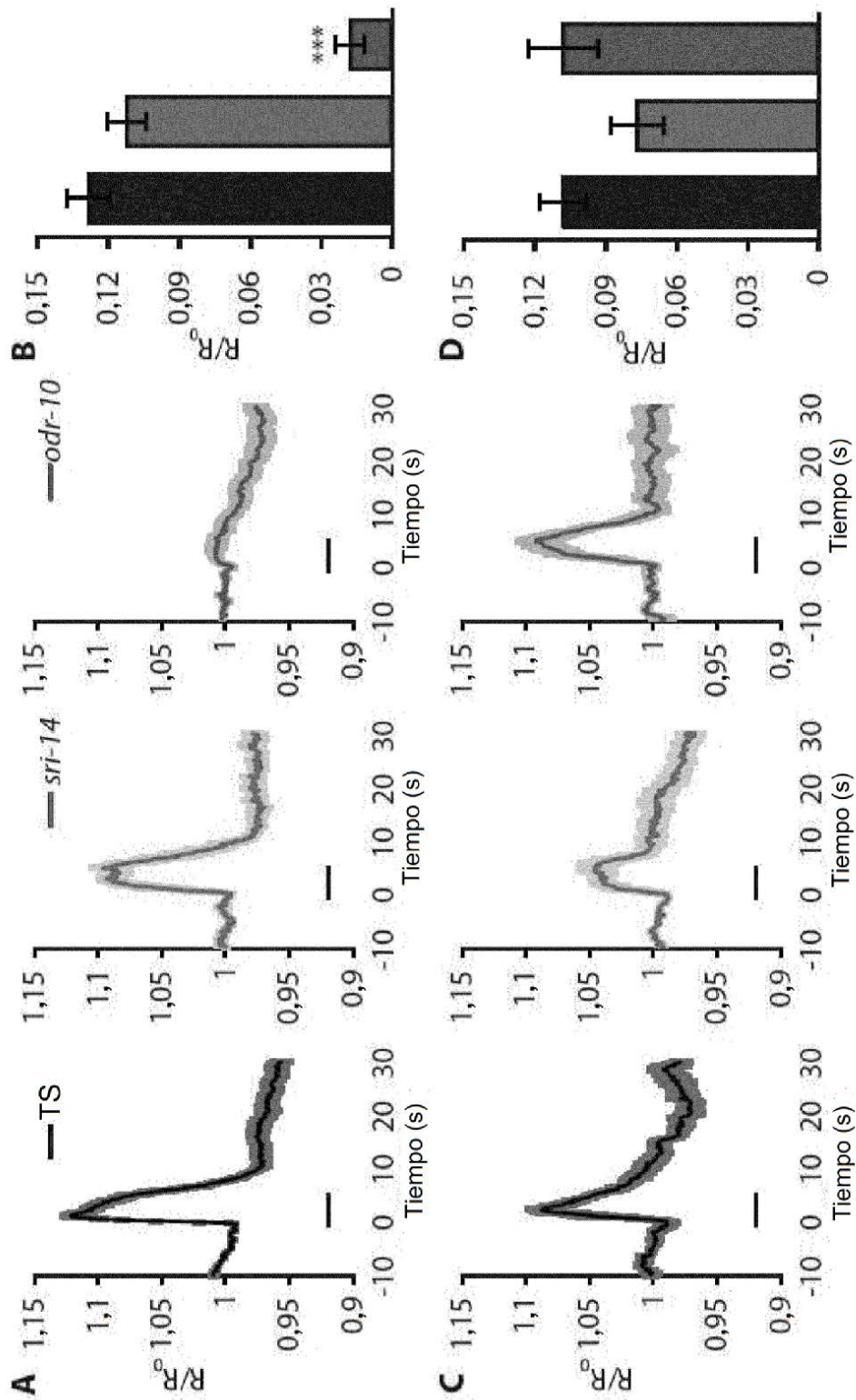


Figura 29

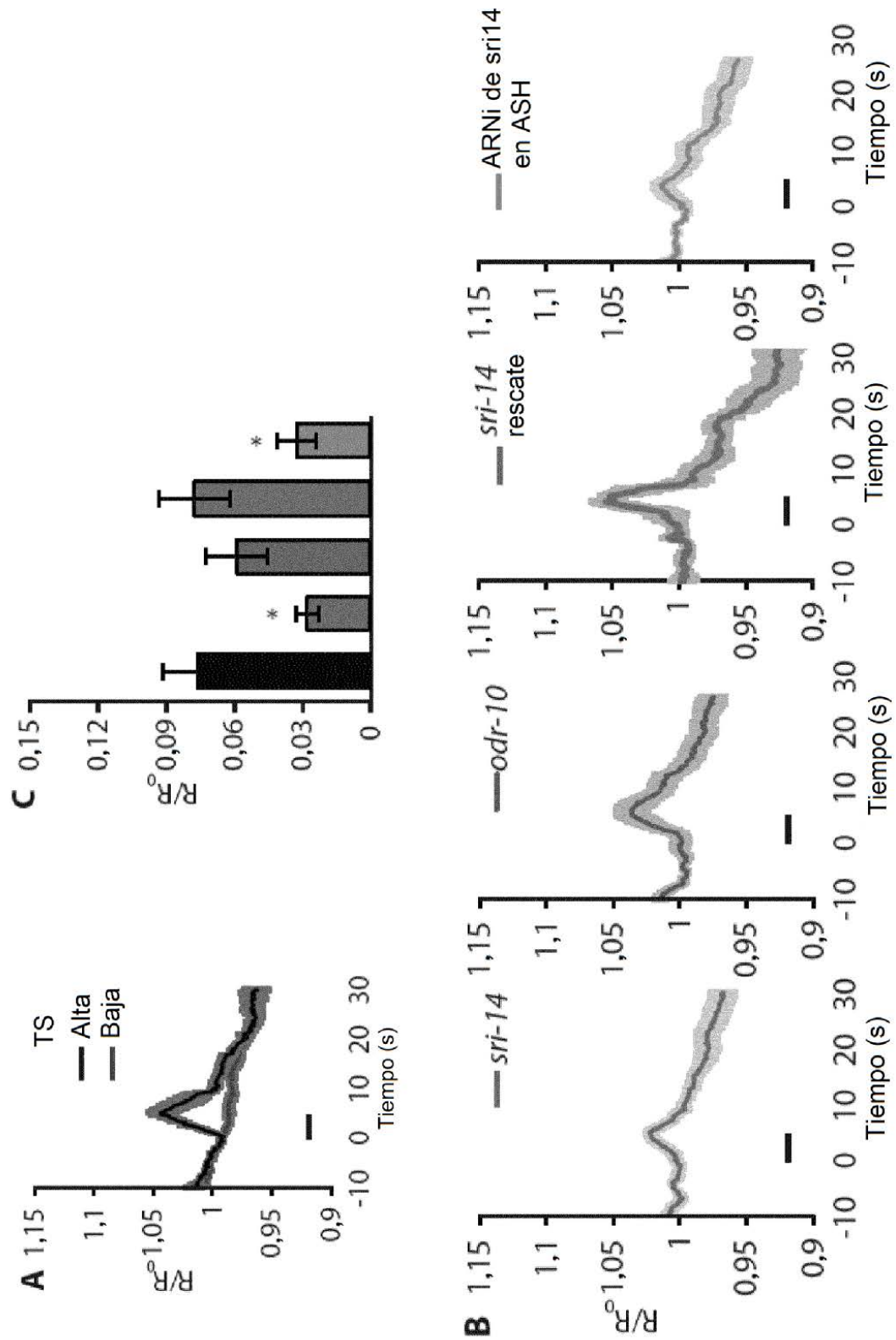


Figura 30

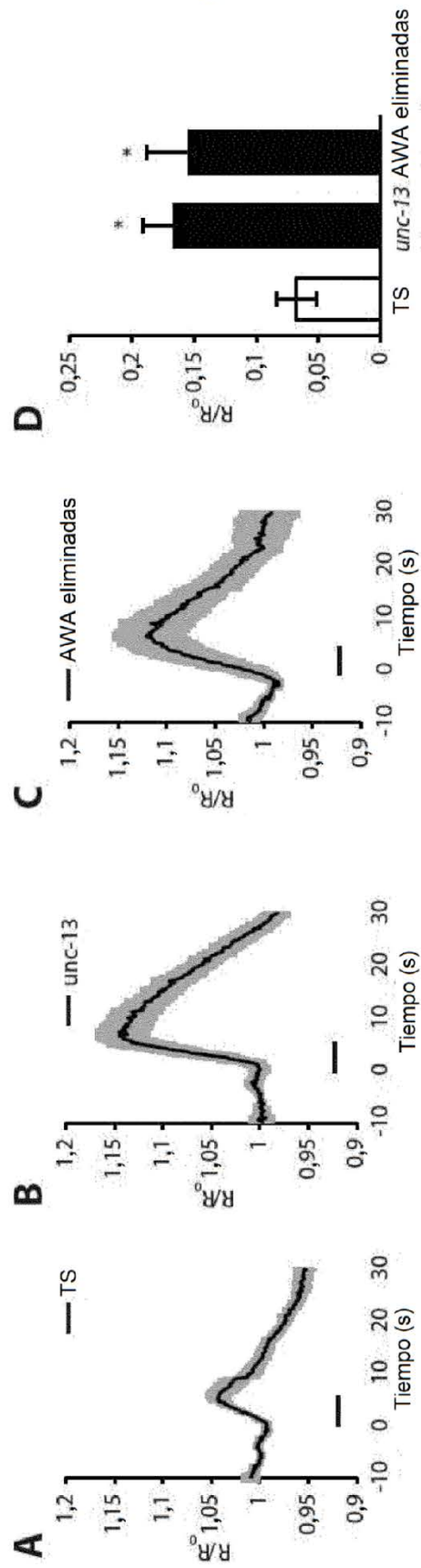


Figura 31

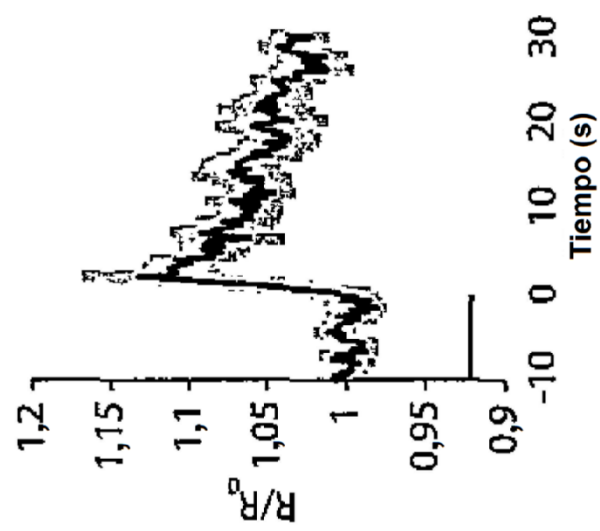


Figura 32

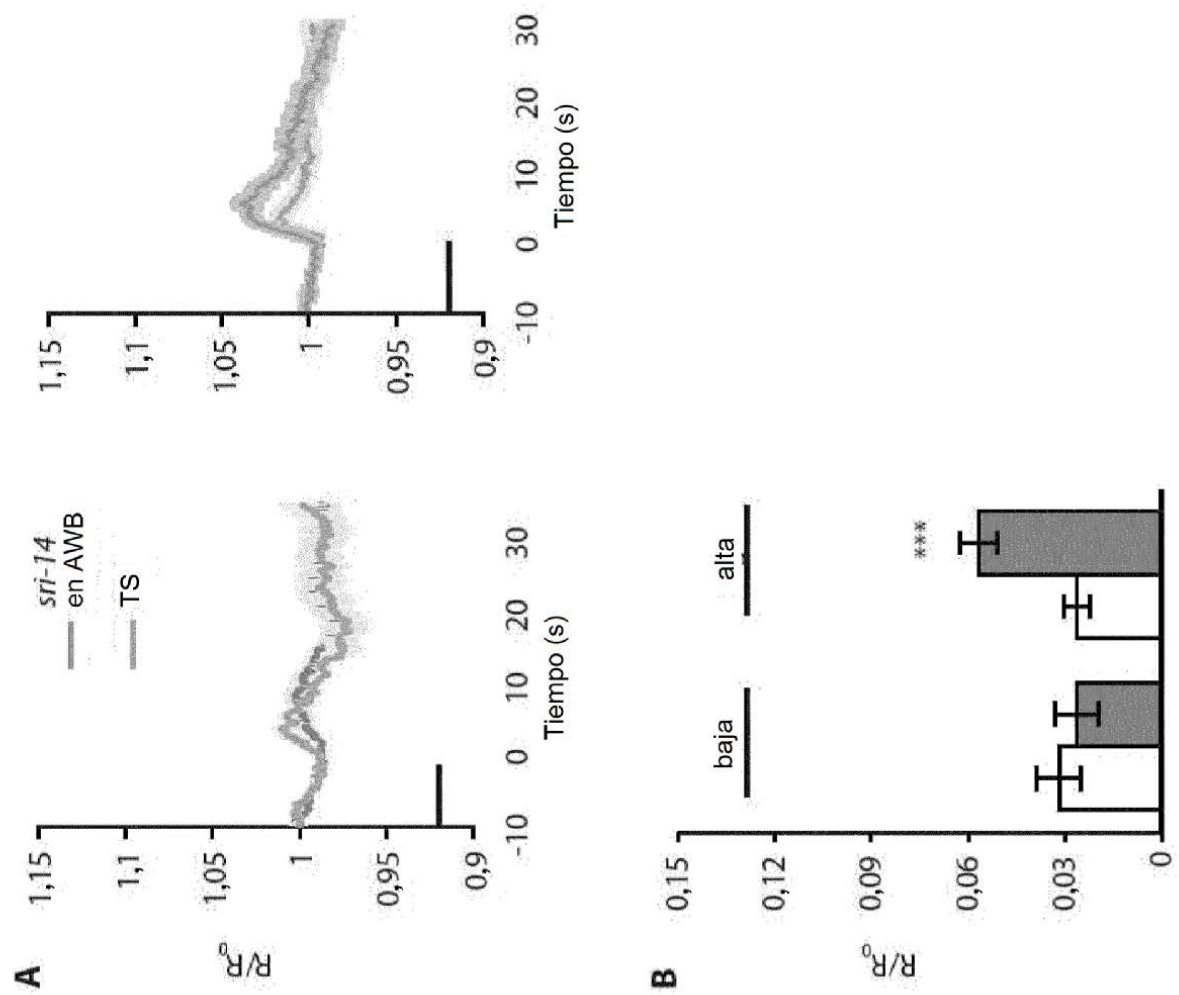


Figura 33

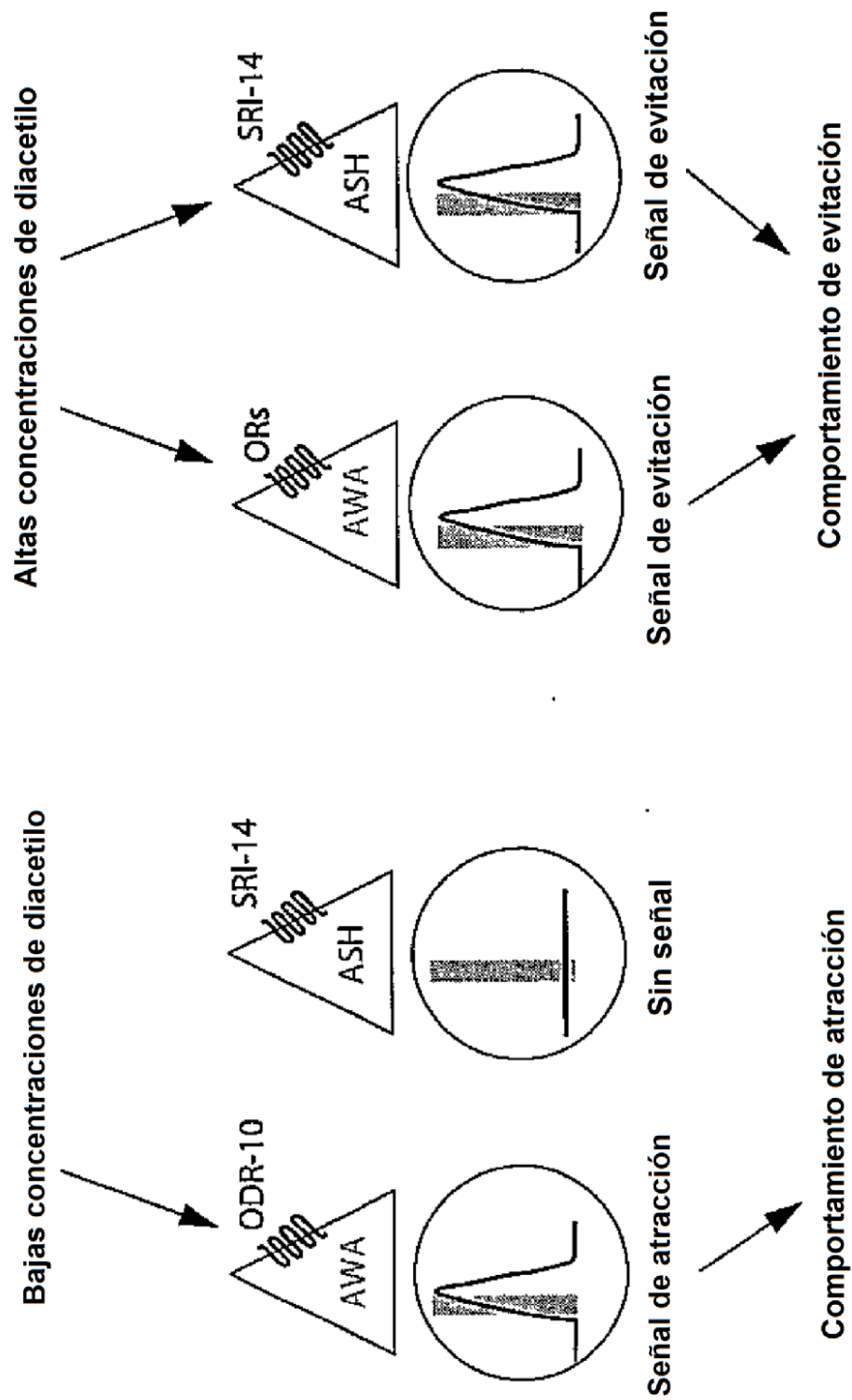


Figura 34

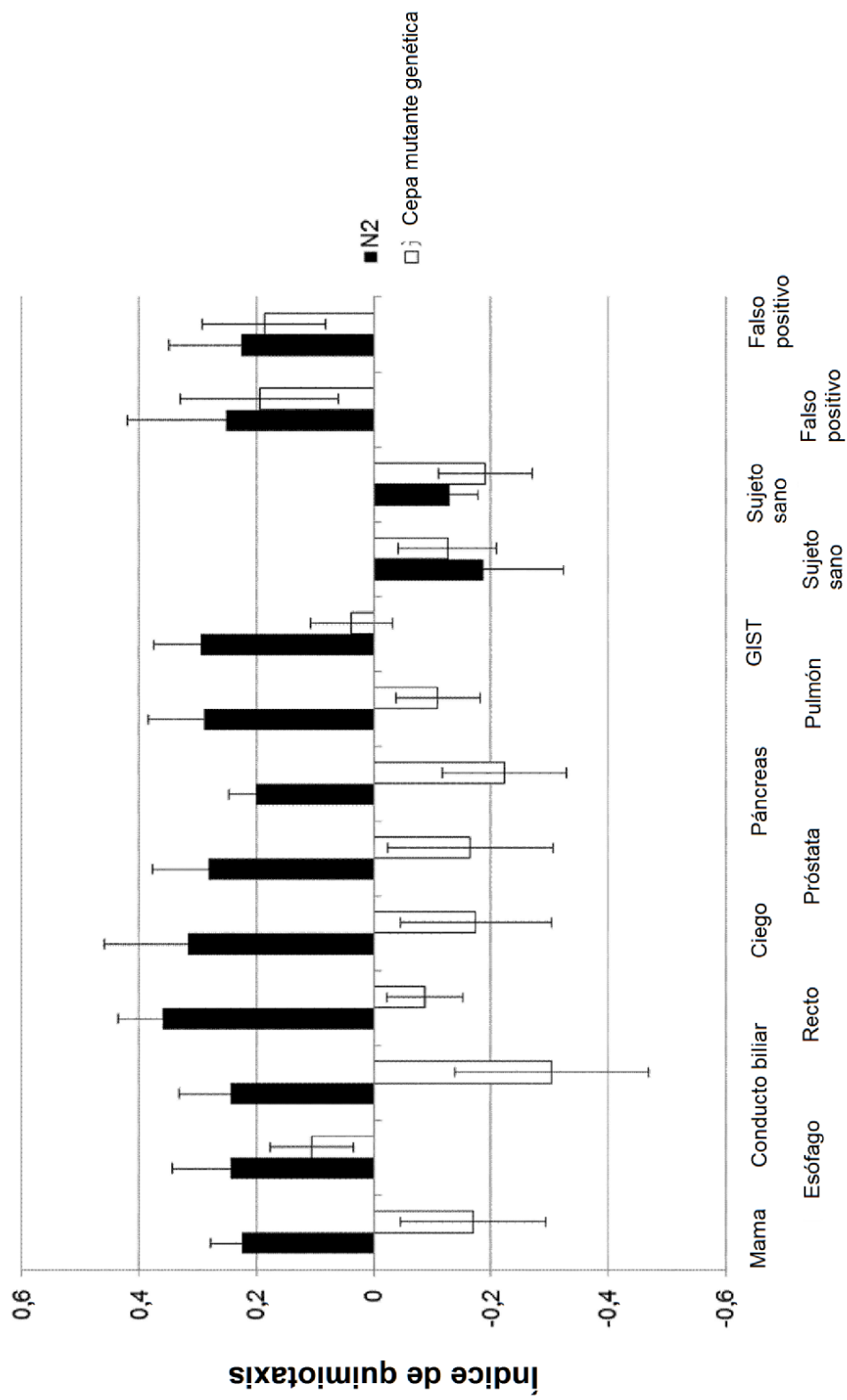


Figura 35

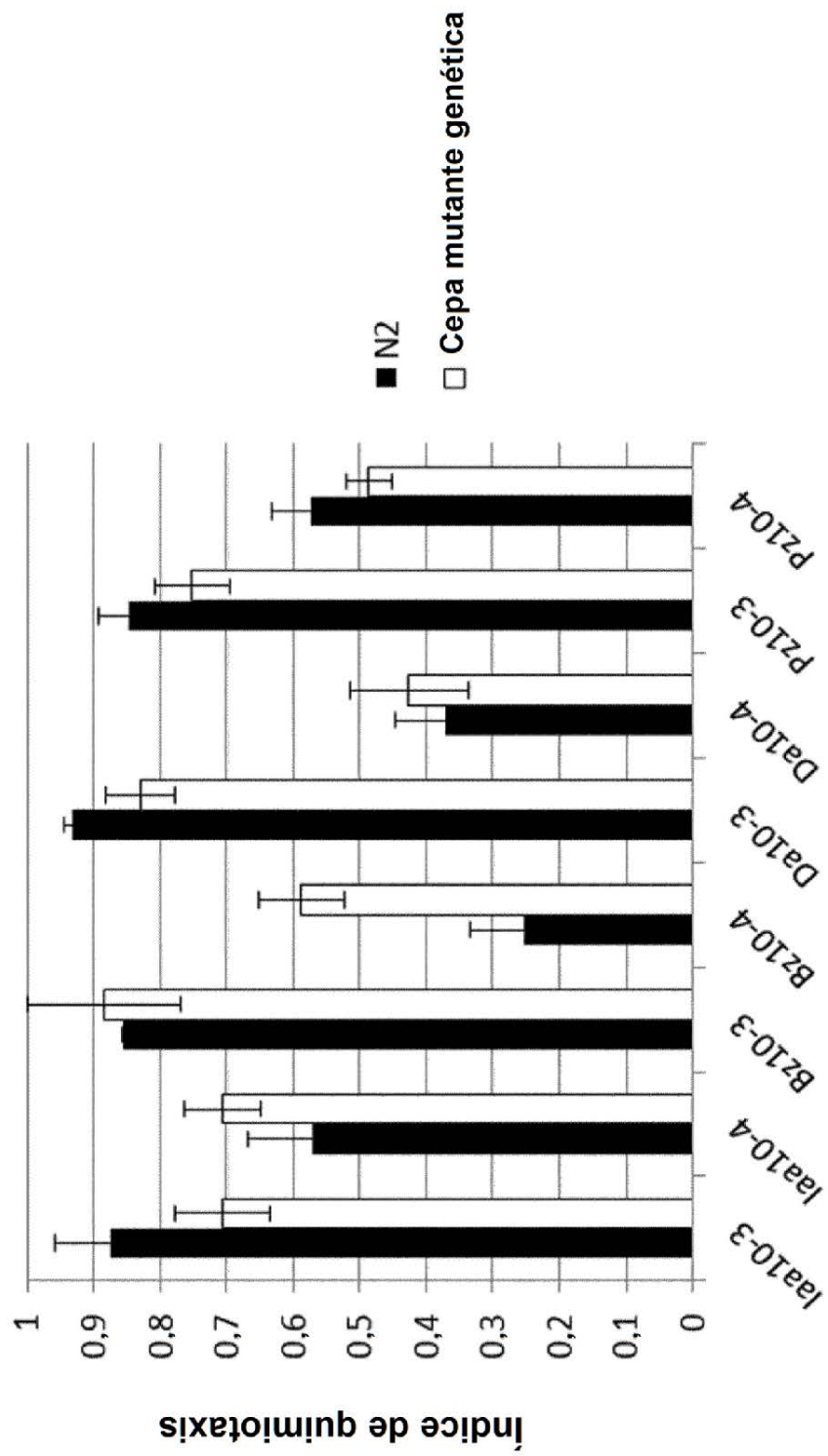


Figura 36

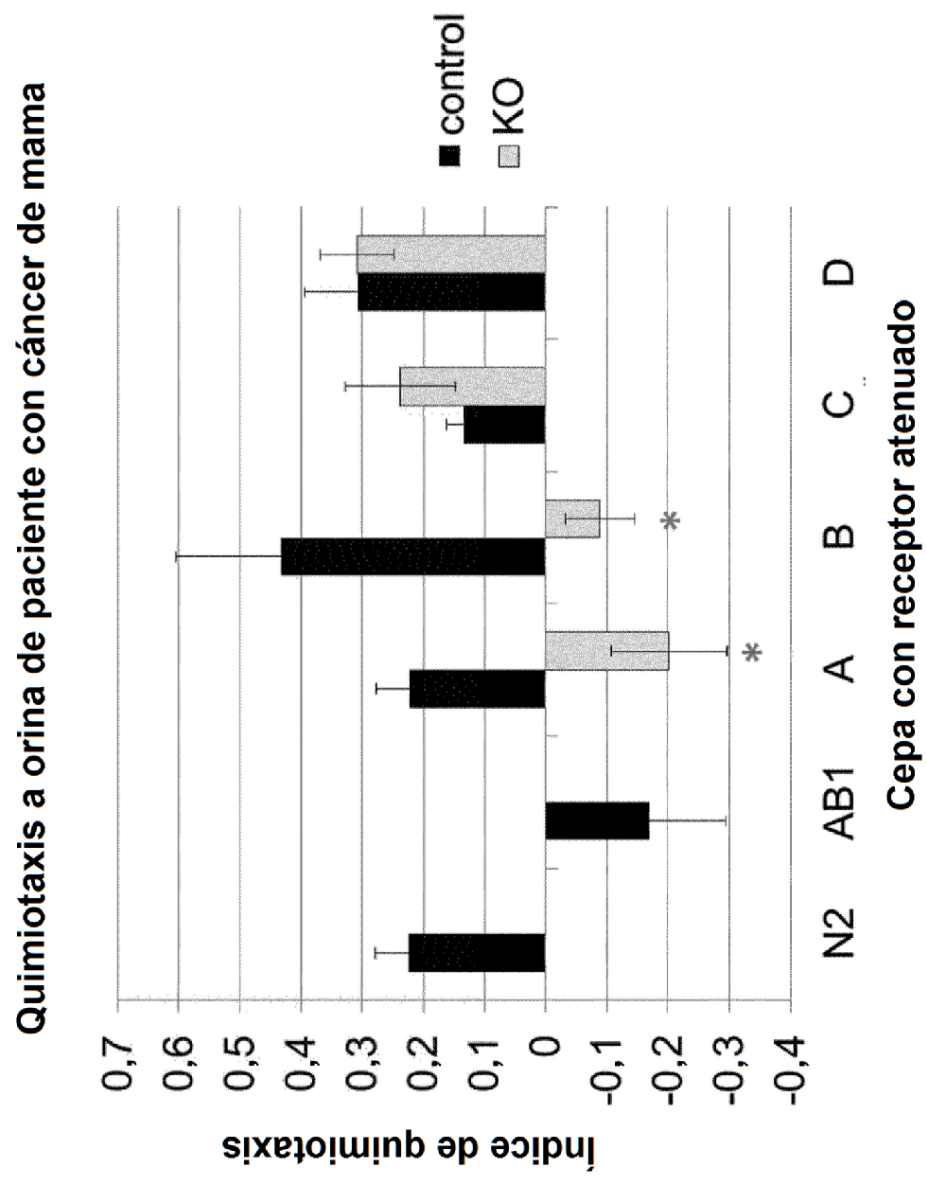


Figura 37

