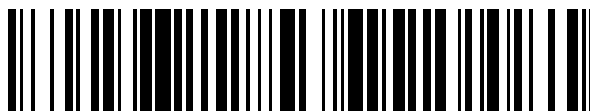


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 782 750**

51 Int. Cl.:

C12M 1/34 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2015** **PCT/US2015/051498**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016** **WO16053689**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2015** **E 15847901 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020** **EP 3201312**

54 Título: **Métodos y dispositivos relacionados con la detección de biomarcadores de cáncer oral**

30 Prioridad:

30.09.2014 GB 201417281

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

16.09.2020

73 Titular/es:

**GLOBAL LIFE SCIENCES SOLUTIONS
OPERATIONS UK LTD (100.0%)
19 Jessops Riverside, 800 Brightside Lane,
Sheffield
S9 2RX, GB**

72 Inventor/es:

**HORTON,JEFFREY KENNETH y
TATNELL, PETER JAMES**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 782 750 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

Métodos y dispositivos relacionados con la detección de biomarcadores de cáncer oral

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método *ex vivo* para detectar y cuantificar diversos biomarcadores orales en el material biológico presente en una cavidad oral humana cuando hay presente una actividad cancerosa oral.

Antecedentes de la invención

El cáncer oral ha surgido como un problema alarmante de salud pública, con una incidencia y tasas de mortalidad crecientes en todo el mundo. El cáncer oral (de manera predominante, el carcinoma oral de células escamosas, OSCC) es la sexta neoplasia maligna humana más frecuente, con una tasa de morbilidad elevada y una tasa de mortalidad a los 5 años de aproximadamente un 50%, que no ha cambiado significativamente en más de 50 años. Por lo tanto, la puesta en práctica de aproximaciones nuevas de cribado y detección temprana es de suma importancia, y podría reducir la morbilidad y mortalidad asociadas a esta enfermedad. La modalidad terapéutica ofrecida en la actualidad a los pacientes de OSCC se basa en criterios relacionados con los nódulos metastásicos tumorales y en la clasificación histológica. Desafortunadamente, estos indicadores son subjetivos y relativamente poco fiables, ya que dos tumores con idéntica estadificación y clasificación a menudo se comportan de manera muy diferente; aunque uno responda a la terapia, el otro puede ser letal. Por tanto, ha habido un esfuerzo cada vez mayor en la investigación básica del cáncer oral, que se centra en la identificación de los indicadores biológicos para el diagnóstico de su naturaleza biológica y agresividad.

Previamente se han sugerido biomarcadores relacionados con OSCC (principalmente mediante análisis de tejidos), por ejemplo: carbonilos, 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1), inhibidor de serín proteasa mamaria (Maspina), Ki67, Src fosforilado (fosfo-Src), Ciclina D1 (CycD1), metaloproteínasa-9 (MMP-9) y lactato deshidrogenasa (LDH). Un objetivo adicional podría implicar HPV. Se ha descrito una revisión de un grupo de biomarcadores en Cheng *et al. Clinical Translational Medicine* 2014 3:3.

No se han usado clínicamente diversos biomarcadores simultáneamente.

Los inventores de la presente invención han identificado la toma de muestras en la cavidad oral, una alternativa no invasiva a los ensayos en suero, como una modalidad eficaz para el diagnóstico y el pronóstico en la predicción del cáncer oral, así como para monitorizar el estado del paciente tras la terapia. Sin embargo, en la actualidad no se ofrece comercialmente ningún dispositivo o ensayo para la toma de muestras orales para detectar o predecir la progresión de OSCC.

En la presente memoria se propone la recogida/almacenamiento de material biológico de la cavidad oral en soportes sólidos que consisten en bases de papel, tales como papel de filtro de celulosa Whatman 903®, que facilitarán las aproximaciones de cribado del cáncer oral. Los materiales alternativos de recogida de muestras podrían incluir otros materiales sólidos, tales como alginatos e incluso materiales revestidos con productos químicos seguros. Es importante que se use un material de soporte sólido que no provoque la desnaturalización de la proteína, ya que la desnaturalización puede limitar los sistemas de detección inmunológica en aproximaciones como ELISA, transferencia de Western, etc.

La incorporación de una base de papel, alginato o soportes sólidos seguros y no desnaturalizantes similares en el dispositivo de recogida oral y de almacenamiento permitirá las siguientes técnicas; i) la toma de muestras directa de células de la cavidad oral sin ningún daño permanente significativo para el paciente y ii) durante la fase de detección molecular, se pueden usar soportes sólidos no revestidos (y algunos revestidos químicamente) en sistemas directos/con perforación en los que se corta una porción pequeña de la muestra recogida y se coloca directamente en una disolución del reactivo de detección. Estas técnicas facilitan la toma de muestras directa de saliva que contiene potencialmente biomarcadores de cáncer oral.

Compendio de la invención

Los inventores han establecido que la proximidad de la saliva y las lesiones de un cáncer oral hace que la medida de marcadores tumorales en la cavidad oral sea una alternativa atractiva a los ensayos con suero y tejidos. Además, los inventores han establecido que se puede obtener de manera conveniente cualquier molécula de ADN, ARN, proteína, y cualquier otro analito de interés, derivado de las células cancerosas vivas, a partir de la saliva y potencialmente se puede recoger y almacenar en un nuevo dispositivo de torunda. Los ensayos nuevos descritos en la presente memoria implican un sistema de perforación con el análisis directo del biomarcador obtenido en el dispositivo de torunda (por medio de un análisis de PCR directa, RT-PCR, proteínas, enzimas, electroforesis capilar, TOF MS, y otros métodos conocidos).

La invención proporciona un método según la reivindicación 1, que tiene las características preferidas definidas mediante las reivindicaciones dependientes de la reivindicación 1.

Breve descripción de los dibujos

La invención se puede poner en práctica de muchas maneras, cuyas realizaciones ilustrativas se describen más adelante con referencia a los dibujos, en los que:

la Figura 1 muestra un gráfico de los resultados de la recuperación de proteínas;

5 las Figuras 2a, 2b, 2c y 2d muestran gráficos de los resultados de la recuperación de enzimas;

las Figuras 3a y 3b muestran gráficas de los resultados de la recuperación de proteínas adicionales;

las Figuras 4a, 4b, 4c, y 5a muestran los resultados de la recuperación de ADN;

las Figuras 6a y 6b muestran los resultados de la recuperación de ARN;

10 las Figuras 7a a 11b muestran un dispositivo de torunda adecuado para las técnicas de toma de muestras descritas en la presente memoria; y

las Figuras 12a y 12b muestran un soporte para el dispositivo de torunda mostrado en las Figuras previas.

Descripción detallada de la invención

15 La invención, junto con sus objetivos y las ventajas de la misma, se puede entender mejor mediante referencia a la siguiente descripción considerada junto con los dibujos adjuntos, en los que las referencias numéricas similares identifican elementos similares en las Figuras.

20 La detección de biomarcadores específicos para el cáncer oral es el método probablemente más eficaz para cribar, diagnosticar, estadificar y realizar el seguimiento de esta neoplasia maligna. A diferencia de otros cánceres de tejidos profundos, el cáncer oral se localiza solamente en la cavidad oral, cuya expresión pretende incluir en la presente memoria la boca y la garganta superior (faringe) de los seres humanos. Por lo tanto, el contacto directo entre la saliva y las células de la lesión cancerosa oral hace que la medida de los marcadores tumorales en la saliva y las áreas de lesión sea una alternativa atractiva a los ensayos invasivos con suero y tejidos. Las moléculas de ADN, ARN, proteínas y otros analitos de interés derivados de las células cancerosas vivas se pueden recoger de manera conveniente de la saliva y las lesiones en un dispositivo similar a una torunda, y después almacenarlo si es necesario. En la presente memoria, el término "biomarcador(es)" incluye las moléculas recogidas de ADN, ARN, proteínas y otros analitos de interés, así como otro material biológico secundario que resulta, o se forma como consecuencia, de la presencia de esos biomarcadores. El término "biomarcadores" también incluye los precursores de OSCC, tales como los virus que pueden iniciar una actividad cancerosa. En la presente memoria, la "actividad cancerosa", incluye la actividad precancerosa, p.ej. la actividad viral, asociada a OSCC.

30 Por tanto, en la presente memoria se describe un método nuevo adecuado para recoger el biomarcador de cáncer oral del codón 63 del gen p53, como una alternativa no invasiva a la recogida de biomarcadores de suero, tejidos y biopsias. El método descrito es un método eficaz para el diagnóstico temprano, el pronóstico y la monitorización del estado tras la terapia.

35 Diversas tecnologías proporcionan oportunidades para las aproximaciones de alto rendimiento para la genómica y proteómica; que se pueden usar para evaluar las expresiones alteradas de objetivos génicos y proteicos en la saliva de pacientes de cáncer oral. La recogida/almacenamiento de biomarcadores orales, por ejemplo en la saliva, y/o células cancerosas en soportes sólidos puede ir seguida de una técnica simple directa o con perforación, en la que una muestra de un soporte sólido se añade directamente a los reactivos de detección y se somete a los métodos de detección de biomarcadores, tales como, pero sin limitación, ensayos inmunológicos y tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos sin purificación previa de los biomarcadores o analitos de interés.

40 Una aproximación alternativa al dispositivo de toma de muestras descrito en la presente memoria es el uso del dispositivo Whatman Easycollect® en combinación con un papel de filtro no revestido químicamente tal como 903®. Es importante que se use un material de soporte sólido que no provoque la desnaturalización de la proteína, ya que la desnaturalización puede limitar los sistemas de detección inmunológica a aproximaciones como la transferencia de Western, etc. El uso de soportes sólidos no revestidos químicamente reduce la posibilidad de dañar a los pacientes.

45 La incorporación de soportes sólidos seguros y no desnaturalizantes, de papel de filtro sencillo sin revestir, alginato o similar, en una matriz absorbente levemente abrasiva en la recogida de saliva/células y un dispositivo de almacenamiento permitirá la toma de muestras directa de los biomarcadores, asociados a células potencialmente cancerosas.

50 Los inventores han revisado la importancia de varios biomarcadores genómicos y proteómicos y/u otros analitos de interés para el cáncer oral, y sugieren la recogida de estos marcadores en los soportes sólidos suministrados por Whatman mencionados anteriormente. Los métodos de detección contemplados incluyen el perfil de la expresión génica o expresión proteica mediante el uso de RT-PCR y/o el uso de papel sin tratar y ensayos posteriores basados en proteínas, así como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa (qPCR), ensayos con

micromatrices antes de la qPCR, ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), otras técnicas inmunológicas, electroforesis en gel (2DE), electroforesis capilar (TOF MS), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), espectrometría de masas (MS), fotometría de llama, absorción atómica, y espectrofotometría.

Tabla I - Candidatos para OSCC:

Categoría	Biomarcadores de OSCC potenciales
ADN	Codón 63 del gen P53 D3S1234, D9S156, y D17S799 ADNs mitocondriales (citocromo C oxidasa I y citocromo C oxidasa II) Hipermetilación de promotores en genes supresores tumorales: DAPK, DCC, MINT-31, TIMP-31, TIMP-3, p16, MGMT, CCNA1 Gen MK167 Serpina B5 Gen OGG1 Gen TFRC Gen HSPB1
mARN	IL-8 IL-1β DUSP1 (fosfatasa 1 de doble especificidad) H3F3A (histona H3, familia 3A) OAZ1 (antizima 1 de ornitina descarboxilasa) S100P (proteína P de unión a calcio de S100) SAT (espermidina/espermina N1-acetiltransferasa EST)
Proteínas y enzimas	Biomarcador de proliferación Ki67 Lactato Deshidrogenasa LDH Metaloproteinasa de la matriz 1, 2 y 9 8-Oxoguanina ADN Glicosilasa OGG1 Inhibidor de serpin peptidasa Auto-anticuerpos hacia la proteína tumoral p53 Proteína de unión a Mac-2 M2BP Receptor de transferrina C Tfr1/TFRC HSP27 y 60 alfa B-cristalina ATP Sintasa Beta Calgranulina Beta Miosina Tropomiosina Galectina-1

Maspina
 α -amilasa
 IL-8
 TNF- α
 IL-1
 IL-6
 Factor de crecimiento de fibroblastos básico
 Estaterina
 Cyfra 21.1
 Antígeno polipeptídico tisular (TPA)
 Antígeno de cáncer 125 (CA125)
 Endotelina-1
 IL-1 β
 CD44
 Proteína salivar total
 Factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1)
 CD59
 Catalasa
 Profilina
 S100A9/MRP14
 M2BP
 Antígeno carcinoembrionario (CEA)
 Antígeno asociado a carcinoma CA-50
 Carbonilos salivares
 Ciclina D1
 Src fosforilado
 Transferrina
 Péptido 501 de la proteína de dedos de zinc
 Hemopexina
 Haptoglobina
 C3 del complemento
 Transtirretina
 α 1-antitripsina
 α -L-fucosidasa
 Telomerasa
 Peroxidasa

	Glutación S-transferasa (GST) Superóxido dismutasa (SOD)
Iones inorgánicos	Na, Ca, F, y Mg
Moléculas relacionadas con el estrés oxidativo	Especies reactivas de nitrógeno (RNS) tales como óxido nítrico (NO), nitritos (NO ₂) y nitratos (NO ₃) 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) Glutación Malondialdehído (MDA)
Hormonas	Cortisol
Metabolómica	Cadaverina, ácido alfa-aminobutírico, C ₅ H ₁₄ N ₅ , piperidina, taurina piperideína, ácido pipercolico, C ₄ H ₉ N, C ₈ H ₉ N, pirrolina ácido hidroxicarboxílico, betaína, C ₆ H ₆ N ₂ O ₂ , colina, carnitina, C ₄ H ₅ N ₂ O ₁₁ P Ácido láctico Ácido siálico
Aminoácidos	Alanina Fenilalanina Valina Leucina Isoleucina Tirosina Histidina Tryptófano Ácido glutámico Treonina Serina Glutamina
Otros indicadores	Papilomavirus humano HPV

La Tabla 1 proporciona ejemplos de biomarcadores candidatos que son indicativos de la actividad cancerosa o precancerosa en la cavidad oral. A continuación se describen diversos ensayos que se pueden llevar a cabo para detectar la existencia de estos biomarcadores en el material biológico recogido en soportes sólidos, y, en ciertos casos, para cuantificarlos. Aunque la lista contiene diversas proteínas y enzimas, es posible detectarlas por medio del análisis de mRNA, en vez de detectar la proteína propiamente dicha, y viceversa. Más adelante se muestra un dispositivo de torunda que incluye un soporte sólido adecuado para la recogida de los materiales biológicos.

Ejemplo 1: Medida directa de interleucina (IL) a partir de un soporte sólido

La IL-2 recombinante $\pm$ vehículo (R & D Systems; Cat. 202-IL-CF-10 μ g; lote AE4309112 y Cat. 202-IL-10 μ g; lote AE4309081, respectivamente) se disolvió en sangre (TCS Biosciences) a 50 pg o 100 pg/ μ l. Se aplicaron alícuotas (1 μ l que contenía 50 (B) o 100 (A) pg de IL-2) a papeles de filtro Whatman 903.

Estas muestras se dejaron secar durante la noche a la temperatura y humedad ambientales. Se extrajeron discos perforados de 3 mm de diámetro de cada tipo de papel mediante el uso de un perforador de tamaño adecuado. Se analizó directamente en discos individuales la IL-2 con los reactivos de un kit IL-2 Quantikine ELISA completamente configurado (R & D Systems, Cat. D2050, lote 273275). Se llevaron a cabo ensayos directos de "perforación en pocillo", es decir, en los que se perforó una porción del papel de filtro 903 y se depositó en un pocillo de reacción de una placa multipocillo convencional.

Al finalizar el ensayo se monitorizó la densidad óptica a 450 nm. Se determinó la recuperación de IL-2 comparando los valores con una curva patrón de concentraciones conocidas de IL-2. Las tasas de recuperación se muestran en la Figura 1, y demuestran que se pueden recuperar cantidades eficaces de IL cuando la IL se deposita en un soporte sólido.

Ejemplo 2: Detección de enzimas modelo a partir de células o enzimas transferidas a soportes sólidos

Se llevaron a cabo ensayos de proteínas y enzimas con kits de contaminación de DNasa y RNasa completamente configurados (DNase & RNase Alert QC Systems, códigos de catálogo AM1970 y AM1966, Life Technologies) según las instrucciones del fabricante.

Didesoxirribonucleasa (DNasa)

En una primera serie de experimentos, se aplicaron 0,125-0,5 U de DNasa a papeles Whatman FTA y 903 en volúmenes de 10 μ l. La actividad de DNasa y RNasa se midió como se resume más adelante.

En una segunda serie de experimentos, se tomaron fragmentos perforados de 1,2 mm de 10⁶ células madre embrionarias humanas (GE Healthcare; ref. de la línea celular: WCB307 GEHC 28) que se habían aplicado a papeles FTA y 903 en volúmenes de 10 μ l como se indicó anteriormente. La actividad de DNasa y RNasa se midió como se resume más adelante.

En una tercera serie de experimentos, se tomaron fragmentos perforados de 1,2 mm de 10⁶ células madre embrionarias humanas (GE Healthcare; ref. de la línea celular: WCB307 GEHC 28) que contenían 0,5 U de DNasa o 10 μ U de RNasa añadidas a estas células que se habían aplicado a papeles FTA y 903 en volúmenes de 10 μ l.

La detección de la actividad de DNasa se llevó a cabo como sigue, mediante el uso de un sustrato de DNasa marcado con fluorescencia escindible. Cada fragmento perforado se colocó en diferentes pocillos de placas de 96 pocillos. El sustrato de DNase Alert liofilizado se disolvió en tampón TE (1 ml) y se dispensó (10 μ l) en los pocillos de ensayo de la placa de 96 pocillos. Se añadió el tampón de DNase Alert 10X (10 μ l) y agua exenta de nucleasas (80 μ l) y la disolución de ensayo (100 μ l) se incubó durante 60 minutos a 37°C. El sustrato del kit DNase Alert QC System es un oligonucleótido de ADN modificado que emite una fluorescencia rosa cuando se escinde mediante la DNasa. Para este ensayo, se midió la fluorescencia en un aparato Tecan Ultra (excitación/emisión a 535/595 nm mediante el uso de una ganancia media). Las disoluciones que contenían actividad de DNasa produjeron una fluorescencia rosa, mientras las disoluciones sin actividad de DNasa no produjeron fluorescencia. Por tanto, los niveles mayores de DNasa correspondieron a un incremento de la cantidad de producción de luz. Los controles negativos consistieron en agua exenta de nucleasas (80 μ l) en lugar de la muestra. La actividad de DNasa se puede detectar y cuantificar de una manera dependiente de la tasa mediante el uso de los papeles de filtro 903 o FTA como soportes sólidos. La Figura 2a demuestra que la recuperación de enzimas es posible en un papel de filtro FTA tratado químicamente, y la Figura 2b demuestra que la recuperación de enzimas es posible en un papel de filtro 903 sin tratar.

Ribonucleasa (RNasa)

La detección de RNasa se llevó a cabo como sigue mediante el uso de un sustrato de RNasa marcado con fluorescencia escindible. Cada fragmento perforado se colocó en diferentes pocillos de placas de 96 pocillos. El sustrato de RNase Alert liofilizado se disolvió en tampón TE (1 ml) y se dispensó (10 μ l) en los pocillos de ensayo de la placa de 96 pocillos. Se añadió el tampón de RNase Alert 10X (10 μ l) y agua exenta de nucleasas (80 μ l) y la disolución de ensayo (100 μ l) se incubó durante 60 minutos a 37°C. El sustrato del sistema RNase Alert QC es un oligonucleótido de ARN modificado que emite una fluorescencia verde cuando se escinde mediante RNasa. Para este ensayo, se midió la fluorescencia en un aparato Tecan Ultra (excitación/emisión a 485/535 nm mediante el uso de una ganancia media). Las disoluciones que contenían RNasa produjeron una fluorescencia verde, mientras las disoluciones sin actividad de RNasa no produjeron fluorescencia. Por tanto, los niveles mayores de RNasa correspondieron a un incremento de la cantidad de producción de luz. Los controles negativos consistieron en agua exenta de nucleasas (80 μ l) en lugar de la muestra. Las Figuras 2c y 2d demuestran que la actividad de RNasa se puede detectar y cuantificar de una manera dependiente de la tasa mediante el uso de los papeles de filtro 903 o FTA.

Ejemplo 3: Medida de Láctico Deshidrogenasa (LDH)

Ensayo enzimático para LDH

LDH es una enzima citosólica presente en muchos tipos diferentes de células. Cuando se daña la membrana plasmática, se libera LDH en el medio que rodea las células. La LDH liberada se puede cuantificar mediante una reacción enzimática acoplada. En primer lugar, la LDH cataliza la conversión de lactato a piruvato por medio de la reducción de NAD⁺ a NADH. En segundo lugar, la diaforasa usa NADH para reducir una sal de tetrazolio (INT) hasta un producto de formazano rojo. Por lo tanto, el nivel de formación de formazano es directamente proporcional a la cantidad de LDH liberada en el medio. El ensayo se lleva a cabo transfiriendo un fragmento perforado con la adición de células o enzima LDH a una microplaca y añadiendo los reactivos del kit (kit de ensayo de citotoxicidad de LDH; Thermo Scientific, código de producto 88953). Tras la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se paran las reacciones y se determina la actividad de LDH mediante la absorbancia espectrofotométrica a 490 nm.

Inmunoensayo para LDH

Una aproximación alternativa más sensible implica el uso de la detección mediante un inmunoensayo de LDH (kit de ELISA de LDHB humana (Abcam, código de producto 116693)). Este sistema implica la medida cuantitativa de la proteína LDHB humana en lisados celulares y tisulares mediante el uso de un perforador en el sistema como se describió anteriormente. El ensayo emplea un anticuerpo específico para LDHB humana revestido en una placa de 96 pocillos. Las muestras se pipeteen en los pocillos y la LDHB presente en la muestra se une a los pocillos mediante el anticuerpo inmovilizado. Los pocillos se lavan, y se añade un anticuerpo detector anti-LDHB. Después de eliminar mediante lavado el anticuerpo detector sin unir, se pipetea el marcador conjugado a HRP específico del anticuerpo detector en los pocillos. Los pocillos se lavan de nuevo, se añade una disolución de sustrato de TMB a los pocillos y se desarrolla el color en proporción a la cantidad de LDHB unida. El color azul desarrollado se mide a 600 nm. Opcionalmente, la reacción se puede parar añadiendo ácido clorhídrico, que cambia el color de azul a amarillo y la intensidad se puede medir a 450 nm.

Las Figuras 3a y 3b muestran los resultados de la medida de LDH, y demuestran que la LDH se puede detectar y cuantificar en soportes sólidos.

Ejemplo 4: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) directa de sangre conservada en tarjetas Whatman FTA y 903

Se demostró que el kit Phusion Blood Direct PCR de Thermo Scientific permite la amplificación de ADN directamente a partir de muestras de sangre almacenadas en una diversidad de soportes sólidos, que incluyen tarjetas Whatman 903, FTA y FTA Elute (Chum y Andre 2013; Thermo Fisher Scientific). Las tarjetas FTA y FTA Elute son ejemplos de tarjetas basadas en papel revestidas químicamente, mientras las tarjetas 903 no tienen aplicado ningún producto químico. En los sistemas de amplificación directa, no son necesarias las etapas anteriores de extracción o purificación de ADN, y las porciones cortadas de las tarjetas se añaden simplemente a la mezcla de reacción de PCR. Se eligió la sangre como muestra biológica, ya que se considera que es el tipo de muestra más desafiante a partir de la cual generar amplicones de PCR. Esto se debe a la presencia del grupo hemo, que es un inhibidor potente de la PCR (Akane et al 1994, J. Forensic Sci., 39, 362-372).

Preparación de la muestra: Se aplicó sangre fresca o sangre conservada con heparina (1,4 UI/ml), K2EDTA (1,8 mg/ml), o Citrato Na (109 mM) a tarjetas Whatman 903, tarjetas FTA Elute, o tarjetas FTA Gene, y se secaron según las instrucciones del fabricante. Para la PCR directa, se perforó un disco de 1 mm de diámetro de la muestra y se usó en los siguientes volúmenes de reacción de PCR: Whatman 903: 10-50 µl, tarjeta FTA Elute: 25-50 µl y tarjeta FTA Gene: 50 µl. Cuando se usaron fragmentos perforados mayores o volúmenes de reacción más pequeños, se lavaron los fragmentos perforados con 20 µl de H₂O a 50°C durante 3 minutos. Después de eliminar el H₂O, se añadieron directamente los componentes de la PCR al fragmento perforado lavado. Los parámetros y reactivos usados se enumeran en las Tablas II, III y IV, a continuación.

Tabla II - Mezclas de reacción de PCR:

Componente	Reacción de 25 µL	Reacción de 50 µL	Conc. Final
H ₂ O	Añadir a 25 µL	Añadir a 50 µL	
Tampón 2x del kit Phusion Blood PCR	12,5 µL	25 µL	1x
Cebador F (Directo)	x µL	x µL	0,5 µM
Cebador R (Inverso]	x µL	x µL	0,5 µM
ADN polimerasa del kit Phusion Blood	0,5 µL	1 µL	
Tarjeta 903/FTA	Fragmento de 1 mm	Fragmento de 1 mm	

ES 2 782 750 T3

Componentes Opcionales para la Optimización de la Reacción*			
MgCl ₂ 50 mM	0,75 µL	1,5 µL	
EDTA 50 mM	0,6 - 1,25 µL	1,25 - 2,5 µL	
DMSO	1,25 µL	2,5 µL	5%

Tabla III - Protocolos de termociclado para la PCR - se usó el protocolo de dos etapas cuando los valores de T_m de los cebadores fueron 69-72 grados Celsius:

	Protocolo de 2 etapas		Protocolo de 3 etapas		
Etapas del ciclo	Temp.	Tiempo	Temp.	Tiempo	Ciclos
Lisis de células	98°C	5 minutos	98°C	5 minutos	1
Desnaturalización	98°C	1 s	98°C	1 s	35-40
Renaturalización*	-	-	x°C	5 s	
Extensión**	72°C	15-30 s/kb	72°C	15-30 s/kb	
Extensión final	72°C	1 minuto	72°C	1 minuto	1
	4°C	mantener	4°C	mantener	

Tabla IV - Cebadores específicos usados para amplificar los genes de interés:

Gen de Interés	Longitud del amplicón (kb)	Cebador Directo/Inverso	Listado de secuencias	Temperatura de renaturalización (°C)
Gen de cathepsina K	0,5	GAGAATCGCTTGAACCCGGG AGGTGTAGGT	1	78,1
		CCTGCTGATGCCTGGCCTCT TTCTTCTTTG	2	78,1
Glutathión peroxidasa 3	1,0	CATCAGCCCGTCTAGGAACC CAGTCATCAG	3	77,6
		CTCCTTCATCCCGCTACACCA CGCATACAC	4	77,9
Gen de beta-globina	3,8	GCACTGGCTTAGGAGTTGGA CT	5	65,9
		ACAGACACCCAGGCCTACTT G	6	65,6
Gen de beta-globina	7,5	GCACTGGCTTAGGAG TTGGACTTCAAACC	7	73,9
		CAACTGCTGAAAGAGATGCG GTGGG	8	75,1
Región de 5' del gen SOX21 (cebadores de control del kit Phusion Blood Direct PCR)	0,2	AGCCCTTGGGGASTTGAATTG CTG	9	73,5
		GCACTCCAGAGGACAGCRGT GTCAATA	10	72.2175.3 (R = A/G)

La Figura 4a muestra la amplificación directa de un fragmento de ADN genómico de 500 pb a partir de sangre humana tratada con heparina y conservada en diversas tarjetas. Las reacciones se llevaron a cabo a partir de fragmentos perforados de 1 mm lavados o colocados directamente en reacciones de PCR de un volumen de 50, 25 o 10 µl. Se usó un protocolo de PCR de 2 etapas. Se muestra una clave bajo la figura.

- 5 La Figura 4b muestra la PCR directa de amplicones de gADN de 1 kb, 3,8 kb y 7,5 kb a partir de sangre humana tratada con EDTA y conservada en diversas tarjetas. Las reacciones se llevaron a cabo a partir de fragmentos perforados de 1 mm en reacciones de 50 µl (los fragmentos perforados de tarjetas FTA Gene se lavaron como se describe en los Materiales y Métodos para el fragmento de 7,5 kb). Se usó un protocolo de 2 etapas para los fragmentos de 1 kb y 7,5 kb y un protocolo de 3 etapas para el amplicón de 3,8 kb. Se proporciona una clave bajo la figura.
- 10 La Figura 4c muestra una PCR directa llevada a cabo en sangre a partir de varias especies de mamífero tratada con EDTA y conservada en tarjetas 903 y FTA Gene. Las reacciones se llevaron a cabo a partir de fragmentos perforados de 1 mm mediante el uso de los cebadores de control universales incluidos en el kit Phusion Blood Direct PCR y un volumen de reacción de 20 µl (las tarjetas FTA Gene se lavaron). M = Marcador de Tamaño, - = Control negativo, + = Control positivo (ADN genómico humano purificado).
- 15 El estudio de PCR confirmó que se puede amplificar ADN directamente a partir de muestras biológicas almacenadas en diversas tarjetas de papel de filtro. Las muestras derivadas de las tarjetas 903 casi no mostraron inhibición, y se pudo usar un perforador de 1 mm con volúmenes de reacción tan bajos como 10 µl. El papel de filtro Whatman FTA y FTA Elute (una variante del papel de filtro Whatman FTA tratado) exhibió grados variables de inhibición. FTA Elute inhibió ligeramente las reacciones de PCR directas; un disco de 1 mm en una reacción de 25-50 µl funcionó bien, pero
- 20 cuando se colocó en una reacción de 10 µl, la PCR se inhibió completamente. Las tarjetas FTA Gene mostraron el mayor nivel de inhibición. Sin ningún pretratamiento, un fragmento perforado de 1 mm de tarjeta FTA Gene funcionó bien solamente en un volumen de reacción de 50 µl. Para los volúmenes de reacción más pequeños, fue suficiente un protocolo de lavado muy simple para eliminar los inhibidores de las tarjetas FTA Elute y FTA Gene. Después de lavar el fragmento perforado de tarjeta durante 3 minutos con H₂O, la muestra fue de pureza suficiente para el uso en
- 25 reacciones de PCR directas con el kit Phusion Blood Direct PCR a todos los volúmenes de reacción ensayados.

Los fragmentos perforados de las tarjetas 903 y los fragmentos perforados lavados de las tarjetas FTA Elute y FTA Gene (todos de 1 mm de diámetro) se usaron en volúmenes de reacción de 50 µl con cebadores específicos para amplicones de 1 kb, 3,8 kb y 7,5 kb. En todos los casos, la reacción de PCR generó el producto de amplificación de tamaño adecuado. El kit Phusion Blood Direct PCR es compatible con la sangre de una diversidad de especies. Se

30 amplificó con éxito una región de 237 pb sumamente conservada en posición anterior al gen SOX21 (A. Woolfe, M. Goodson, PLoS Biol. 3, e7; 2004) a partir de sangre de varias especies de vertebrados secada en tarjetas 903 y FTA Gene.

Ejemplo 5: Genotipado mediante el uso de muestras biológicas aplicadas en materiales de soporte sólidos.

- 35 Muchos cánceres están asociados con reordenamientos genéticos. La región 1 de punto de ruptura del sarcoma de Ewing (EWSR1) está translocada en muchos sarcomas. Recientemente, su reordenamiento se ha descrito en los carcinomas de células claras hialinizante de la glándula salivar (Shah AA et al 2013 Am J Surg Pathol. 37:571-8 EWSR1 genetic rearrangements in salivary gland tumors: a specific and very common feature of hyalinizing clear cell carcinoma). El estudio descrito más adelante ilustra el potencial del material de soporte sólido y la idea descrita en este documento para cribar potencialmente tales reordenamientos genéticos en un genoma mamífero complejo.

- 40 Recogida de muestras de ADN, almacenamiento y detección

Se aplicaron tejidos murinos de ratones c57BL/6 y ratones nulos para NOS3 (de un trasfondo genético 129/B6) a un intervalo de diferentes soportes sólidos basados en papel. Los ratones se sacrificaron y se disecaron para recoger órganos (sangre, corazón, cerebro, pulmón, hígado, y riñón). Los órganos se "intercalaron" entre dos capas de papel. Se aplicó presión por medio de una pipeta estéril para incrustar los tejidos en cada una de las matrices de celulosa.

45 Para el homogeneizado tisular, se procesaron aproximadamente 5 g de tejido mediante el uso de un homogeneizador Dounce de plástico en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, y después se aplicó a la matriz de papel adecuada. Tras la aplicación, todas las muestras se dejaron secar al aire durante 2 horas antes del almacenamiento en un recipiente sellado con desecante. En ciertos casos, las muestras se almacenaron hasta 2 meses antes del procesamiento.

Purificación de ADN, genotipado, y cuantificación

- 50 Se usó un micro-perforador desechable de Harris (1,2 mm o 3 mm diámetro) para cortar las muestras tisulares secadas de las tarjetas de papel, respectivamente, en forma de discos perforados. El disco de muestra se cortó del centro de la muestra secada y se colocó en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml exento de DNAsas. Los ratones nulos para o con inactivación génica de NOS3 se identificaron mediante la amplificación con PCR del ADN genómico con un cebador directo específico del exón 10 de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (véase el listado de secuencias 1), un cebador directo neo-específico de eNOS (listado de secuencias 2), y un cebador inverso específico del exón 12 de eNOS (véase el listado de secuencias 3). Los ADNs seleccionados como objetivo se amplificaron con una etapa de desnaturalización inicial de 10 min seguida de 36 ciclos de 94°C durante 35 seg, 650C durante 1 min, y 72°C durante 1 min; seguido de una extensión final a 72°C durante 5 min mediante el uso de un termociclador MJ Research.
- 55

Los productos de PCR resultantes se visualizaron mediante el uso de un sistema de electroforesis capilar Experion. Se llevó a cabo la cuantificación del ADN de ratón mediante el uso del kit de cuantificación de ADN genómico Primer Design para muestras de ratón (gDNA-mo-q-DD) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se aplicaron por separado muestras de tejidos individuales de tipo natural (T.N.) y nulos para NOS en diferentes tarjetas de papel. Para ejemplificar la capacidad de diferenciar las variantes genotípicas del ADN almacenado en las matrices de papel, se llevó a cabo una amplificación mediante PCR de una región en ratones de T.N. y transgénicos (nulos para NOS3, con inactivación génica).

En la Figura 5a se muestran amplicones de PCR asociados con el locus NOS mediante el uso de ADN como molde de amplificación aislado de tejidos de las tarjetas de papel. Los carriles 1-5 son ADN aislado de tejido de ratón de T.N. (Corazón, Hígado, Cerebro, Pulmón, y Riñón, respectivamente). Los carriles 6-10 son ADN amplificado de tejidos de ratón NOS (Corazón, Hígado, Cerebro, Pulmón, y Riñón, respectivamente).

Tabla V:

Tipo de ADN	Fuente de ADN	Soporte sólido A	Soporte sólido B	Soporte sólido C	Soporte sólido D
ADN de tejido de tipo natural	Sangre	+	ND	ND	ND
	Corazón	ND	+	+	+
	Hígado	ND	+	+	+
	Cerebro	ND	+	+	+
	Pulmón	ND	+	+	+
	Riñón	ND	+	+	+
ADN de tejido con inactivación génica	Sangre	+	ND	ND	ND
	Corazón	ND	+	+	+
	Hígado	ND	+	+	+
	Cerebro	ND	+	+	+
	Pulmón	ND	+	+	+
	Riñón	ND	+	+	+

En la Tabla V anterior se registra la amplificación eficaz de ADN aislado de tejidos almacenados en diversos soportes sólidos A, B, C y D. Se aisló ADN a partir de un fragmento perforado de 1,2 mm. "+" significa la presencia de amplicones. ND = no determinado.

La Figura 5a y la Tabla V anteriores muestran los productos de amplificación de ADN derivados de los ratones de T.N. y con inactivación génica de NOS3, respectivamente. Los resultados indican que para ambas fuentes de muestras, se produjeron los amplicones de ADN de tamaño correcto a partir del ADN aislado de todas las fuentes de órganos/tejidos aplicadas a la matriz con soporte sólido de papel. Estos datos indican que los fragmentos de micro-perforador de Harris de 1,2 mm pueden cortar suficiente ADN del tejido almacenado en los soportes sólidos de papel para diferenciar dos variantes genéticas.

Ejemplo 6: Recogida de ARN, purificación y cuantificación

Se aplicaron muestras de tejidos a tarjetas de papel como soporte sólido como se describió. Se extrajeron muestras perforadas y el ARN se aisló mediante el uso del kit Illustra® RNA Spin de GE Healthcare como se describe más adelante. La cuantificación de ARN se llevó a cabo en un sistema de PCR en tiempo real ABI 7900 mediante la utilización de kits de cuantificación de mARN disponibles comercialmente.

Mediante el uso de un micro-perforador de Harris desechable de 3 mm, se cortó un fragmento del centro del punto de muestra secada y se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpio exento de RNAsas. El tampón RA1 de Illustra (350 µl) se combinó con 3,5 µl de β-mercaptoetanol y la disolución se añadió al disco. El disco se homogeneizó mediante el uso de una aguja de 0,9 mm (calibre 20). El homogeneizado resultante se transfirió a la columna de filtración RNAspin Mini para la extracción posterior del material residual. La columna se centrifugó durante 1 min a 11.000 x g y se descartó el filtro RNAspin Mini. El lisado homogeneizado contiene el ARN, y este filtrado se transfirió a un tubo de micro-centrífuga de 1,5 ml nuevo exento de RNAsas.

Se añadió etanol (70%; 350 µl) al lisado homogeneizado y se mezcló mediante agitación en vórtex durante 2 pulsos de 5 seg. Para cada preparación, el lisado se pipeteó y se dispensó 2-3 veces, y se aplicó a una columna RNA Mini-spin colocada en un tubo de microcentrífuga de 2 ml. Los tubos se centrifugaron durante 30 seg a 8000 x g, y se descartó el eluido. La columna RNA Spin se transfirió a un tubo de recogida nuevo.

- 5 Se añadió el tampón MDB de Illustra (350 µl) y el tubo se centrifugó a 11.000 x g durante 1 min. De nuevo se descartó el eluido y la columna se devolvió al tubo de recogida. Se preparó una mezcla de reacción de DNasa según las instrucciones del fabricante y se añadió a la superficie del filtro contenido en la columna RNAspin. Esta incubación con DNasa se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 15 min.

- 10 El tampón de lavado RA2 (200 µl) se aplicó a la columna RNA Mini-spin y la columna se centrifugó durante 1 min a 11.000 x g. De nuevo se descartó el eluido y la columna se devolvió al tubo de recogida.

Se aplicaron 600 µl del tampón RA3 a la columna RNA Mini-spin y la columna se centrifugó durante 1 min a 11.000 x g, el eluido se descartó y la columna se devolvió al tubo de recogida. Además, también se llevó a cabo un lavado de la columna con tampón RA3 (250 µl). Para secar la membrana completamente, la columna se centrifugó durante 2 min a 11.000 x g y finalmente se colocó la columna en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml exento de nucleasas.

- 15 Se aplicó agua exenta de RNasas (40 µl) a la columna, y se centrifugó a 11.000 x g durante 1 min. El ARN purificado se usó inmediatamente en las aplicaciones posteriores o se almacenó a -80°C hasta el uso.

- 20 Para determinar la integridad del ARN de múltiples tejidos después de un almacenamiento prolongado, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcripción inversa (RT-PCR) con el ARN aislado de las muestras de tejidos de ratón almacenadas en las tarjetas de papel. Estas se almacenaron en presencia de un desecante durante 2 meses. La cuantificación del mRNA se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante mediante el uso de i) el kit de control de GAPDH de roedores ABI Taqman (nº de producto 4308313), ii) los grupos de cebadores de mRNA LUX en tiempo real de Invitrogen para los genes murinos de HPRT, GAPDH, y Beta-Actina (cat. 105M-02, 100M-02, y 101M-02, respectivamente) o iii) grupos de cebadores de genes específicos de tejidos de Applied Bio-systems.

- 25 La Figura 6a muestra los niveles de expresión relativos de GAPDH de varias fuentes de tejido mediante el uso del kit de control de GAPDH de roedor ABI Taqman. Los niveles de ARN derivado de las muestras aplicadas a las tarjetas de soporte sólido (materiales de soporte A y B) se determinaron mediante una comparación con valores conocidos generados a partir de una curva de valoración de la cuantificación de muestras patrón de ARN de ratón. Se detectaron niveles de ARN de GAPDH comparables a partir del ARN aislado a partir de ambos tipos de papel.

- 30 Se llevó a cabo la cuantificación absoluta del mRNA murino que codifica HPRT, GAPDH y Beta-Actina con los grupos de cebadores adecuados LUX de tiempo real de Invitrogen. Los niveles de ARN derivado de las muestras aplicadas al material de soporte de papel A se determinaron mediante una comparación con valores conocidos generados a partir de una curva de valoración de la cuantificación de muestras patrón de ARN de ratón. Los datos de recuperación de ARN murino asociado con el aislamiento de ARN se describen en la Figura 6b, y demuestran que es un material capaz de soportar el almacenamiento y la estabilización del ARN a partir de numerosos tipos de tejidos. Se realizaron observaciones similares para el ARN almacenado en el material de soporte B.

En resumen, los ejemplos anteriores demuestran que es posible recuperar, a partir de soportes sólidos de diferentes construcciones, una amplia diversidad de analitos que tienen una estructura biológica igual o similar a los biomarcadores de interés de OSCC proporcionados en la Tabla I.

- 40 Un dispositivo de torunda adecuado que incluirá un colector de soporte sólido se describe con más detalle más adelante con referencia a las Figuras 7 a 12.

- 45 Las Figuras 7a y 7b muestran vistas en planta y laterales, respectivamente, de un miembro de varilla 20 para una torunda 10 (mostrada ensamblada en la Figura 11a). La varilla 20 incluye una porción de mango 22 y un extremo de espátula 24, que es más ancha que el mango 22 en la vista en planta, pero de aproximadamente la misma anchura que el mango cuando se observa lateralmente. La varilla se puede moldear mediante inyección en una pieza. Sobre la espátula, en posición adyacente al mango, en los lados opuestos se deposita un adhesivo sensible a la presión 26 para unir un soporte sólido para recoger las muestras de material biológico. En este caso se emplean dos tiras 26. El mango 22, aproximadamente en mitad de su longitud, tiene una formación protuberante 28 para unir una cubierta 40 mostrada en la Figura 11a.

- 50 Las Figuras 7c y 7d muestran vistas en planta y laterales, respectivamente, de un miembro de varilla alternativo 21, que tiene la misma configuración que la varilla 20, excepto porque la varilla 21 tiene una ventana 23 en la espátula 24.

- 55 La Figura 8a muestra una vista en planta de un soporte sólido 30, del tipo descrito anteriormente, adecuado para recoger muestras de saliva, y adecuado para la fijación a la espátula 24 por medio de la(s) tira(s) adhesiva(s) mostrada(s) en las Figuras 7a y 7b. La Figura 8b muestra el papel en una sección transversal a lo largo de la línea 8b-8b mostrada en la Figura 8a, y la Figura 8c muestra una vista lateral del soporte sólido. En este caso el soporte sólido es una lámina de papel de celulosa, por ejemplo del tipo comercializado con el nombre comercial Whatman 903, que

se ha plegado y sellado en sus bordes. El papel tiene una línea de debilidad 34 y una región final 32 que se destina a la fijación a la espátula por medio del adhesivo 26. La región final 36 se usa para recoger una muestra S.

La Figura 9a muestra una vista en planta de un soporte sólido variante 31, del tipo descrito anteriormente, adecuado para recoger muestras de saliva, y adecuado para la fijación a la espátula 24 por medio de la(s) tira(s) adhesiva(s) mostrada(s) en las Figuras 7a a 7d. La Figura 9b muestra el papel en una sección transversal a lo largo de la línea 9b-9b mostrada en la Figura 9a, y la Figura 9c muestra una vista lateral del soporte sólido. El soporte sólido es la misma lámina de papel de celulosa plegada. El papel tiene una línea de debilidad 35 perforada y una región final 33 que se destina a la fijación a la espátula por medio del adhesivo 26. Una región de recogida de muestra 37 se halla en la misma área que la región 36. La variante incluye un cordón 39 que se halla bajo el papel cuando se pliega, pero sobresale por un borde, de forma que se puede sujetar durante el uso y tirar para rasgar el papel y liberar la región de la muestra 39 durante el uso.

Las Figuras 10a y 10b muestran vistas en planta y laterales de la varilla 20 y el soporte sólido 31 ensamblados, fijados entre sí por medio de un adhesivo 26 (no visible). Un conjunto con el soporte sólido 30, aunque se ilustrase, sería igual.

Las Figuras 11a y 11b muestran vistas en planta y laterales del conjunto mostrado en las Figuras 10a y 10b, cubiertas con una cubierta extraíble 40, que se une al mango 22 en la protrusión 28 mostrada en la Figura 7a.

Durante el uso, la torunda 10 se sujeta y se manipula por medio del mango 22. La cubierta se puede retirar para dejar al descubierto el soporte sólido 30 o 31 preparado para el uso. Se puede tomar una muestra de saliva (que podría ser una auto-muestra), y la persona que toma la muestra puede volver a colocar la cubierta, para enviarla a un laboratorio para el procesamiento posterior. En el laboratorio, se puede retirar el soporte sólido de las partes restantes de la torunda, y después se puede retirar una porción del papel para el ensayo, por ejemplo mediante el uso de un perforador. Si se usa la varilla 21, la porción de soporte sólido se puede retirar sin retirar el soporte sólido de la varilla, ya que se puede perforar con un perforador o similar a través de la ventana 23.

Cuando se toman múltiples muestras, se puede usar una gradilla de secado 50 como se ilustra en las Figuras 12a y 12b, en la que se colocan múltiples torundas 10 con el mango hacia abajo en los pocillos 52 de la gradilla, con sus cubiertas 40 retiradas.

Cada soporte sólido 30/31 se ensaya *ex vivo* con respecto a la presencia de dos o más de los biomarcadores de interés según cualquiera de las técnicas descritas anteriormente, lo que sería indicativo de una actividad cancerosa oral.

Por ejemplo, se describe un soporte sólido 30/31 de papel 903 sencillo, pero se podrían usar otros soportes sólidos. Por ejemplo, se podría usar papel de filtro tratado con productos químicos conservantes, tal como se comercializan con los nombres comerciales Whatman FTA o FTA Elute, cada uno de los cuales están pretratados. FTA está pretratado con una mezcla de reactivos estabilizantes que comprende: una base débil, y un agente quelante, ácido úrico o una sal de urato, y un tensioactivo aniónico, tal como dodecil sulfato sódico (SDS) y/o lauril sarcosinato sódico (SLS). FTA Elute está pretratado con una mezcla de reactivos estabilizantes que comprende una sal caotrópica en forma de tiocianato de guanidinio. Cuando se usa FTA o FTA Elute, la técnica de muestreo puede implicar tomar una muestra de saliva y después transferirla al soporte sólido para evitar el contacto directo entre la cavidad oral y el soporte sólido tratado. Cuando se usa el reactivo estabilizante, se ha descubierto que la adición de ciclodextrina en la etapa de detección actúa como un secuestrante, y de ese modo mejora la eficacia de las técnicas de PCR directa, qPCR y otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

Se prefiere un soporte sólido formado a partir de papel de celulosa.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GE HEALTHCARE UK LIMITED
Horton, Jeffrey
5 Tatnell, Peter

<120> Métodos y dispositivos relacionados con la detección de biomarcadores de cáncer oral

<130> 276959-2
10

<150> GB 1417281.1
<151> 30-09-2014

<160> 10
15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 30
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético
25

<400> 1
gagaatcgct tgaaccggg aggtgtaggt 30

<210> 2
30 <211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 2
cctgctgatg cctggcctct ttctctttg 30

<210> 3
40 <211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 3
50 catcagcccg tctaggaacc cagtcacag 30

<210> 4
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
55

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 4
60 ctctctcatc ccgtacacc acgcatacac 30

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 5
 5 gcactggctt aggagttgga ct 22

 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 6
 15 acagacaccc aggcctactt g 21

 <210> 7
 <211> 29
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25
 <400> 7
 gcactggctt aggagttgga ctcaaacc 29

 <210> 8
 30 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 8
 caactgctga aagagatgcg gtggg 25

 <210> 9
 40 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 9
 50 agcccttggg gastgaatt gctg 24

 <210> 10
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 10
 60 gcactccaga ggacagcrgt gtcaata 27

REIVINDICACIONES

1. Un método *ex vivo* para detectar diversos biomarcadores en un material biológico presente en una cavidad oral humana cuando hay presente una actividad cancerosa oral en dicha cavidad, comprendiendo el método las etapas de:
 - 5 i) proporcionar un soporte sólido de papel a base de celulosa para recibir una muestra de material biológico de la cavidad oral;
 - ii) depositar una muestra del material biológico en el soporte sólido,
 - 10 iii) llevar a cabo diversos ensayos *ex vivo* y detectar la presencia del codón 63 del gen p53 en el material biológico depositado en el soporte sólido, en el que el ensayo incluye la etapa de extraer una porción del soporte sólido, usando un perforador; y que incluye además la etapa de cuantificar al menos uno de dichos diversos biomarcadores.
2. Un método según se define en la reivindicación 1, en el que dichos biomarcadores son una selección diversa de los candidatos enumerados en la Tabla I de la presente memoria.
3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha selección diversa está en forma de uno o más ácidos nucleicos, y/o una o más proteínas, y/o una o más enzimas u otros analitos indicativos de dicha actividad cancerosa oral.
- 15 4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho uno o más ensayos, incluyen uno o más ensayos seleccionados del grupo que consiste en: perfil de la expresión génica o la expresión proteica mediante el uso de RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa (qPCR), amplificación isotérmica, PCR inmunológica, ensayos con micromatrices, ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), técnicas inmunológicas, electroforesis en gel (2DE), electroforesis capilar (TOF MS), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), espectrometría de masas (MS), fotometría de llama, espectrofotometría de absorción atómica, y espectrofotometría visible.
- 20 5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el soporte sólido opcionalmente se trata químicamente con un reactivo o mezcla de reactivos estabilizante.
- 25 6. Un método según la reivindicación 5, en el que dicho reactivo o mezcla de reactivos comprende: una base débil, y un agente quelante, opcionalmente, ácido úrico o una sal de urato, y opcionalmente un tensioactivo aniónico, o comprende: una sustancia caotrópica tal como una sal caotrópica, por ejemplo tiocianato de guanidinio.
7. Un método según la reivindicación 5 o 6, donde el soporte sólido se trata químicamente, la etapa ii) de la reivindicación 1 incluye tomar una muestra de material biológico de una cavidad oral, y transferir dicha muestra a dicho soporte sólido tratado químicamente sin que dicho soporte sólido tratado químicamente entre en contacto con la cavidad oral.
- 30 8. Un método según la reivindicación 7, en el que la etapa iii) de la reivindicación 1 se lleva a cabo en presencia de ciclodextrina.
9. Un método según una de las reivindicaciones 1 a 8, que incluye además la etapa de proporcionar una torunda para fijar el soporte sólido, comprendiendo dicha torunda: una varilla, que incluye una porción de mango y una porción de espátula en un extremo del mango para sujetar un soporte sólido.
- 35

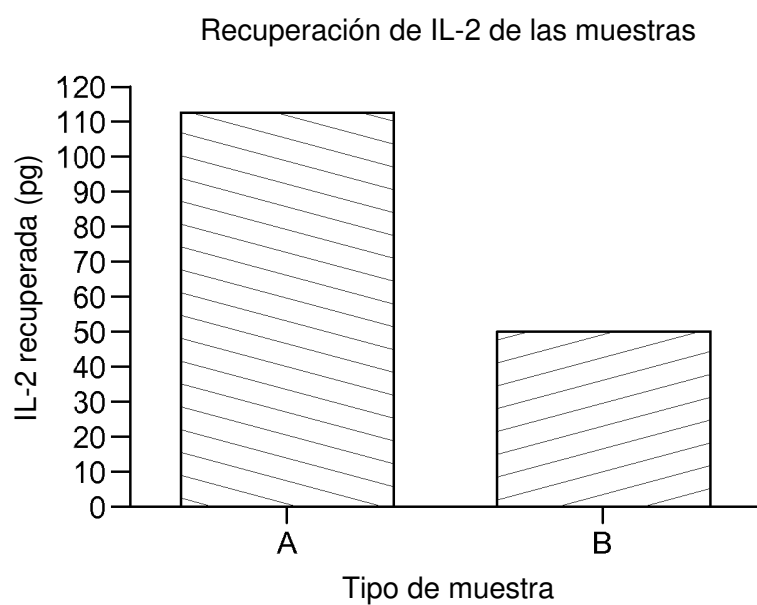


FIG. 1: Medida de la proteína modelo (IL-2) de un soporte sólido 903

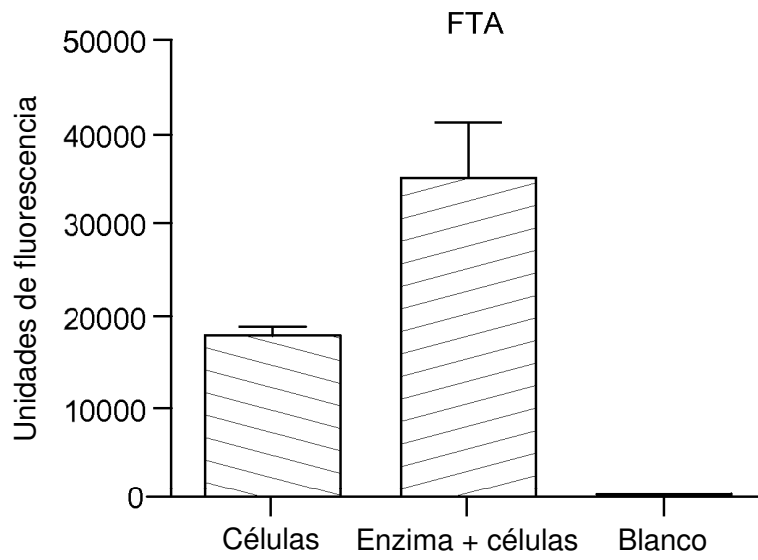


FIG. 2a: Medida de la enzima modelo (DNasa) a partir de un soporte sólido FTA

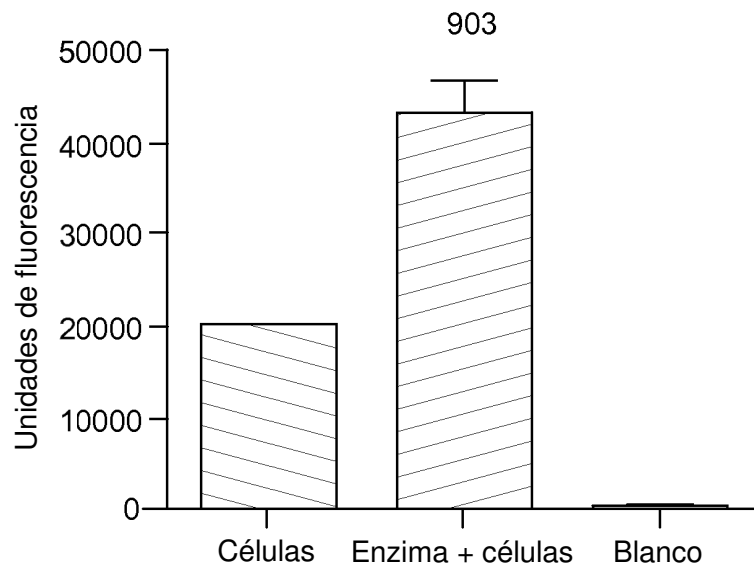


FIG. 2b: Medida de la enzima modelo (DNasa) a partir de un soporte sólido 903

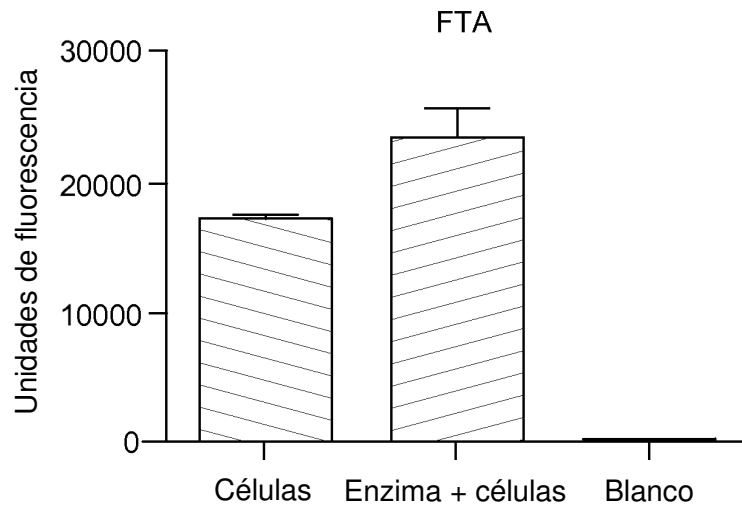


FIG. 2c: Medida de la enzima modelo (RNasa) a partir de un soporte sólido FTA

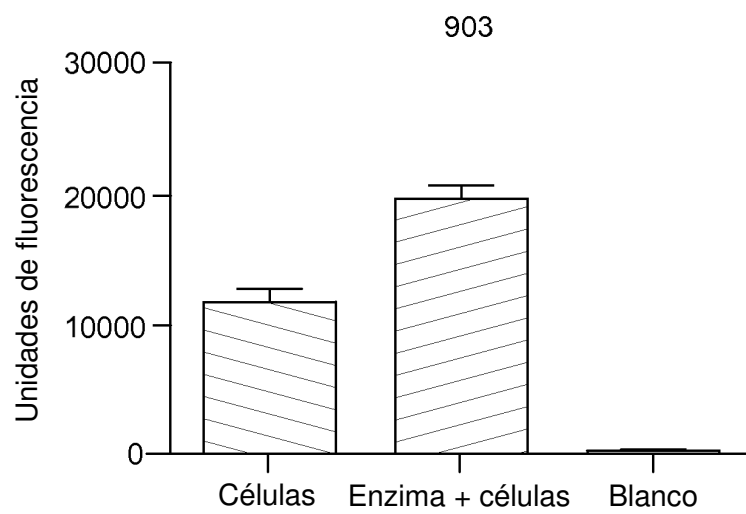


FIG. 2d: Medida de la enzima modelo (RNasa) a partir de un soporte sólido 903

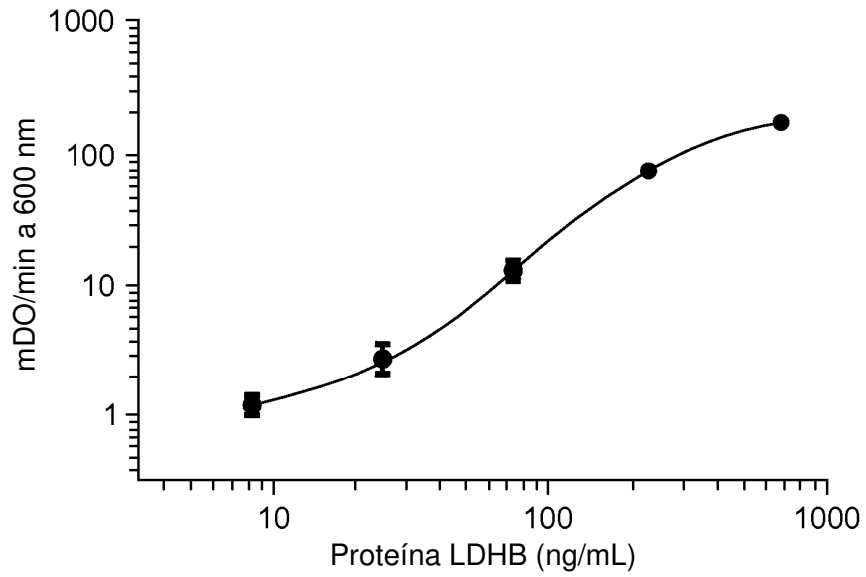


FIG. 3a: Curva dosis-respuesta para LDH

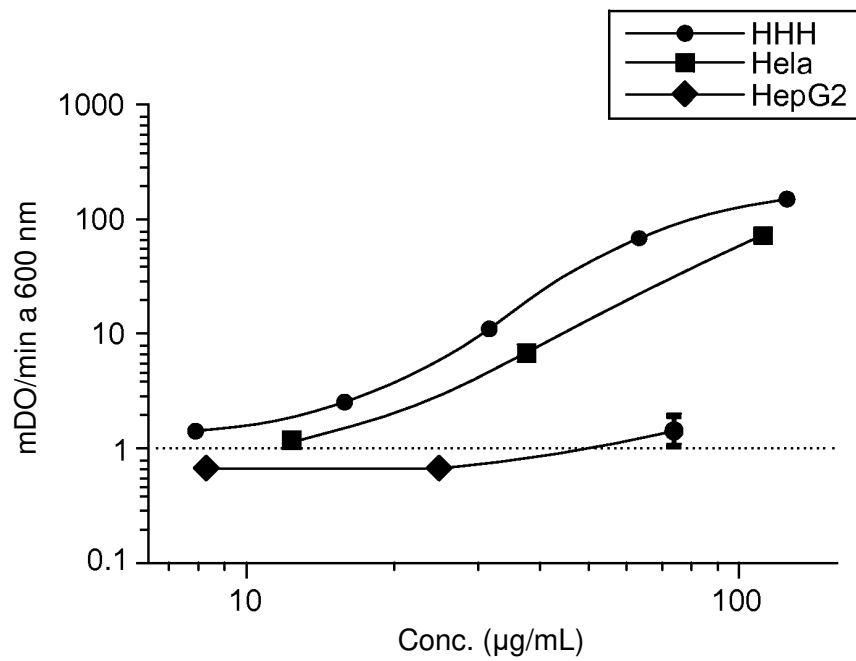
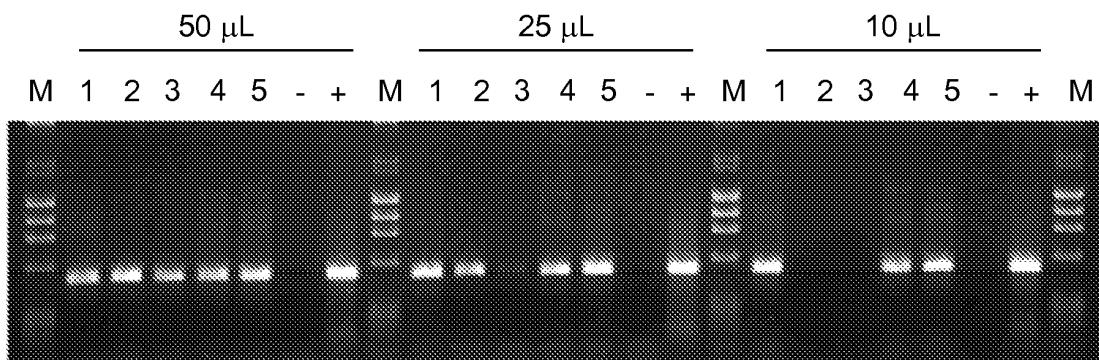
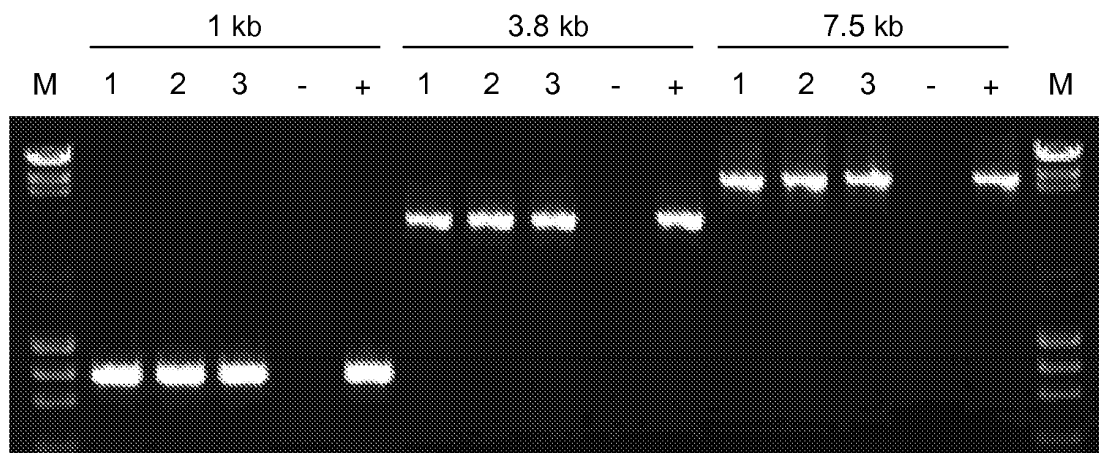


FIG. 3b: Medida de LDH a partir de células



1 = tarjeta 903, 2 = tarjeta FTA Elute, 3 = tarjeta FTA Gene, 4 = tarjeta FTA Elute, lavada, 5 = tarjeta FTA Gene, lavada, M = marcador de tamaño, - control negativo, + control positivo (ADN genómico humano purificado).

FIG. 4a



1 = tarjeta 903, 2 = tarjeta FTA Gene, 3 = tarjeta FTA Elute, M = marcador de tamaño, - control negativo, + control positivo (ADN genómico humano purificado).

FIG. 4b

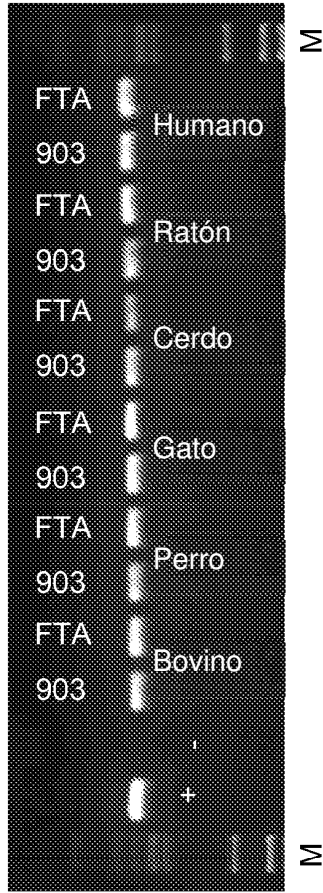


FIG. 4c

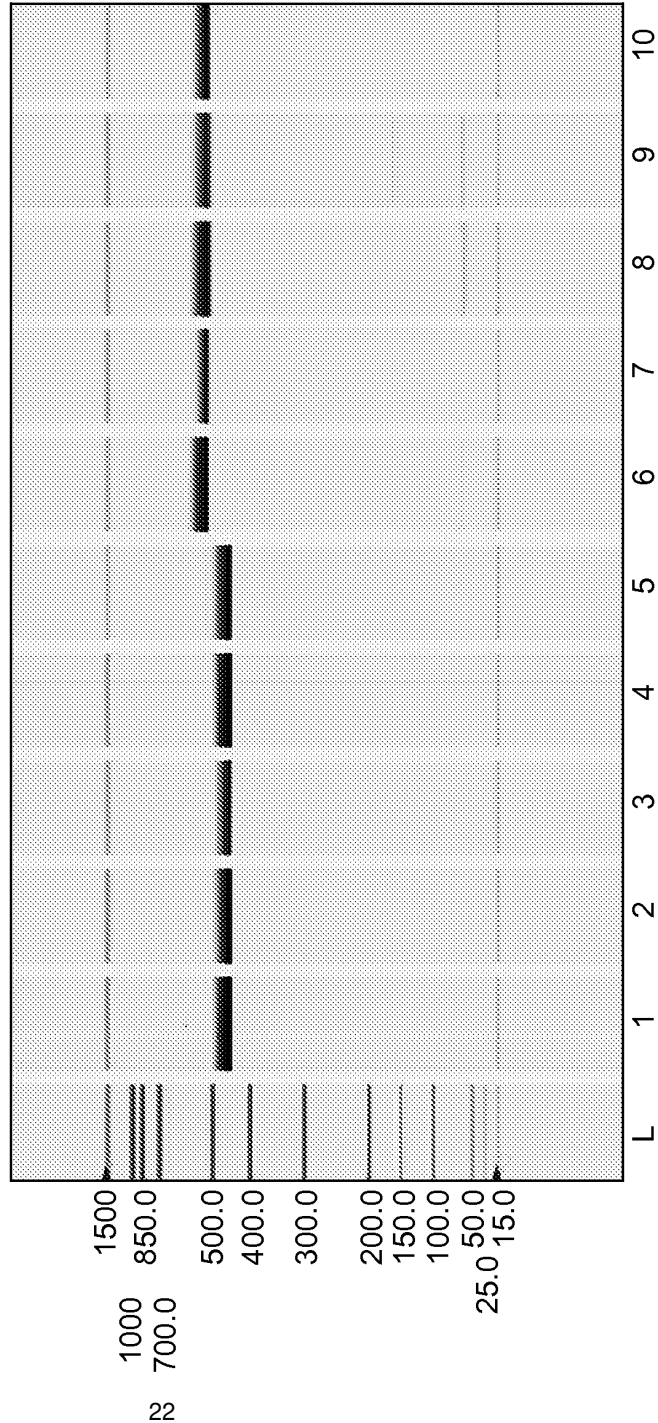


FIG. 5a: Productos de amplificación de ADN derivados de ratón tanto T.N. como con inactivación génica de NOS3

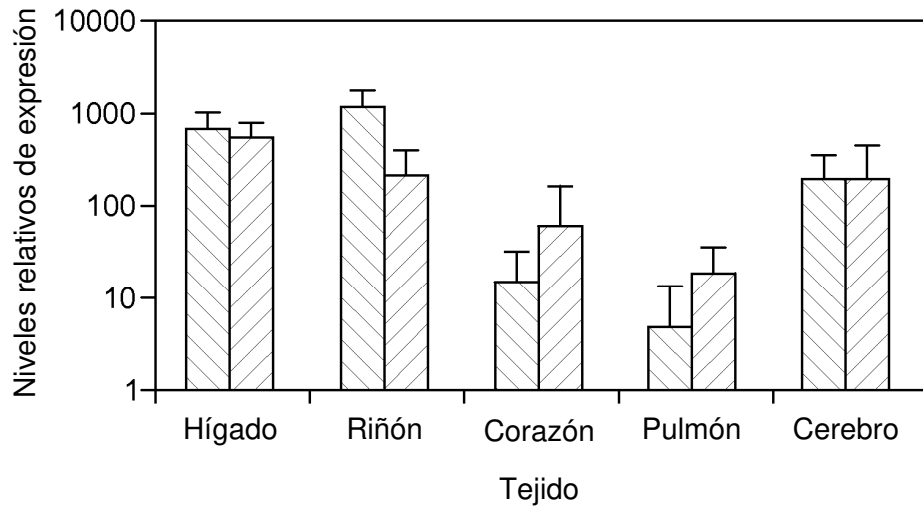


FIG. 6a: Niveles relativos de expresión de GAPDH de varias fuentes de tejido (las columnas izquierda y derecha se refieren a los materiales sólidos A y B respectivamente).

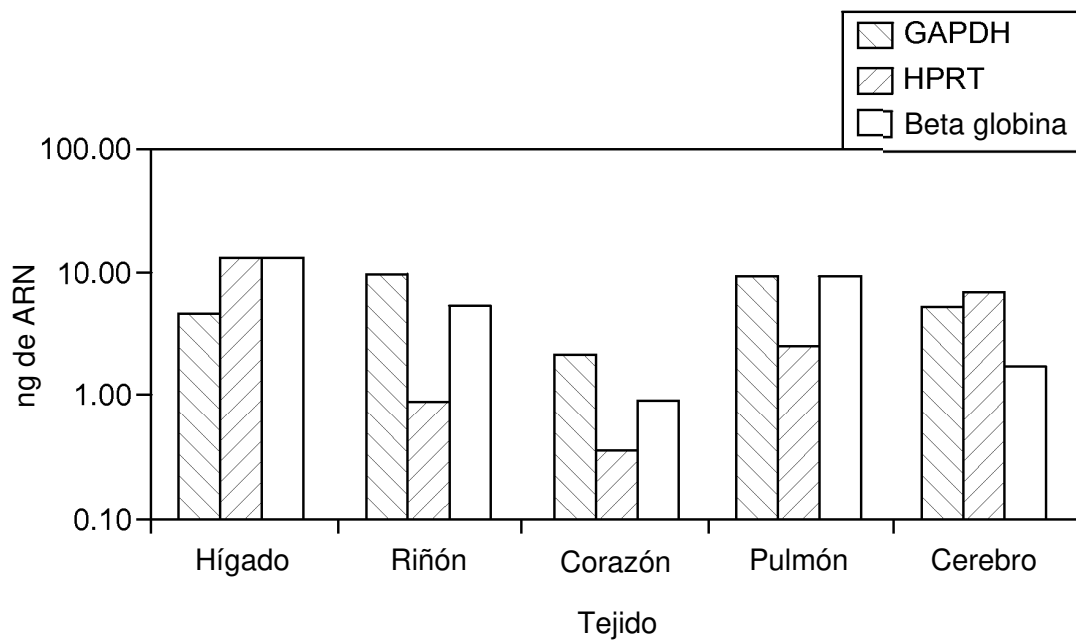


FIG. 6b

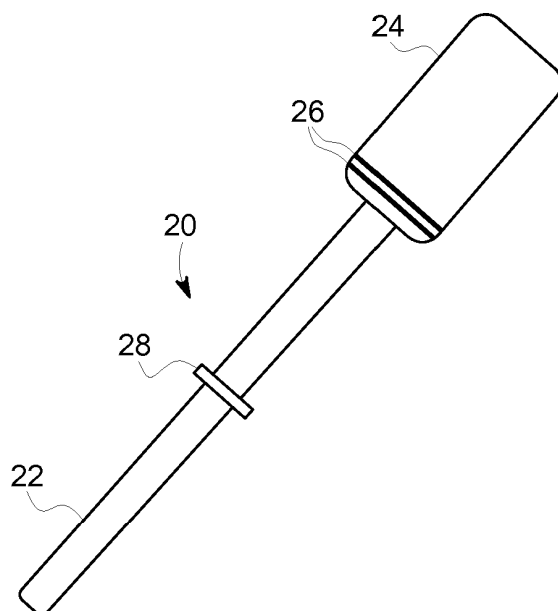


FIG. 7a

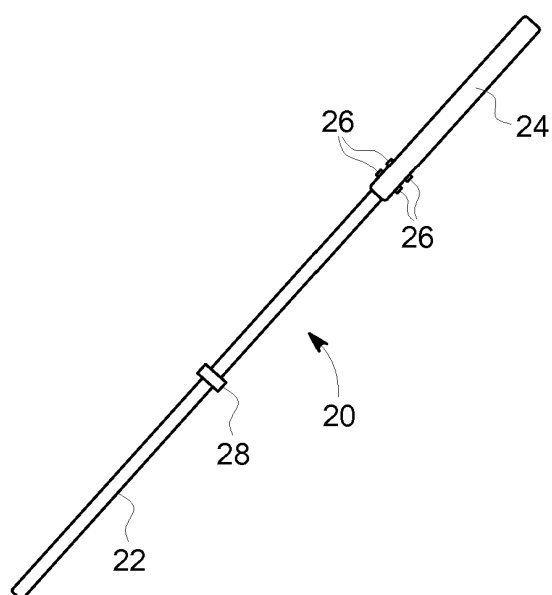


FIG. 7b

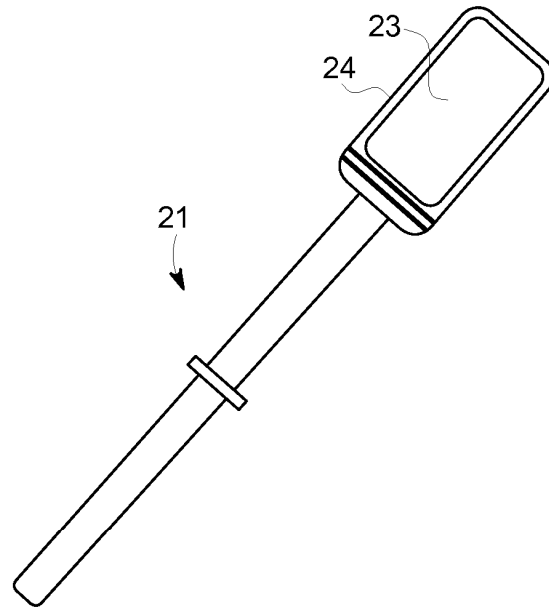


FIG. 7c

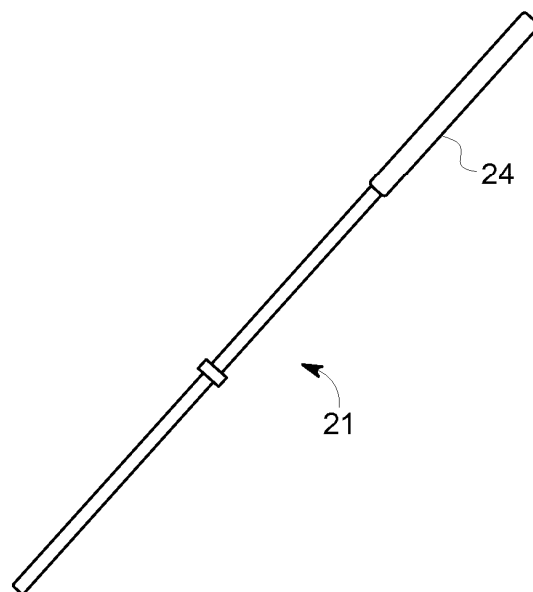


FIG. 7d

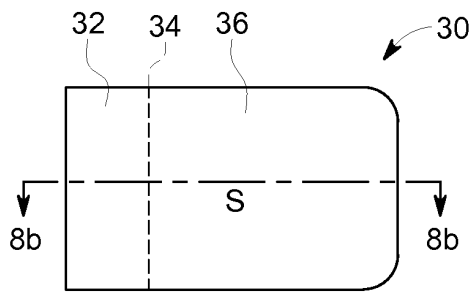


FIG. 8a

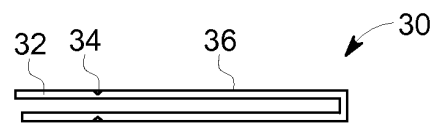


FIG. 8b

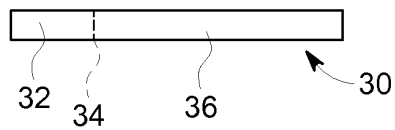


FIG. 8c

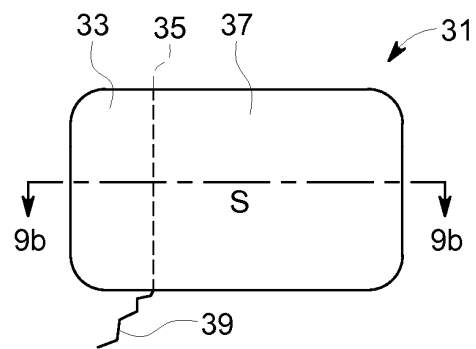


FIG. 9a

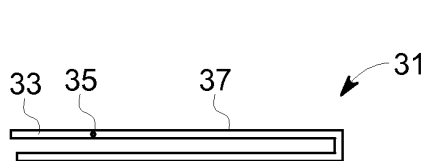


FIG. 9b

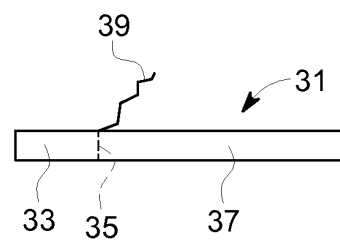


FIG. 9c

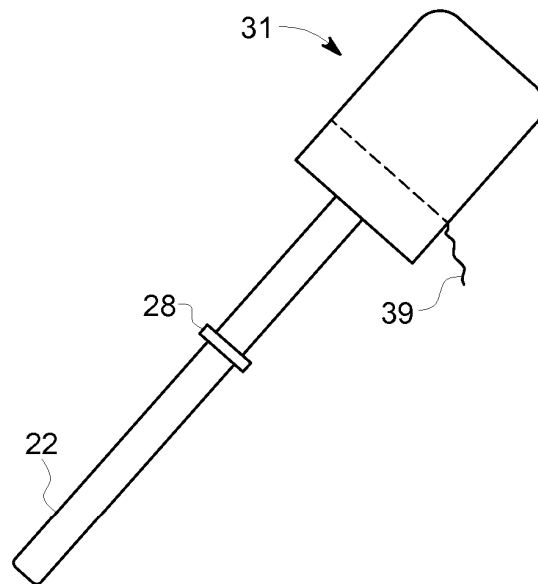


FIG. 10a

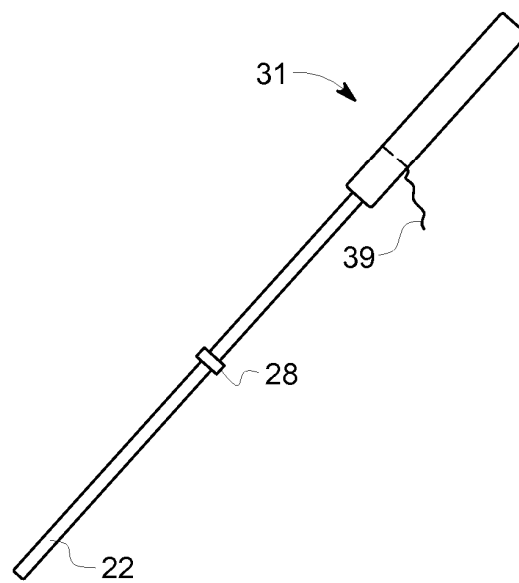


FIG. 10b

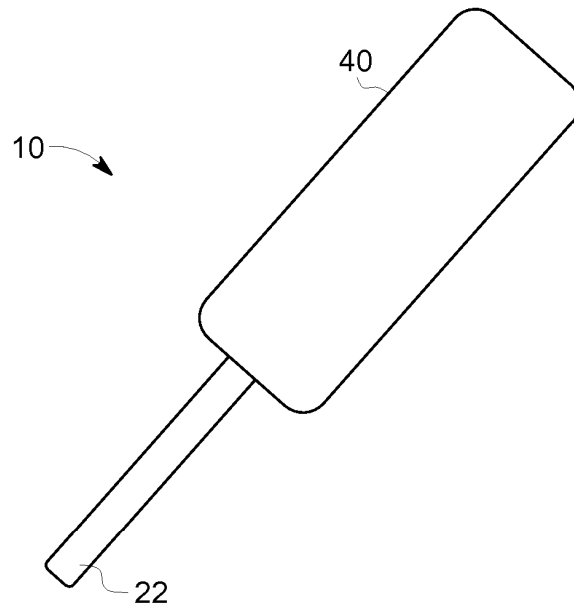


FIG. 11a

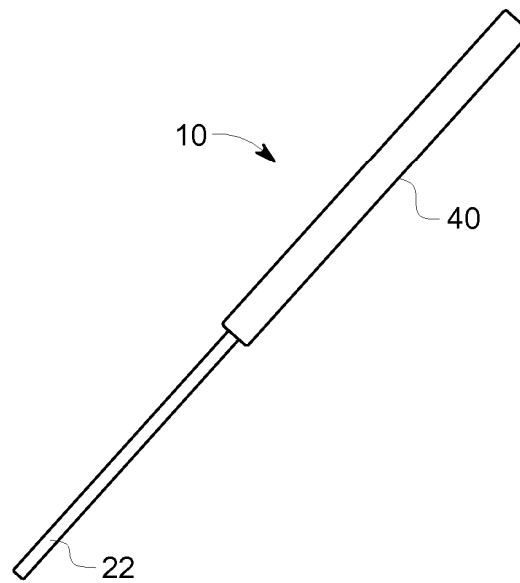


FIG. 11b

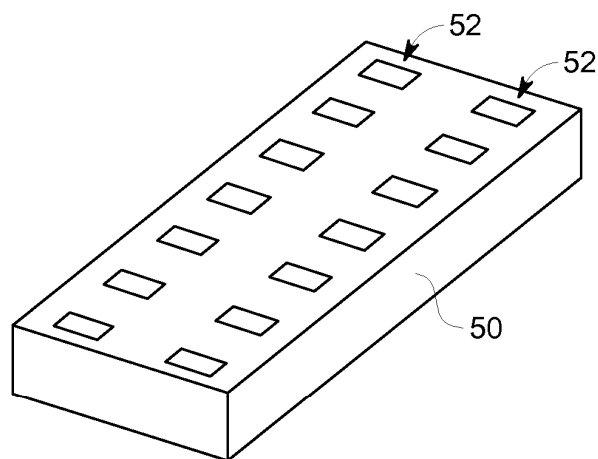


FIG. 12a

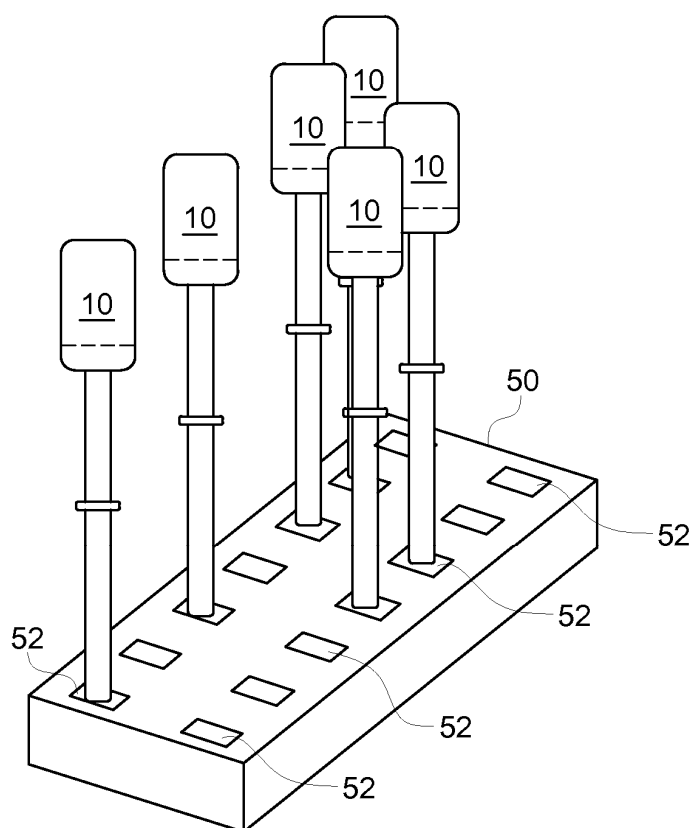


FIG. 12b