



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 291 246**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01114412 .8**

86 Fecha de presentación : **15.06.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1167541**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2002**

54 Título: **Procedimiento para adquirir datos para el diagnóstico presintomático o prenatal de neurofibromatosis del tipo 1.**

30 Prioridad: **27.06.2000 EP 00113607**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2008**

73 Titular/es: **Von Recklinghausen Gesellschaft e.V.  
Bundesverband Neurofibromatose  
Martinistrasse 52 / Haus O 54  
20246 Hamburg, DE**

72 Inventor/es: **Kluwe, Lan**

74 Agente: **Roeb Díaz-Álvarez, María**

**ES 2 291 246 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

Procedimiento para adquirir datos para el diagnóstico presintomático o prenatal de neurofibromatosis del tipo 1.

5 La invención se refiere a un procedimiento para adquirir datos para la preparación del diagnóstico presintomático o prenatal de neurofibromatosis del tipo 1.

10 Del estado de la técnica se conocen procedimientos de este tipo. Principalmente sirven para determinar de forma temprana, entre otras (en la medida de lo posible), de forma prenatal, la probabilidad de la aparición repetida de una enfermedad hereditaria en hijos de padres afectados por una enfermedad hereditaria, o en sus nietos. En el estado de la técnica, para este fin se efectuó un análisis de mutación del segmento de ADN que codifica el gen correspondiente, que caracteriza la enfermedad hereditaria, para la preparación del diagnóstico correspondiente. Una de estas enfermedades del gen supresor tumoral son las neurofibromatosis heredadas de forma autosómica dominante. Las neurofibromatosis se presentan en dos tipos, el "tipo periférico", llamado tipo 1, que corresponde aproximadamente al 85% de los casos, y el "tipo central", llamado tipo 2, que corresponde aproximadamente al 15% de los casos. El tipo 1 se presenta con una frecuencia de aproximadamente 1:3000, mientras que el tipo 2 se presenta con una frecuencia de aproximadamente 1:35000. En cuanto al cuadro de síntomas clínicos, se remite a los textos médicos especializados correspondientes.

20 Sin embargo, una desventaja del análisis de mutación conocido del estado de la técnica es que requiere mucho tiempo. Así por ejemplo, el gen de la neurofibromatosis del tipo 1 en el cromosoma 17 (gen NF-1) presenta 60 exones. Un examen completo de este gen con la ayuda del análisis de mutación tarda más de cuatro meses. Aunque el gen de la neurofibromatosis del tipo 2 en el cromosoma 22 (gen NF2) es menor porque sólo presenta 17 exones, un examen completo del gen también tarda más de un mes. Además, en el análisis de mutación conocido, es una desventaja, que en las personas de riesgo sólo será posible un diagnóstico seguro por genética molecular cuando se haya encontrado una mutación en los afectados

30 Por ejemplo, de la publicación de C. L. Wu y col. "Differential Diagnosis of Type 2 Neurofibromatosis: Molecular Discrimination of NF2 and sporadic vestibular schwannomas" Journal of Medical Genetics, tomo 35, N° 12, diciembre de 1998 (1998-12), páginas 973-977, XP008019307 ISSN: 0022-2593 también se conoce un procedimiento del tipo nombrado inicialmente. En este procedimiento conocido, en pacientes de los que no se sabe unívocamente si padecen neurofibromatosis, se examina material tumoral de al menos dos tumores de estos pacientes y sangre de estos pacientes, para constatar si estos pacientes han enfermado de neurofibromatosis. Para esto, se busca una mutación correspondiente en el ADN del paciente. Además, este estado de la técnica da a conocer que cuando se constató una enfermedad en el paciente, en los hijos del paciente puede excluirse el riesgo de una enfermedad cuando estos hijos no muestran las mismas mutaciones. Como ya se expuso anteriormente, tales análisis de mutación sin embargo son desventajosos, porque sólo posibilitan una evaluación correcta del riesgo si se encuentra una mutación en los hijos. Si no se encuentra mutación, no es posible una evaluación segura del riesgo para hijos del paciente.

40 De la publicación "CLINICAL APPLICATION OF GENETIC POLYMORPHISM IN NEUROFIBROMATOSIS TYPE 1" de M. Clementi, Stefania Boni, Isabella Mammi, M. Favarato y R. Tenconi, de la revista Annales de Génétique, Francia, 1996, tomo 39, N° 2, páginas 92-96, XP008019271, ISSN: 0003-3995 se conoce un procedimiento mediante el cual se han examinado individuos reconocidos como enfermos de familias que poseen el gen NF1. Se aisló ADN de la sangre y se examinó mediante PCR para determinar una serie de polimorfismos.

45 Por ello, el objetivo de la presente invención es mejorar un procedimiento del tipo nombrado al comienzo de esta descripción.

Este objetivo se alcanza conforme a la invención, en un procedimiento del tipo nombrado inicialmente, mediante un procedimiento conforme a la reivindicación 1.

50 Las ventajas del procedimiento conforme a la invención particularmente consisten en que puede llevarse a cabo muy rápidamente. Así, el procedimiento conforme a la invención en todo caso puede llevarse a cabo en un tiempo máximo de dos semanas; sin embargo, en un procedimiento acelerado también puede llevarse a cabo en aproximadamente dos días. Esta rapidez del procedimiento conforme a la invención es particularmente importante en el diagnóstico prenatal. Además, el procedimiento conforme a la invención debido a su sencillez también es considerablemente más económico que el análisis de mutación, conocido del estado de la técnica.

60 Demostró ser especialmente conveniente en el procedimiento conforme a la invención que en los casos en los que en el análisis de mutación conocido no pueda encontrarse ninguna mutación en el paciente examinado, el procedimiento conforme a la invención en casos esporádicos brinda la única posibilidad de excluir o confirmar neurofibromatosis del tipo 1 a nivel molecular. Es particularmente importante la exclusión de la neurofibromatosis, porque desde el punto de vista estadístico, en aproximadamente el 50% de las personas de riesgo puede excluirse la posibilidad de la enfermedad. De esta manera, mediante la invención no sólo pueden ahorrarse el análisis de mutación y exámenes costosos, sino que a las personas de riesgo examinadas también se les alivia el temor de haber heredado la enfermedad. También se evitan exámenes clínicos costosos.

65 En una realización preferida, en el caso de los marcadores se trata de segmentos de ADN relativamente cortos (hasta 300 pares de bases), flanqueadores de genes o intragénicos. Esto ofrece la ventaja de que por ejemplo puede

## ES 2 291 246 T3

usarse material tumoral que se encuentra en un bloque de parafina, que por ejemplo se obtuvo de una operación de tumores dérmicos en el caso de neurofibromatosis, ya que es posible amplificar segmentos cortos de ADN a partir de la mayoría de los bloques de parafina existentes. Debe considerarse como ventaja especial que particularmente en neurofibromatosis puede obtenerse fácilmente el material tumoral mediante intervenciones externas.

5

En otra realización preferida, se amplifican al menos cuatro marcadores diferentes. De esta manera, para un diagnóstico posterior se crea una mejor base de datos que excluye posibles falsas evaluaciones inconvenientes.

En otra realización ventajosa de la invención, se prepara el diagnóstico de la neurofibromatosis del tipo 1. A este fin, se usa al menos un marcador microsatélite polimorfo del intrón 27 del gen NF-1. Además, se prefiere usar por lo menos otro marcador microsatélite polimorfo, del intrón 38 del gen NF-1. Se logran resultados óptimos, si en total se usan tres o cuatro marcadores de los intrones nombrados. Esto es conveniente, porque se demostró que en un número mayoritario de los pacientes de riesgo examinados, al menos uno de los marcadores nombrados es informativo. Un marcador es informativo en una persona cuando el segmento correspondiente de ADN es polimorfo y está presente en dos longitudes diferentes en ambas copias del genotipo. De esta manera, mediante los marcadores nombrados se asegura con alta probabilidad que en la representación gráfica de los marcadores resultan dos picos debido a las longitudes diferentes.

Entonces, como paso preparativo para el diagnóstico, un médico puede comparar los dos picos de la representación gráfica de los marcadores de la sangre del paciente examinado con el resultado de la representación gráfica de la longitud de los marcadores microsatélite de ADN del tumor, para detectar una posible PDH (pérdida de heterocigocia = PDH). La invención aquí incluye el reconocimiento de que los neurofibromas de las personas a quienes se ha extraído material tumoral en el 30% de los casos presentan una pérdida de la heterocigocia cuando se trata de la neurofibromatosis del tipo 1. En el caso de tumores asociados a la neurofibromatosis del tipo 2, la frecuencia de la PDH es aún mayor. De esta manera y debido al hecho de que los pacientes de NF-1 presentan muchos neurofibromas, la probabilidad de que la PDH esté presente en alguno de los neurofibromas del enfermo es muy alta y también lo es la probabilidad de que por ello también esté presente en el material tumoral puesto a disposición y pueda ser reconocida. La PDH entonces se reconoce en la representación gráfica de los marcadores, porque en el material tumoral puede reconocerse sólo un pico o un desequilibrio de los dos picos del marcador correspondiente. Ambas cosas significan que el tumor correspondiente ha perdido un alelo. Después de detectar una PDH, se examina el mismo marcador a partir de la sangre de la persona de riesgo.

En otra realización ventajosa de la invención, los pasos c), e), g), i) se repiten al menos una vez. De esta manera puede examinarse o confirmarse nuevamente una pérdida de un alelo. De esta forma puede lograrse una confirmación de los primeros resultados, si en una PDH la pérdida del alelo también se confirma en al menos otra determinación.

En otra realización preferida, tal PDH se examina en al menos otro tumor del paciente afectado, es decir, se llevan a cabo los pasos antes nombrados con al menos otro tumor del paciente afectado, si éste está a disposición. De esta forma puede aumentarse aún más la fiabilidad de los datos obtenidos. Esto particularmente es conveniente para el diagnóstico prenatal.

Otro ejemplo de realización de la invención también lleva a cabo los pasos b), d), f), h) y j) con la sangre del progenitor no afectado, en el caso de que paciente de riesgo sea un niño de ambos progenitores. De esta forma, pueden detectarse alelos no afectados. Esto, por un lado sirve también para aumentar la fiabilidad de los datos obtenidos y por otro lado, en ciertos casos es indispensable para evaluar los datos obtenidos para el diagnóstico. Como ejemplo, es de mencionar que es posible que en la representación gráfica de los alelos del paciente afectado se demuestre que posee los alelos A y B. En la representación gráfica de los alelos del paciente de riesgo, es decir, en este caso, del hijo del paciente afectado, se demuestra que el hijo también posee los alelos A y B. En la representación gráfica del material tumoral del paciente afectado se demuestra que en el tumor se ha perdido el alelo A. En tal caso, los datos obtenidos serían una base insegura para un diagnóstico correcto, porque no está claro cuál de los alelos A y B proviene del afectado. En este caso, en la presente realización se analiza la sangre del progenitor no afectado. De esta forma se averigua qué alelos provienen del progenitor no afectado. Si en el presente caso el progenitor no afectado tiene los alelos A y C, está claro que el alelo A sólo puede provenir del progenitor no afectado. En este ejemplo entonces estaría igualmente claro que el alelo B, que probablemente sea exclusivamente responsable de la enfermedad del progenitor afectado, haya sido heredado por el hijo. Por ello, el hijo en este caso presenta un riesgo aumentado de enfermar.

En el caso de NF2, demostró ser ventajoso usar al menos un marcador CRYB2, D22S275, NF2CA3, D22S268, D22S430.

La totalidad de los datos proporcionados mediante el procedimiento conforme a la invención y su procesamiento gráfico entonces posibilitan al médico que finalmente emite el diagnóstico evaluar si en el paciente de riesgo examinado puede excluirse la enfermedad. Porque si por ejemplo el médico que examina constata que el alelo que todavía se encuentra en el tumor no fue heredado del pariente, (como, por ejemplo, en el ejemplo representado más adelante) puede excluirse la aparición de la correspondiente enfermedad del gen supresor de tumores.

Sin embargo, además, el médico también puede emitir un diagnóstico cuando el paciente de riesgo ha heredado el alelo remanente en el tumor.

## ES 2 291 246 T3

En tal caso, resultan dos posibilidades de diagnóstico:

1. Si en tal caso, por ejemplo los abuelos del paciente de riesgo ya habían sido afectados por la correspondiente enfermedad del gen supresor de tumores, puede suponerse que el paciente de riesgo también ha heredado la enfermedad.
2. En cambio, si la enfermedad apareció por primera vez en los progenitores afectados (esporádicamente), por el otro lado existe la posibilidad de que se trate de la formación de un mosaico, con una probabilidad del 20 al 30%, de manera que habrá una probabilidad reducida de que el paciente de riesgo haya heredado la modificación genética de los progenitores afectados por la enfermedad del gen supresor tumoral.

El procedimiento conforme a la invención puede usarse particularmente para la preparación del diagnóstico pre-sintomático y prenatal de neurofibromatosis. A continuación, como ejemplo de realización de la presente invención, se explica la aplicación del procedimiento en pacientes con riesgo de neurofibromatosis:

### 1. *Material: Sangre y material tumoral*

Se dispone de material tumoral en forma de bloques de parafina de un gran número de pacientes, debido a la operación de tumores dérmicos deformantes de NF1. En cualquier momento puede efectuarse sin complicaciones la extirpación de un tumor por razones cosméticas. Además, existe una reserva de material tumoral congelado. Todos los tumores existentes de un paciente se incluyen en el análisis conforme a la invención.

### 2. *Aislamiento de ADN*

De la sangre y del material tumoral del paciente que se examina se aísla ADN mediante los kits QIAquick Blood y QIAquick Tissue Kit de la empresa Qiagen. El procedimiento está descrito por la empresa en las instrucciones para el kit.

### 3. *Marcadores polimorfos*

Se amplifican cuatro marcadores microsatélite polimorfos a partir del ADN de la sangre y del tumor, que se encuentran en los intrones 27 y 38 del gen NF-1. De cada paciente al menos dos de estos cuatro marcadores deberían ser informativos; de lo contrario se usará un marcador adicional.

### 4. *Amplificación de los marcadores*

Con cebadores (oligonucleótidos) de aproximadamente 20 a 24 pares de bases, que flanquean el extremo de los segmentos de ADN que varían en su longitud, se amplifican los marcadores mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Este proceso de amplificación se lleva a cabo en 10  $\mu$ l de solución de reacción que contiene ADN sanguíneo o tumoral, oligonucleótidos como cebadores, dNTPs, tampones, polimerasa de Taq y agua. La PCR se lleva a cabo en un termociclador. Para el siguiente análisis, se marcan los cebadores con colorante fluorescente.

### 5. *Análisis de los marcadores amplificados*

Se mezclan en conjunto de 0,1 a 1  $\mu$ l de cada uno de los cuatro marcadores amplificados. Para esto se añade 0,5 de patrón de longitud ROX (empresa ABI) y 12  $\mu$ l de formamida desmineralizada. Se carga esta muestra desnaturalizada por proceso de separación de un analizador Genetic Analyser AB1310. En este proceso de separación se desprenden los segmentos de ADN, clasificados por sus diferentes longitudes. Los resultados se representan gráficamente mediante el programa GeneScan (empresa ABI). De esta manera, los segmentos de ADN se representan en su longitud y cantidad diferentes.

### 6. *Evaluación del análisis de los marcadores*

Cuando un marcador de una persona es informativo, aparecen dos picos en la representación gráfica de los marcadores de la sangre de la persona. Se comparan estos datos con los resultados del análisis del material tumoral. Si un tumor presenta sólo un pico respecto a este marcador, o un desequilibrio de los dos picos de los marcadores, esto significa que el tumor ha perdido un alelo.

7. Para preparar el diagnóstico, puede compararse entonces este resultado con una representación gráfica preparada de forma correspondiente, de los marcadores de la sangre de un paciente de riesgo. Además, se preparan de manera correspondiente los marcadores de la sangre del progenitor sano.

Para mayor explicación de las ventajas de la invención, a manera de ejemplo, se ilustra un resultado del procedimiento conforme a la invención mediante el dibujo adjunto. El dibujo muestra:

la fig. 1 es una representación de marcadores microsatélite de ADN, separados por longitud, que fueron amplificados a partir del ADN de la sangre de un afectado;

## ES 2 291 246 T3

la fig. 2 es una muestra de la representación gráfica por longitud de los mismos marcadores que los de la figura 1, que fueron amplificados a partir de material tumoral del afectado; y

5 la fig. 3 es una muestra de la representación gráfica por longitud de los mismos marcadores, que fueron amplificados a partir de ADN de la sangre de un descendiente del afectado conforme a las figuras 1 y 2.

10 La figura 1 muestra una representación de marcadores microsatélite de ADN separados por su longitud, que fueron amplificados a partir del ADN de la sangre de un afectado. La representación gráfica representa respectivamente la presencia de los alelos que en la figura se denominan alelo 2 y alelo 3. La figura 2 muestra la representación gráfica de la longitud de los mismos marcadores que los de la figura 1, que fueron amplificados a partir de material tumoral del afectado. Se reconoce, que el alelo que en la figura 1 se denomina alelo 3 se ha perdido en el tumor del afectado. La figura 3 muestra una representación gráfica por longitud de los mismos marcadores, que fueron amplificados a partir del ADN de la sangre de un descendiente del afectado conforme a las figuras 1 y 2. En la figura 3 se reconoce que el descendiente del afectado no ha heredado el alelo 2 que todavía está presente en el tumor. El descendiente, de los alelos 15 2 y 3 sólo ha heredado el alelo 3, que se ha perdido en el tumor. Como otro alelo, el descendiente además ha heredado el alelo 1, del otro progenitor. Para preparar el diagnóstico del descendiente, de esta manera puede afirmarse que el descendiente no ha heredado el alelo que en forma probable es el alelo exclusivamente responsable de la enfermedad.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

5 1. Procedimiento para adquirir datos para la preparación del diagnóstico presintomático o prenatal de neurofibromatosis del tipo 1 en un paciente de riesgo, con los pasos:

- 10 a) se aísla ADN tumoral a partir de material tumoral de un pariente que padece la enfermedad del gen supresor tumoral del paciente de riesgo,
- 15 b) se aísla ADN sanguíneo de la sangre del pariente,
- 20 c) a partir del material tumoral se amplifican al menos dos marcadores microsatélite polimorfos de ADN,
- 25 d) se amplifican los marcadores microsatélite polimorfos de ADN a partir de la sangre,
- 30 e) se separan por longitud los al menos dos marcadores microsatélite polimorfos de ADN del material tumoral,
- 35 f) se separan por longitud los al menos dos marcadores microsatélite polimorfos de ADN de la sangre,
- 40 g) se representan las longitudes de los marcadores microsatélite polimorfos de ADN a partir del material tumoral,
- 45 h) se representan las longitudes de los marcadores microsatélite polimorfos de ADN a partir de la sangre,
- 50 i) se repiten los pasos b), d), f) h) con la sangre del paciente de riesgo, tratándose en el caso de los marcadores de marcadores que flanquean un gen de la neurofibromatosis o de marcadores intragénicos, tratándose en el caso del pariente de un progenitor del paciente de riesgo.

55 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en el caso de los al menos dos marcadores polimorfos se trata de marcadores cortos, preferentemente de una longitud de aproximadamente 300 pares de bases.

60 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que se usan al menos tres, más preferentemente cuatro marcadores diferentes.

65 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos uno de los marcadores se encuentra en el intrón 27 del gen de la neurofibromatosis del tipo 1.

70 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos uno de los marcadores se encuentra en el intrón 38 del gen de la neurofibromatosis del tipo 1.

75 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, que comprende los siguientes pasos adicionales: los pasos a), c), e), g) se repiten al menos una vez.

80 7. Procedimiento según la reivindicación 6, que comprende los siguientes pasos adicionales:

los pasos a), c), e), g) se repiten con al menos un tumor adicional del pariente.

85 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, que comprende los siguientes pasos adicionales:

los pasos b), d), f), h) se llevan a cabo también con la sangre del progenitor no afectado, si en el caso del paciente de riesgo se trata de un hijo de ambos progenitores.

90

95

100

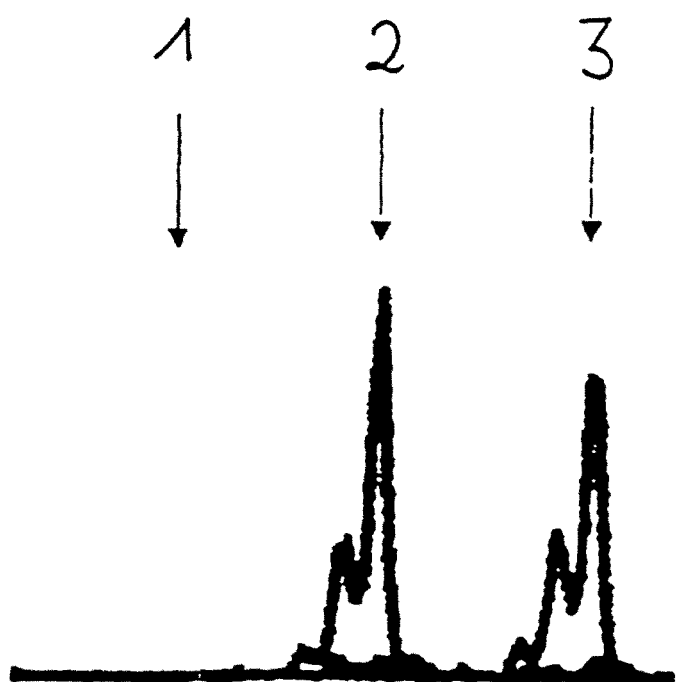


Fig. 1

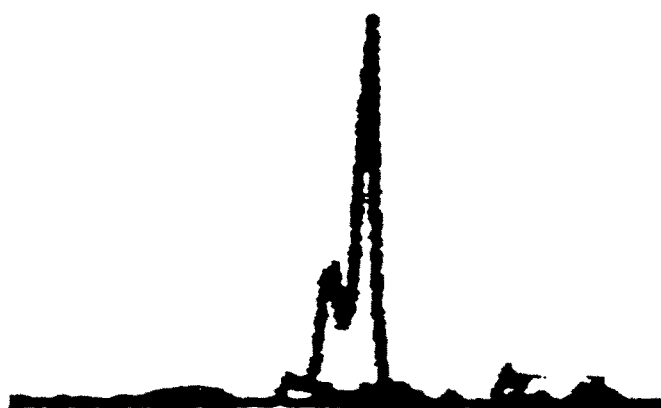


Fig. 2

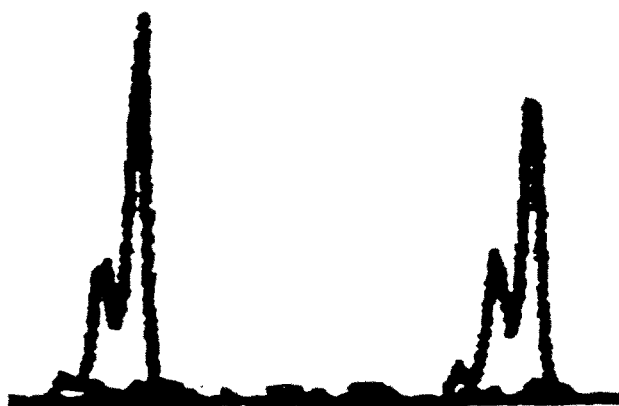


Fig. 3