



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 636**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03724916 .6**

96 Fecha de presentación : **26.02.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1478781**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.2004**

54 Título: **Marcadores microsatélites de repeticiones mononucleótido para detectar la inestabilidad de los microsatélites.**

30 Prioridad: **28.02.2002 EP 02290483**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.09.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.09.2010**

73 Titular/es: **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET  
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es: **Hamelin, Richard y  
Suraweera, Nirosha**

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

**ES 2 344 636 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

Marcadores microsatélites de repeticiones mononucleótido para detectar la inestabilidad de los microsatélites.

5 La invención se refiere a nuevos marcadores microsatélites y su uso para la detección de la inestabilidad de los microsatélites (MSI) asociada con algunos tumores.

Los microsatélites son motivos de ADN cortos (1-10 pares de bases), que se dan como repeticiones en tándem en numerosos loci por todo el genoma.

10 El fenotipo de inestabilidad de microsatélite (MSI) se define como la presencia en ADN tumoral de microsatélites de tamaño alternativo que no se ven en el ADN germinal correspondiente (AALTONEN *et. al.*, Science, 260(5109), 812-816, 1.993; IONOV *et. al.*, Nature, 363(6429), 558-561, 1.993; THIBODEAU *et. al.*, Science, 260(5109), 816-819, 1.993; IACOPETTA *et. al.*, Hum. Mutat., 12(5), 355-360, 1.998).

15 El fenotipo MSI es una característica del síndrome de cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC), en el que puede detectarse en más del 90% de todos los tumores HNPCC (LIU *et. al.*, Nature Med., 2, 169-174, 1.996); también se da en aproximadamente el 15% de los tumores gástricos y de colon esporádicos. También se ha detectado en otros tumores, como los carcinomas pancreáticos (HAN *et. al.*, Cancer Res., 53, 5087-5089, 1.993), carcinomas de próstata (GAO *et. al.*, Oncogene, 9, 2999-3003, 1.994), carcinomas del endometrio (RISINGER *et. al.*, Cancer Res., 53, 5100-5103, 1.993; PELTOMAKI *et. al.*, Cancer Res., 53, 5853-5855, 1.993).

20 La MSI refleja un defecto de la reparación de apareamientos incorrectos (MMR) subyacentes que no reconoce los errores introducidos durante la replicación de las secuencias microsatélite. En el síndrome del cáncer familiar HNPCC, el fenotipo MSI es causado por mutaciones germinales en los genes *hMSH2*, *hMLH1* de reparación de apareamientos incorrectos (MMR) y menos frecuentemente en *hPMS1*, *hPMS2* y *hPMS6* (KINZLER *et. al.*, Cell, 87, 159-170, 1.996). En los cánceres esporádicos a menudo suele ser causado por metilación del promotor *hMLH1* que lleva al silenciamiento transcripcional de este gen (HERMAN *et. al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(12), 6870-6875, 1.998).

30 Los tumores gástricos y de colon MSI tienen unos perfiles clinicopatológicos y moleculares distintivos y a menudo suelen asociarse con una prognosis favorable (LOTHE *et. al.*, Cancer Res., 53, 5849-5852, 1.993; KIM *et. al.*, Am. J. Pathol., 145, 148-156, 1.994; OLIVEIRA *et. al.*, Am. J. Pathol., 153, 1211-1219, 1.998). También existe evidencia que sugiere que los pacientes de cáncer colorrectal con tumores MSI muestran un buen beneficio de supervivencia de la quimioterapia basada en 5FU (ELSALEH *et. al.*, The Lancet, 355, 1745-1750, 2.000; LIANG *et. al.*, Int. J. Cancer, 101, 519-525, 2.002) y por tanto la MSI podría resultar un marcador predictivo molecular útil para responder a este tipo de terapia adyuvante. El análisis de rutina del estado MSI también tiene una aplicación clínica para ayudar en el diagnóstico de casos de HNPCC sospechosos (AALTONEN *et. al.*, N. Eng. J. Med., 338, 1481-1487, 1.998). De hecho, los tumores de pacientes HNPCC carecen de las características fenotípicas que los distinguen fácilmente de tumores esporádicos y por tanto el diagnóstico de esta enfermedad se basó históricamente en la historia familiar del cáncer utilizando por ejemplo el criterio de Ámsterdam (VASEN *et. al.*, Dis. Colon Rectum, 34, 424-425, 1.991; VASEN *et. al.*, Gastroenterology, 115, 1453-1456, 1.999). Tales criterios resultan sin embargo demasiado restrictivos e identifican sólo una fracción de familias HNPCC de manera que no se conoce la incidencia verdadera de esta enfermedad y las estimaciones varían desde el 0,5 hasta el 13%. Dado que los portadores familiares de defectos MMR tienen un riesgo mayor del 80% de desarrollar cáncer, resulta importante idear maneras eficaces y rentables de detectar esta condición. Con este fin, se están desarrollando en la actualidad métodos de laboratorio basados en moléculas que pueden ayudar a establecer el diagnóstico de HNPCC. Se proponen en general dos métodos: genotipificación de microsatélites e inmunohistoquímica de las proteínas de reparación de apareamientos incorrectos principales. El uso de uno u otro, o ambos métodos todavía es una cuestión de debate, basada en su coste, especificidad y eficacia relativos (LINDOR *et. al.*, J. Clin. Oncol., 20, 1043-1048, 2.002; WAHLBERG *et. al.*, Cancer Res., 62, 3485-3492, 2.002; TERDIMAN *et. al.*, Gastroenterology, 120, 21-30, 2.001; LOUKOLA *et. al.*, Cancer Res., 61, 4545-4549, 2.001). Por ahora parece que la genotipificación de microsatélites tiene una mayor sensibilidad que la IHC, pero es más cara y más difícil de configurar en laboratorios de rutina. Por tanto resulta importante desarrollar métodos simples y precisos para determinar los tumores MSI para las informaciones de diagnóstico-pronóstico y predisposición.

55 Los investigadores han estudiado numerosos microsatélites diferentes con el objetivo de identificar tumores MSI.

Dependiendo del tipo y número de microsatélites analizados, se han publicado resultados muy variables de frecuencia de MSI en tipos de tumores diferentes (PERUCHO, Cancer Res., 59(1), 249-256, 1.999).

60 Se ha propuesto el uso de una combinación de marcadores BAT-25 y BAT-26 para la detección de MSI (ZHOU *et. al.*, Genes, Chromosomes & Cancer, 21(2), 101-107, 1.998; HOANG *et. al.*, Cancer Res., 57(2), 300-303, 1.997).

65 El BAT-25 y BAT-26 son repeticiones de mononucleótidos situados respectivamente en el intrón 16 de *c-kit* y el intrón 5 de *hMSH2*. Estas dos repeticiones son cuasimonomórficas en las poblaciones caucásicas (HOANG *et. al.*, Cancer Res., 57(2), 300-303, 1.997; ZHOU *et. al.*, Oncogene, 15(14), 1713-1718, 1.997). Esta propiedad permite una clasificación rápida de las variaciones de tamaño alélicas grandes vistas en el ADN tumoral MSI debidas a una alteración somática. En la gran mayoría de los tumores, el análisis de BAT-25 y BAT-26 resulta suficiente para establecer su estado MSI sin referencia al ADN germinal (ZHOU *et. al.*, Genes, Chromosomes & Cancer, 21(2), 101-107, 1.998).

## ES 2 344 636 T3

Sin embargo, se han identificado los alelos de BAT-25 y BAT-26 de tamaño alternativo en 18,4 y 12,6%, respectivamente, de americanos africanos (PYATT *et. al.*, *Am. J. Pathol.*, 155(2), 349-353, 1.999; SAMOWITZ *et. al.*, *Am. J. Pathol.*, 154(6), 1637-1641, 1.999). De esta manera, puede necesitarse el análisis de repeticiones adicionales para evitar el resultado de falsos positivos ocasionales que surgen de estos polimorfismos germinales.

5

Por consiguiente se ha propuesto completar el análisis de repeticiones de mononucleótidos mediante el análisis adicional de repeticiones de dinucleótidos tanto en el tumor como en el ADN germinal.

Por ejemplo, la patente US 6.150.100 propone el uso de 2 repeticiones de mononucleótidos seleccionados de entre BAT25, BAT26 y BAT40, asociadas con 2 ó 3 repeticiones de dinucleótidos seleccionados de entre APC, Mfd15, D2S123, y D18S69, y opcionalmente con la repetición de pentanucleótidos TP53Alu. Las combinaciones mencionadas de marcadores microsatélites descritos en la patente US 6.150.100 son BAT25, BAT26, APC, Mfd15 y D2S123 ó BAT26, BAT40, APC, Mfd15 y D2S123.

En 1.997 una reunión de consenso internacional sobre la detección de MSI recomendó un panel de cinco marcadores para el análisis uniforme del estado MSI (BOLAND *et. al.*, *Cancer Res.*, 58(22), 5248-5257, 1.998). Esto incluía dos repeticiones de mononucleótidos (BAT-25 y BAT-26) y tres repeticiones de dinucleótidos (D5S346, D2S123 y D17S250). Los tumores con inestabilidad en dos o más de estos marcadores se definieron como MSI-H. Los tumores con inestabilidad en un marcador, y sin inestabilidad se definieron como MSI-L y MSS respectivamente. Los cánceres MSI-H tienen unas características clinicopatológicas distintas de los tumores MSI-L y MSS.

Algunas de las características de las repeticiones de dinucleótidos hacen su uso como marcadores del estado MSI un tanto problemático. Las repeticiones de dinucleótidos en los paneles anteriormente indicados muestran generalmente inestabilidad en sólo el 60-80% de los tumores MSI-H (SUTTER *et. al.*, *Mol. Cell Probes*, 13(2), 157-165, 1.999). Existe alguna evidencia para sugerir que la pérdida de MMR y la posterior alteración de las repeticiones de mononucleótidos sucede más temprano en la ruta de progresión del tumor MSI-H que la mutación de las repeticiones de dinucleótidos (PERUCHO *et. al.*, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 59, 339-348, 1.994). Además, algunas líneas de células MSI con deficiencia MMR causada por mutación del *hMSH6* no muestran alteración en las repeticiones de dinucleótidos (AKIYAMA *et. al.*, *Cancer Res.*, 57(18), 3920-3923, 1.997). Por tanto la deficiencia MMR subyacente que afecta las repeticiones de mononucleótidos y dinucleótidos puede ser diferente y el análisis de ambas puede llevar a una mala interpretación del estado MSI de algunos tumores. En muchos casos el análisis de repeticiones de dinucleótidos no añade información adicional a los resultados obtenidos mediante el análisis de repeticiones de mononucleótidos (DIETMAIER *et. al.*, *Cancer Res.*, 57(21), 4749-4756, 1.997; LOUKOLA *et. al.*, *Cancer Res.*, 61(11), 4545-4549, 2.001).

35

Además, a diferencia de las repeticiones de mononucleótidos como BAT-25 Y BAT-26, las repeticiones de dinucleótidos son altamente polimórficas. Por tanto, su uso para la identificación de MSI en el ADN tumoral siempre requiere el análisis del ADN germinal correspondiente.

Esto hace que el proceso de cribado de MSI sea considerablemente más caro y requiera más tiempo, así como la introducción de errores potenciales debido al mezclado de las muestras de ADN tumoral y germinal. Además, la interpretación de las alteraciones de tamaño en estas repeticiones de dinucleótidos resulta difícil y puede llevar a una mala clasificación (PERUCHO, *Cancer Res.*, 59(1), 249-256, 1.999). Finalmente, en muchas situaciones el ADN germinal de pacientes con cáncer no está disponible fácilmente.

45

Por todas estas razones, los métodos que utilizan BAT-25 Y BAT-26 ya sea solos, o en combinación con repeticiones de dinucleótidos no resultan totalmente satisfactorios para la determinación precisa del estado MSI en tumores humanos y existe una necesidad urgente de mejora.

De esta manera, se necesitan repeticiones de mononucleótidos cuasi monomórficos múltiples para el diagnóstico preciso de los tumores MSI.

Los inventores han identificado recientemente nuevas repeticiones de mononucleótidos que se conservan en el ADN germinal de sujetos caucásicos y africanos y que, similar a BAT-25 Y BAT-26, son altamente sensibles a la delección somática en los tumores MSI-H.

55

Tres de estos nuevos marcadores microsatélites son repeticiones poli(T) denominadas en lo sucesivo en la presente memoria NR21, NR22, y NR24.

El marcador NR21 es una repetición 21T identificada en la región no traducida 5' del gen SLC7A8 (secuencia de ADNc GenBank XM\_033393).

El marcador NR22 es una repetición 22T identificada en la región no traducida 3' del gen de la proteína B5 precursora transmembrana putativa (secuencia de ADNc GenBank L38961).

65

El marcador NR24 es una repetición 24T identificada en la región no traducida 3' del gen dedos de cinc-2 (secuencia de ADNc GenBank X60152).

## ES 2 344 636 T3

Un cuarto marcador microsatélite, denominado en lo sucesivo en la presente memoria NR27, es una repetición 27A identificada en la región no traducida 5' del gen de la proteína 1 inhibidora de la apoptosis (secuencia de ADNc GenBank AF070674).

5 Los marcadores NR21, NR22, NR24 y NR27 resultan útiles para la evaluación de la inestabilidad de microsatélites en el diagnóstico de tumores.

La invención proporciona así un método para evaluar la inestabilidad de microsatélites asociada con un tumor, mediante amplificación de los loci de los microsatélites en una muestra biológica de ADN genómico de dicho tumor y la determinación de los tamaños de los productos de amplificación del ADN, *caracterizado porque* dicho método comprende la amplificación del locus NR21 del microsatélite.

De acuerdo con una forma de realización preferente de la invención, dicho método comprende la amplificación de los dos loci NR21 y NR24 del microsatélite, y la amplificación de un tercer locus del microsatélite seleccionado de entre NR22 y NR27.

Ventajosamente, dicho método comprende adicionalmente la amplificación de por lo menos un locus del microsatélite diferente de NR21, NR22, NR24 y NR27. Preferentemente, dicho locus del microsatélite es un locus de una repetición mononucleótido. Más preferentemente este locus de repetición mononucleótido se selecciona de entre BAT-25 y BAT-26.

De acuerdo con una forma de realización concreta, el método de la invención comprende la amplificación de los cinco loci del microsatélite BAT-25, BAT-26, NR21, NR22 y NR24.

De acuerdo con otra forma de realización concreta, el método de la invención comprende la amplificación de los cinco loci del microsatélite BAT-25, BAT-26, NR21, NR27 y NR24.

La inestabilidad de microsatélite en cada uno de estos loci se evalúa mediante comparación del tamaño del producto de amplificación obtenido del ADN tumoral con el tamaño del producto de amplificación obtenido del ADN normal (es decir, no tumoral) con el mismo conjunto de cebadores.

Esta comparación puede llevarse a cabo de una manera convencional, obteniendo un producto de amplificación del ADN normal del mismo sujeto con el mismo conjunto de cebadores, y utilizándolo como referencia.

50 Sin embargo, la presente invención hace posible, en la mayoría de los casos, evitar la necesidad de amplificar el ADN normal del mismo sujeto. En cambio, la comparación puede hacerse mediante referencia al tamaño medio de los productos de amplificación obtenidos de los ADNs normales de un pool de sujetos con el mismo conjunto de cebadores. En estos casos, la inestabilidad de los microsatélites se asume en el caso del locus BAT-26 si el tamaño del producto de amplificación obtenido del ADN tumoral es más corto en más de 3 pb que el tamaño medio del producto de amplificación obtenido a partir del ADN normal utilizando el mismo conjunto de cebadores, y en el caso de los loci BAT-25, NR21, NR22, NR25 y NR27, si el tamaño del producto de amplificación obtenido a partir del ADN tumoral es más corto en más de 2 pb que el tamaño medio del producto de amplificación obtenido a partir del ADN normal utilizando el mismo conjunto de cebadores.

45 El ADN genómico tumoral puede obtenerse a partir de fuentes diferentes que incluyen principalmente biopsias o tejidos tumorales, o fluidos o secreciones corporales que contienen células tumorales diseminadas, tejido embebido en parafina.

La invención también proporciona unos reactivos para llevar a cabo el método de la invención.

50 En concreto, un objeto de la invención es el uso de pares de cebadores adecuados para la amplificación del locus NR21 del microsatélite para la evaluación *in vitro* de la inestabilidad de microsatélite asociada con un tumor. La invención también proporciona unos kits para la evaluación de la inestabilidad de microsatélite, cebadores de asociación adecuados para la amplificación del locus NR21 del microsatélite con unos cebadores adecuados para la amplificación de NR24 y opcionalmente con unos cebadores adecuados para la amplificación de NR22 y/o NR27.

Los cebadores adecuados pueden derivarse de las secuencias genómicas que rodean dichos loci del microsatélite.

Por ejemplo:

- 60 - los cebadores que permiten la amplificación de NR21 pueden derivarse de la secuencia genómica GenBank AL117258, y preferentemente de la parte de la misma representada por SEQ ID N°: 1;
- 65 - los cebadores que permiten la amplificación de NR22 pueden derivarse de la secuencia genómica GenBank AP001132, y preferentemente de la parte de la misma representada por SEQ ID N°: 2;
- los cebadores que permiten la amplificación de NR24 pueden derivarse de la secuencia genómica GenBank AC092835, y preferentemente de la parte de la misma representada por SEQ ID N°: 3;

## ES 2 344 636 T3

- los cebadores que permiten la amplificación de NR27 pueden derivarse de la secuencia genómica GenBank AP001167, y preferentemente de la parte de la misma representada por SEQ ID N°: 16.

5 A modo de ejemplo:

- un par de cebadores adecuados para la amplificación de NR21 consisten en los siguientes oligonucleótidos:

10 TAAATGTATGTCTCCCCTGG (SEQ ID N°: 4)  
ATTCTACTCCGCATTCACA (SEQ ID N°: 5)

- un par de cebadores adecuados para la amplificación de NR22 consisten en los siguientes oligonucleótidos:

15 GAGGCTTGTC AAGGACATAA (SEQ ID N°: 6)  
AATTCGGATGCCATCCAGTT (SEQ ID N°: 7)

- un par de cebadores adecuados para la amplificación de NR24 consisten en los siguientes oligonucleótidos:

20 CCATTGCTGAATTTTACCTC (SEQ ID N°: 8)  
25 ATTGTGCCATTGCATTCCAA (SEQ ID N°: 9).

Los cebadores indicados anteriormente dan al ser utilizados en ADN normal, unos productos de amplificación de 104, 143, y 134 pb para NR21, NR22 y NR24 respectivamente.

30 Pueden marcarse ventajosamente con tinciones fluorescentes utilizadas en los ensayos de PCR múltiple. Preferentemente, se utilizarán tinciones fluorescentes diferentes para los cebadores que den unos productos de amplificación de tamaño similar (es decir, con tamaños que difieren en menos de 15-20 pb). Esto permite evitar dudas que podrían resultar de la superposición de los productos de PCR debido a la delección media de 5-12 pb para estos marcadores en los tumores MSI.

35 Si se prefiere no utilizar tinciones fluorescentes diferentes, pueden diseñarse cebadores para dar productos de amplificación de tamaño claramente distinto (es decir con tamaños que difieran en por lo menos 15 pb y preferentemente en por lo menos 20 pb entre marcadores diferentes). Esto permite una separación clara entre los marcadores en base al tamaño mediante técnicas de electroforesis estándares, incluso cuando se delecionan debido a la inestabilidad de microsatélite en el ADN tumoral.

40 Los cebadores que dan productos de amplificación de un tamaño claramente distinto para NR21, NR24 y NR27 son a modo de ejemplo:

- un par de cebadores adecuados para la amplificación de NR21 consiste en los siguientes oligonucleótidos:

45 GAGTCGCTGGCACAGTTCTA (SEQ ID N°: 17);  
50 CTGGTCACTCGCGTTTACAA (SEQ ID N°: 18);

- un par de cebadores adecuados para la amplificación de NR24 consiste en los siguientes oligonucleótidos:

55 GCTGAATTTTACCTCCTGAC (SEQ ID N°: 19);  
ATTGTGCCATTGCATTCCAA (SEQ ID N°: 9);

- un par de cebadores adecuados para la amplificación de NR27 consiste en los siguientes oligonucleótidos:

60 AACCATGCTTGCAAACCACT (SEQ ID N°: 20);  
65 CGATAATACTAGCAATGACC (SEQ ID N°: 21).

Cuando se utilizan en ADN normal, los cebadores anteriormente indicados dan productos de amplificación de 131, 109 y 87 pb para NR21, NR24 y NR27 respectivamente.

## ES 2 344 636 T3

Ventajosamente un kit de la invención comprende por lo menos:

- un par de cebadores adecuados para la amplificación de NR21;
- un par de cebadores adecuados para la amplificación de NR24;
- un par de cebadores seleccionados de entre un par de cebadores adecuados para la amplificación de NR22 y un par de cebadores adecuados para la amplificación de NR27.

De acuerdo con una forma de realización preferente dicho kit comprende adicionalmente por lo menos un par de cebadores adecuados para la amplificación de por lo menos un locus del microsatélite diferente de NR21, NR22, NR24 y NR27. Preferentemente, dicho locus del microsatélite es un locus de repetición mononucleótido. Más preferentemente este locus de repetición mononucleótido se selecciona de entre BAT-25 y BAT-26.

Los cebadores que permiten la amplificación de BAT-26 pueden derivarse de la secuencia genómica GenBank AC0799775, y preferentemente de la parte de la misma representada por SEQ ID N°: 10.

Los cebadores que permiten la amplificación de BAT-25 pueden derivarse de la secuencia genómica GenBank AC092545, y preferentemente de la parte de la misma representada por SEQ ID N°: 11.

A modo de ejemplo, un kit de la invención puede comprender:

- un par de cebadores adecuados para la amplificación de BAT-25, que consiste en los siguientes oligonucleótidos:

TCGCCTCCAAGAATGTAAGT (SEQ ID N°: 12)

TCTGCATTTTAACTATGGCTC (SEQ ID N°: 13);

- un par de cebadores adecuados para la amplificación de BAT-26, que consiste en los siguientes oligonucleótidos:

TGACTACTTTTGACTTCAGCC (SEQ ID N°: 14)

AACCATTCAACATTTTAAACCC (SEQ ID N°: 15);

Cuando se utilizan en ADN normal, los cebadores anteriormente indicados amplifican un fragmento de 121 pb para BAT-26, y 124 pb para BAT-25.

Pueden utilizarse en concreto en un ensayo de PCR múltiple utilizando tinciones fluorescentes diferentes, por ejemplo en combinación con los cebadores NR21 SEQ ID N°: 4 y 5, los cebadores NR22 SEQ ID N°: 6 y 7, y los cebadores NR24 SEQ ID N°: 8 y 9.

Si se prefiere obtener productos de amplificación de tamaño claramente distinto para BAT-25 y BAT-26, se pueden utilizar por ejemplo:

- un par de cebadores adecuados para la amplificación de BAT-25 que consisten en los siguientes oligonucleótidos:

TACCAGGTGGCAAAGGGCA (SEQ ID N°: 22);

TCTGCATTTTAACTATGGCTC (SEQ ID N°: 13);

- un par de cebadores adecuados para la amplificación de BAT-26 que consisten en los siguientes oligonucleótidos:

CTGCGGTAATCAAGTTTTTAG (SEQ ID N°: 23);

AACCATTCAACATTTTAAACCC (SEQ ID N°: 15).

Cuando se utilizan en ADN normal, los cebadores anteriormente indicados dan respectivamente unos productos de amplificación de 153 y 183 pb para BAT-25 y BAT-26.

## ES 2 344 636 T3

Pueden utilizarse ventajosamente en combinación con cebadores NR21 (SEQ ID N°: 17 y 18) y/o cebadores NR24 (SEQ ID N°: 19 y 9) y/o cebadores NR27 (SEQ ID N°: 20 y 21), permitiendo una clara separación de los cinco marcadores en base al tamaño.

5 Opcionalmente, los kits de la invención pueden comprender adicionalmente unos materiales y reactivos apropiados útiles para llevar a cabo la amplificación del ADN.

10 El método, reactivos y kits de la invención pueden utilizarse en las mismas aplicaciones que en los métodos de evaluación de inestabilidad de microsatélite de la técnica anterior. Esto incluye principalmente el diagnóstico del fenotipo MSI de tumores, en concreto de tumores del tracto gastrointestinal, y más específicamente tumores gástricos o colorrectales, o tumores del endometrio. Los tumores con inestabilidad en tres o más de los loci BAT-25, BAT-26, NR21, NRE22 (ó NR27), ó NR24 se definen como MSI-H.

15 El método de la invención tiene la ventaja sobre los métodos de la técnica anterior de permitir establecer el estado MSI sin ambigüedad en concreto en el caso de tumores del tracto gastrointestinal, sin necesitar un análisis simultáneo del ADN germinal correspondiente de cada paciente.

20 Proponemos que el uso concurrente de estos marcadores mononucleótidos en un único sistema de PCR pentaplex permita una evaluación precisa del estado MSI del tumor con una sensibilidad del 100%, una especificidad del 100%. Este ensayo es más sencillo de utilizar que aquellos que implican marcadores dinucleótidos, y es más específico que utilizar BAT-25 y BAT-26 solos. Este ensayo podría utilizarse rutinariamente en el hospital para proporcionar información sobre prognosis, como un posible indicador de respuesta a terapias adyuvantes, y para la detección de nuevos miembros de la familia HNPCC.

25 La invención se ilustrará adicionalmente mediante la descripción adicional que sigue, que se refiere a un ejemplo de uso de los marcadores mononucleótidos de la invención en un análisis de PCR múltiple. Sin embargo debe entenderse que este ejemplo se da sólo a modo de ilustración de la invención y no constituye de ninguna manera una limitación de la misma.

30 Ejemplo

### *Material y Métodos*

35 *Repeticiones de Mononucleótidos y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Múltiple*

40 Se identificaron tres nuevas repeticiones poli(T) y una nueva repetición poli(A) respectivamente en las regiones no traducidas 3' ó 5' de los genes SLC7A8(NR21, 21T), de la proteína B5 precursora transmembrana (NR22, 22T), dedo de cinc-2 (NR24, 24T), y de la proteína-1 inhibidora de la apoptosis (NR27, 27A). Los detalles que incluyen las secuencias cebadoras para estas repeticiones y BAT-25 y BAT-26 se muestran en la Tabla I que a continuación sigue.

45 (Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

TABLA 1

Nombre	Gen	Entrada GenBank (ADNC)	Ubicación de la repetición	Marcaador fluorescente	color	Cebadores	SEQ ID N°	Producto PCR (pb) *
BAT 26	hMSH2	U04045	26 (A) intrón 5	FAM	azul	TGACTACTTTGACTTCAGDC AACCATTCAACATTTTAACCC	14 15	121
BAT 25	c-kit	X06182	25 (T) intrón 16	NED	amarillo	CTGGGTAATCAAGTTTTAG AACCATTCAACATTTTAACCC	23 15	183
NR21	SLC7A8	XM_033393	21 (T) 5' UTR	HEX	verde	TCGGCTCCAAAGATGTAAGT TCTGCATTTAACTATGGCTC	12 13	124
NR22	Proteína B5 precursora transmembrana putativa	I38961	22 (T) 3' UTR	FAM	azul	TACCAGGTGGCAAAGGCA TCTGCATTTAACTATGGCTC	22 13	153
NR24	DEDO DE CINC 2 (ZNF-2)	X60152	24 (T) 3' UTR	HEX	verde	TAAATGATGTCTCCCTGG ATTCCTACTCCGCATTCACA	4 5	104
NR27	Proteína-1 inhibidora de la apoptosis	AF070674	27 (A) 5' UTR	FAM	azul	GAGTCGCTGGCACAGTCTA CTGGTCACTCGGGTTACAA	17 18	109
						GAGGCTTGTCGAAGGAGATAA AATTCGGATGCCATCCAGTT	6 7	143
						CCATTGCTGAATTTACCTC ATGTGCCATTGCATCCAA	8 9	134
						GCTGAATTTACCTCCTGAC ATTGTGCCATTGCATCCAA	19 9	131
						AACCATGCTTGCAAACCACT CGATAACTAGCAATGACC	20 21	87

S: cebador sentido  
 A: cebador antisentido  
 \*: tamaño teórico deducido a partir de la secuencia GenBank

Se diseñaron cebadores para permitir que se resolvieran diferentes tamaños de productos de PCR en geles de desnaturalización al 5% en un secuenciador de ADN automático ABI PRISM 377. Se utilizó el software GENESCAN (GENOTYPER 2.1) para calcular el tamaño, el peso y el área de cada producto de PCR fluorescente

Se utilizaron los siguientes cebadores en las experimentaciones descritas a continuación:

- cebadores BAT 26: SEQ ID N°: 14 y SEQ ID N°: 15;
- cebadores BAT 25: SEQ ID N°: 12 y SEQ ID N°: 13;

## ES 2 344 636 T3

- cebadores NR21: SEQ ID N°: 4 y SEQ ID N°: 5;
- cebadores NR22: SEQ ID N°: 6 y SEQ ID N°: 7;
- 5 - cebadores NR24: SEQ ID N°: 8 y SEQ ID N°: 9.

Se marcó un cebador en cada par con uno de los marcadores fluorescentes FAM, HEX ó NED (PE APPLIED BIOSYSTEMS). Se amplificaron las cinco repeticiones mononucleótido en un PCR múltiple que contenía 20  $\mu$ M de cada cebador, 200  $\mu$ M de dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0,75 unidades de ADN polimerasa *Taq*. El PCR se llevó a cabo utilizando las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, templado a 55°C durante 30 seg y extensión a 72°C durante 30 seg, seguido de una etapa de extensión a 72°C durante 7 min.

### Muestras de ADN

15 Se obtuvo ADN germinal de 128 individuos caucásicos en el Centre d'Etudes du Polymorphisme Humain (CEPH) en París y de 56 individuos descendientes de africanos.

Previamente se habían sometido a ensayo un total de 124 tumores de colon, 50 gástricos, 20 endometriales y 16 líneas celulares de colon para MSI utilizando diversos marcadores dinucleótido y marcadores mononucleótido BAT-25 y BAT-26 (147 casos) ó BAT26 y BAT25 solos (63 casos) (HOANG *et. al.* Cancer Res., 57(2), 300-303, 1.997; SERUCA *et. al.*, Int. J. Cancer, 64, 32-36, 1.995; TIBELETTI *et. al.*, Gynecol. Oncol., 73(2), 247-252, 1.999). De éstos se consideró que un total de 81 tumores de cáncer primarios, 42 cánceres gástricos primarios, 20 tumores endometriales primarios y 5 líneas celulares tumorales de colon eran MSI-H en base a las deleciones en las repeticiones anteriores.

### Resultados

#### PCR Múltiple Fluorescente

30 Se co-amplificaron los cinco marcadores mononucleótidos BAT-25, BAT-26, NR21, NR22 y NR24 en una sola mezcla PCR múltiple utilizando las condiciones de PCR descritas anteriormente, y se analizó el tamaño en un secuenciador de ADN automático. En estas condiciones, se observaron bandas no específicas dentro del intervalo de tamaños de 100-142 pb, permitiendo así una identificación precisa de los cinco marcadores.

35 La Figura 1 muestra unos perfiles alélicos típicos de (a), BAT25, BAT26, NR21, NR22 y NR24 en ADN de la línea germinal o de tumores MSS, (b) un tumor primario MSI-H que mostraba tanto alelos de tamaño normal como delecionados, y (c) una línea celular MSI-H que muestra deleciones homocigóticas.

40 La Figura 1a muestra un ejemplo de los picos fluorescentes observados para cada marcador, en este caso representando el tamaño de alelo más común encontrado en el ADN germinal.

El tamaño de los productos de PCR y las etiquetas fluorescentes correspondientes se eligieron para permitir el análisis simultáneo de los alelos de tamaño normal con los alelos de menor tamaño que contenían deleciones vistas por lo general en tumores MSI-H (Fig. 1b). Además de los alelos más pequeños la mayoría de los tumores primarios MSI-H también mostraban unos alelos de tamaño normal que presumiblemente se originan de células no cancerosas contaminantes. Estas se encontraban ausentes en la línea celular MSI-H mutante homocigótica mostrada en la Figura 1c.


50 Los tamaños alélicos más comunes para BAT25, BAT26, NR21, NR22 y NR24 eran 124, 120, 103, 142 y 132 pb respectivamente, aunque para cada repetición, se observó una ligera variación en la posición de los picos que representaban el tamaño de producto de PCR (Figura 2).

Leyenda de la Figura 2:

55  = BAT-25

 = BAT-26

60  = NR21

 = NR22

65  = NR24

## ES 2 344 636 T3

Para explicar estas variaciones, se consideró que para BAT-25, NR21, NR22 y NR24 los alelos de  $\geq 3$  pb y para BAT-26 los tamaños alélicos de tamaño  $\geq 4$  pb eran alteraciones somáticas o polimorfismos.

### *Polimorfismos en el ADN Germinal*

Como se muestra en la Tabla IIa que continuación sigue, cada marcador era por lo menos un 95% monomérico en 128 muestras de ADN germinal de caucásicos no emparentados (muestras CEPH).

TABLA IIa

		BAT-26	BAT-25	NR21	NR22	NR24
Línea germinal caucásica	ADN germinal	128/128 (100%)	126/128 (98,4%)	122/128 (95,3%)	128/128 (100%)	128/128 (100%)
Línea germinal africana	ADN germinal	51/56 (91,1%)	44/56 (78,6%)	54/56 (96,1%)	56/56 (100%)	52/56 (92,9%)

Además, 121 individuos (94,5%) de esta población era monomórficos en las cinco repeticiones y los 7 individuos restantes (5,5%) eran monomórficos en 4/5 marcadores. Ninguna muestra de ADN CEPH contenía un polimorfismo en más de 1 de las 5 repeticiones. Los polimorfismos eran más comunes en el ADN germinal africano, teniendo BAT 25 el nivel más alto de polimorfismo en un 21,4%. Aunque curiosamente, de 56 muestras de ADN germinal africano sometidas a ensayo, 37 (66,1%) resultaron monomórficas en las cinco repeticiones, 15 (26,8%) mostraron un polimorfismo en 1/5 marcadores y 4 (7,1%) en 2/5 marcadores. Ninguna de las muestras de ADN germinal fue polimórfica en  $> 2/5$  marcadores. Estos datos también se muestran en la Figura 3.

### *Identificación de tumores MSI-H*

Utilizando los criterios anteriormente indicados la delección media observada para cada repetición mononucleótido se calculó en tumores de colon y gástricos MSI-H. La sensibilidad, especificidad y delecciones medias de los cinco marcadores en diferentes tipos de ADN se muestran en la Tabla IIb que a continuación sigue:

TABLA IIb

		BAT-26	BAT-25	NR21	NR22	NR24
Colon	Delección media	11,9	7,3	6,8	5,1	5,6
	MSI-H (sensibilidad)	77/77 (100%)	72/72 (100%)	78/78 (100%)	77/79 (97,5%)	72/75 (96%)
	MSS (especificidad)	42/43 (97,7%)	44/44 (100%)	43/44 (97,7%)	45/45 (100%)	43/44 (97,7%)
Línea Celular Colon	Delección media	11	7,8	7,4	4,4	7,6
	MSI-H (sensibilidad)	4/4 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)
	MSS (especificidad)	11/11 (100%)	11/11 (100%)	11/11 (100%)	11/11 (100%)	10/10 (100%)
Gástrico	Delección media	12	7,2	6,8	4,9	5

## ES 2 344 636 T3

	MSI-H (sensibilidad)	39/39 (100%)	39/39 (100%)	37/39 (94,9%)	38/39 (97,4%)	26/30 (86,7%)
5	MSS (especificidad)	8/11 (72,7%)	10/11 (90,9%)	10/10 (100%)	10/11 (90,9%)	11/11 (100%)
10	Endometrial Delección media	5,9	4,6	3,9	2,9	2,4
	MSI-H (sensibilidad)	15/17 (88,2%)	18/19 (94,7%)	17/19 (89,5%)	14/19 (73,7%)	10/16 (62,5%)

15 Para BAT-26, la delección media fue de casi 12 pb, o aproximadamente dos veces la longitud media de la delección vista con los otros marcadores. Cada repetición mononucleótido fue deleccionada en tumores MSI-H con una sensibilidad > 86%. Los cambios alélicos debidos a polimorfismos o a mutación somática resultaron infrecuentes en tumores no MSI, lo que tuvo como resultado un alto grado de especificidad para la detección de MSI por cada uno de estos  
20 marcadores, a excepción de BAT-26 cuya especificidad resultó reducida debido a la mala clasificación previa de 6 tumores como se analiza más adelante.

25 Un total de 104 tumores gástricos y de colon y líneas celulares que se identificaron previamente como MSI-H mostraron datos de amplificación para los cinco marcadores. Los tumores mostraron delecciones en todas las repeticiones mononucleótido (88 tumores) ó en 4/5 repeticiones mononucleótido (9 tumores) (Figura 3). Sólo una muestra mostró delecciones en 3/5 marcadores. En 5 casos, previamente definidos como MSI-H, se encontraron alteraciones de tamaño sólo en Bat-26 ó Bat-25; estas muestras se consideraron mal clasificadas debido a polimorfismos étnicos (4 casos) o acortamiento límite (1 caso). Finalmente, se clasificó previamente una muestra de tumor adicional como MSI-H utilizando repeticiones dinucleótido pero no BAT-26 (HOANG *et. al.*, Cancer Res., 59  
30 (1), 300-303, 1.997). Esta muestra era monomórfica para las cinco repeticiones mononucleótido utilizadas en este estudio, lo que sugería que estaba mal clasificada con repeticiones dinucleótido, posiblemente debido al hecho de que el ADN germinal no coincidía con el ADN tumoral. En la tabla II y en la Figura 3, estas 6 muestras se consideraron MSS.

35 De 55 tumores gástricos y de colon y líneas celulares clasificadas previamente como MSS y que contenían datos para las 5 repeticiones, 53 (96,4%) resultaron monomórficas en los 5 marcadores. Un tumor resultó monomórfico en 4 marcadores (25%) y 1 tumor resultó monomórfico en 3/5 (2%) repeticiones. Ninguno de los 55 tumores MSS mostró cambios alélicos en 3 o más repeticiones (Figura 3), cumpliendo todavía con los criterios de identificación MSI de 2/5 polimorfismos de repeticiones descritos anteriormente.

40 Estos resultados se ilustran mediante la Figura 3, que muestra el porcentaje de muestras con cambios en el tamaño alélico en las cinco repeticiones mononucleótido en el ADN germinal caucásico (□), ADN germinal africano (■), tumores MSS (▣), tumores colorrectales MSI-H (▤) y tumores gástricos MSI-H (▥).

45 Las tres repeticiones mononucleótido NR21, NR22, y NR24 resultan cuasi monomórficas en el ADN germinal y, similar a BAT-25 y BAT-26, resultan altamente sensibles a la delección somática en los tumores MSI-H. La distinción de los tumores MSI-H de los MSS resulta ambigua cuando estos tres nuevos marcadores se utilizan conjuntamente con BAT-25 y BAT-26. El PCR múltiple de estos 5 marcadores tiene la ventaja adicional de evitar la necesidad de un  
50 análisis simultáneo del ADN germinal correspondiente de cada paciente.

55 Aunque la naturaleza cuasi monomórfica de las tres repeticiones mononucleótido sigue estando plenamente establecida en poblaciones diferentes, ninguno de los 128 casos de ADN germinal caucásico y 56 africanos presentaron polimorfismos en más de 2 de las repeticiones. Puesto que los 98 tumores MSI-H verdaderos examinados en la presente memoria, con una amplificación exitosa de los 5 marcadores, mostraron delecciones en por lo menos 3 marcadores, la probabilidad de una mala interpretación de un resultado MSI debido a polimorfismos en 3 o más de los 5 marcadores resulta estadísticamente insignificante. Por tanto cuando se analizaron conjuntamente los resultados de las cinco repeticiones, el estado MSI de esta serie completa de 159 tumores se determinó sin ambigüedad con una especificidad y una sensibilidad del 100%. Además, esto se logró sin la necesidad de analizar el ADN germinal  
60 correspondiente.

## ES 2 344 636 T3

La Tabla 3 que a continuación sigue indica tumores donde el polimorfismo o la delección límite en BAT-26 ó BAT-25 habría clasificado mal el estado MSI del tumor correspondiente. En todos los casos, el uso del panel múltiple permitió clasificar sin ambigüedad el tumor.

TABLA III

*Tumores MSI-H reclasificados como MSS con el PCR pentaplex*

MSS	BAT-26	BAT-25	NR21	NR22	NR24
Polimorfismos	11	2	0	0	0
	11	0	0	0	0
	11	0	0	0	0
	12	0	0	0	0
Delecciones límite	0	4	0	0	0
Inestable sólo en las repeticiones dinucleótido	0	0	0	0	0

En 31 muestras adicionales de ADN de tumores gástrico y de colon, solo cuatro de los cinco marcadores se amplificaron correctamente. Esto se debió probablemente a la calidad del ADN extraído de los tejidos embebidos en parafina y fijados en formalina. Veinticuatro de estos casos mostraron 4/4 ó 3/4 loci inestables y se identificaron correctamente como MSI-H, los 7 casos restantes que mostraban 0/4 ó 1/4 loci inestables se identificaron correctamente como MSS (resultados no mostrados, pero incluidos en la Tabla II). Por lo tanto, la amplificación incompleta de las cinco repeticiones podría todavía utilizarse de manera eficaz para identificar el estado MSI del ADN difícil.

Hemos observado anteriormente que los tumores MSI-H endometriales muestran unas diferencias de inestabilidad cuantitativas y cualitativas significativas comparado con los tumores MSI-H gastrointestinales (DUVAL *et. al.*, Cancer Res., 62, 1609-1612, 2.002). En el presente estudio, también se sometieron a ensayo 20 tumores endometriales que se sabía que eran MSI-H con el mismo ensayo pentaplex fluorescente. Estos tumores mostraron unas longitudes medias significativamente más cortas en los cinco marcadores de repeticiones mononucleótido comparado con los tumores gastrointestinales MSI-H (Tabla II). Utilizando los criterios de detección MSI establecidos con este panel microsatélite, 17/20 tumores endometriales fueron identificados como MSI-H y 1 tumor fue identificado como MSS (datos no mostrados). No fue posible identificar de manera concluyente el estado MSI de los 2 tumores restantes debido a unos cambios alélicos muy pequeños observados en los cinco marcadores.

Por tanto, resultó posible identificar de manera eficaz el estado MSI de los 190 tumores gástricos y de colon y las líneas celulares sometidas a ensayo en este experimento, que incluían seis muestras que fueron anteriormente mal clasificadas. Debido al menor tamaño de los cambios alélicos encontrados en los tumores endometriales MSI-H, recomendamos el análisis continuado de ADN germinal coincidente para el cribado MSI rutinario de este tipo de cáncer.

La evidencia que se acumula sugiere que el estado MSI define un subconjunto de cánceres colorrectales con unas propiedades clínicas y biológicas distintivas, lo que enfatiza la importancia de marcadores para la detección simples y precisos. Este conjunto de cinco marcadores mononucleótido, determina el estado MSI de tumores con mayor sensibilidad y especificidad que BAT-25 y BAT-26 solos, y es técnicamente más simple de utilizar que el panel recomendado en la reunión de consenso de Bethesda.

REIVINDICACIONES

1. Método para evaluar la inestabilidad de los microsatélites asociada con un tumor, mediante amplificación de los loci del microsatélite en una muestra biológica que comprende ADN genómico de dicho tumor y determinación de los tamaños de los productos de amplificación del ADN, **caracterizado** porque dicho método comprende la amplificación de un locus del microsatélite denominado NR21, definido como una repetición 21T situada en la región no traducida 5' del gen SLC7A8 (secuencia de ADNc GenBank XM\_033393).

2. El método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende adicionalmente la amplificación de un segundo locus del microsatélite denominado NR24, definido como una repetición 24T situada en la región no traducida 3' del gen *cdk-2* (secuencia de ADNc GenBank X60152), y la amplificación de un tercer locus del microsatélite seleccionado de entre:

- el locus del microsatélite denominado NR22, definido como una repetición 22T situada en la región no traducida 3' del gen de la proteína B5 precursora transmembrana putativa (secuencia de ADNc GenBank L38961);
- el locus del microsatélite denominado NR27, definido como una repetición 27A situada en la región no traducida 5' del gen de la proteína-1 inhibidora de la apoptosis (secuencia de ADNc GenBank AF070674);

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque comprende adicionalmente la amplificación de por lo menos un locus de repetición mononucleótido seleccionado entre BAT-25 y BAT-26.

4. Método según la reivindicación 3, **caracterizado** porque comprende la amplificación de los cuatro loci del microsatélite BAT-25, BAT-26, NR21, NR24, y la amplificación de un quinto locus del microsatélite seleccionado de entre NR22 y NR27.

5. Uso de un par de cebadores adecuados para la amplificación del locus NR21 del microsatélite, definido como una repetición 21T situada en la región no traducida 5' del gen SLC7A8, para evaluar *in vitro* la inestabilidad de microsatélite asociada con un tumor.

6. Uso de la reivindicación 5 en el que dicho par de cebadores se selecciona de entre:

- un par de cebadores que consisten en los oligonucleótidos SEQ ID N°: 4 y SEQ ID N°: 5;
- un par de cebadores que consisten en los oligonucleótidos SEQ ID N°: 17 y SEQ ID N°: 18.

7. Kit para el análisis de la inestabilidad de microsatélite, **caracterizado** porque comprende por lo menos un par de cebadores como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, y un par de cebadores adecuados para la amplificación de NR24.

8. Kit según la reivindicación 7, **caracterizado** porque comprende adicionalmente un par de cebadores seleccionados de entre:

- un par de cebadores adecuados, para la amplificación de NR22;
- un par de cebadores adecuados, para la amplificación de NR27.

9. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizado** porque comprende adicionalmente por lo menos un par de cebadores seleccionados de entre:

- un par de cebadores adecuados para la amplificación del locus del microsatélite BAT-25;
- un par de cebadores adecuados para la amplificación del locus del microsatélite BAT-26.

10. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 9, **caracterizado** porque el par de cebadores adecuados para la amplificación de NR24 consiste en los oligonucleótidos SEQ ID N°: 8 y SEQ ID N°: 9.

11. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado** porque:

- el par de cebadores adecuados para la amplificación de NR22 consiste en los oligonucleótidos SEQ ID N°: 6 y SEQ ID N°: 7;

## ES 2 344 636 T3

- el par de cebadores adecuados para la amplificación de NR27 consiste en los oligonucleótidos SEQ ID N°: 20 y SEQ ID N°: 21.

5 12. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, **caracterizado** porque:

- el par de cebadores adecuados para la amplificación de BAT-25 se selecciona de entre un par de cebadores que consiste en los oligonucleótidos SEQ ID N°: 12 y SEQ ID N°: 13, y un par de cebadores que consisten en los oligonucleótidos SEQ ID N°: 22 y SEQ ID N°: 13;

10

- el par de cebadores adecuados para la amplificación de BAT-26 se selecciona de entre un par de cebadores que consiste en los oligonucleótidos SEQ ID N°: 14 y SEQ ID N°: 15, y un par de cebadores que consisten en los oligonucleótidos SEQ ID N°: 23 y SEQ ID N°: 15.

15

13. Método para el diagnóstico del fenotipo MSI-H de un tumor, en el que dicho método comprende evaluar la inestabilidad de microsatélite de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

20

14. Método según la reivindicación 13 en el que dicho tumor es un tumor del tracto gastrointestinal.

15. Método según la reivindicación 13 en el que dicho tumor es un tumor gástrico o colorrectal.

16. Método según la reivindicación 13 en el que dicho tumor es un tumor del endometrio.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

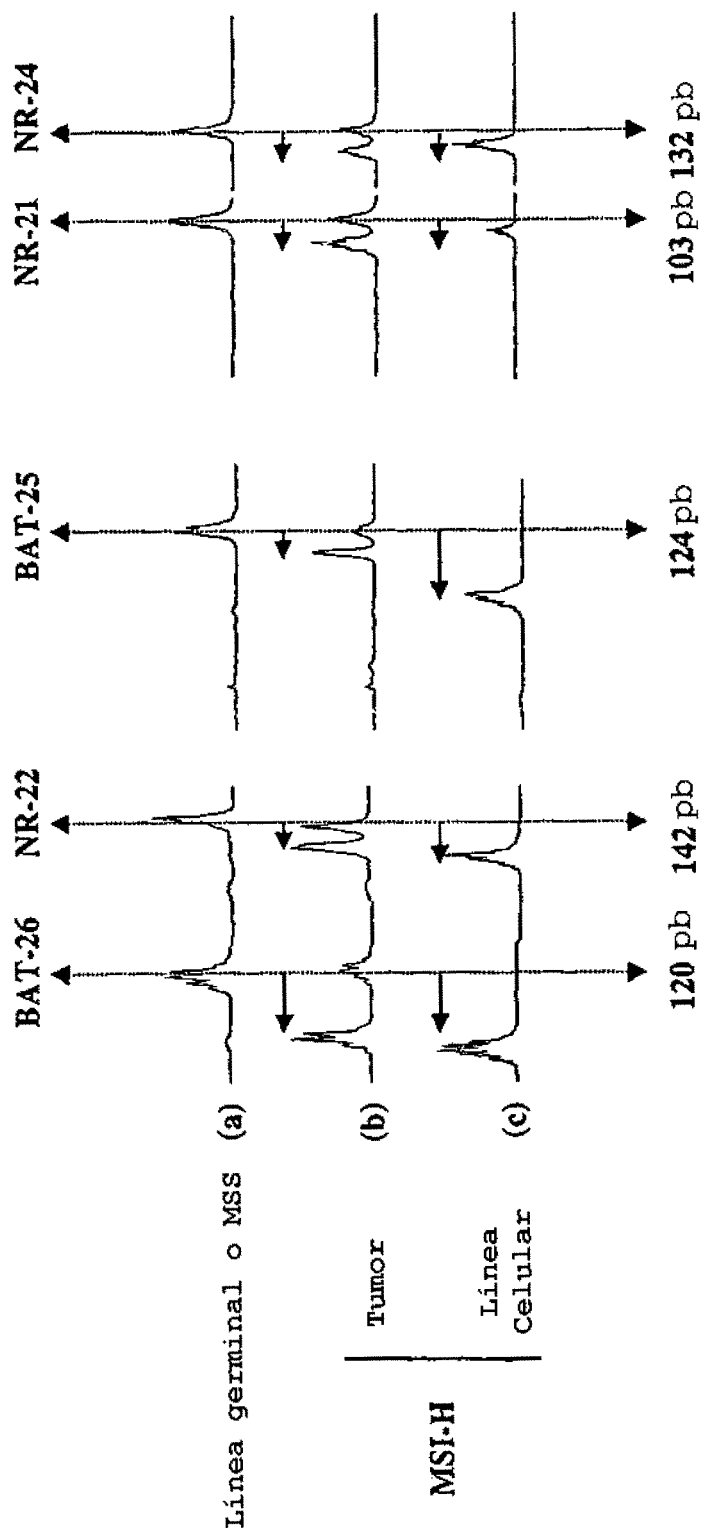


Figura 1

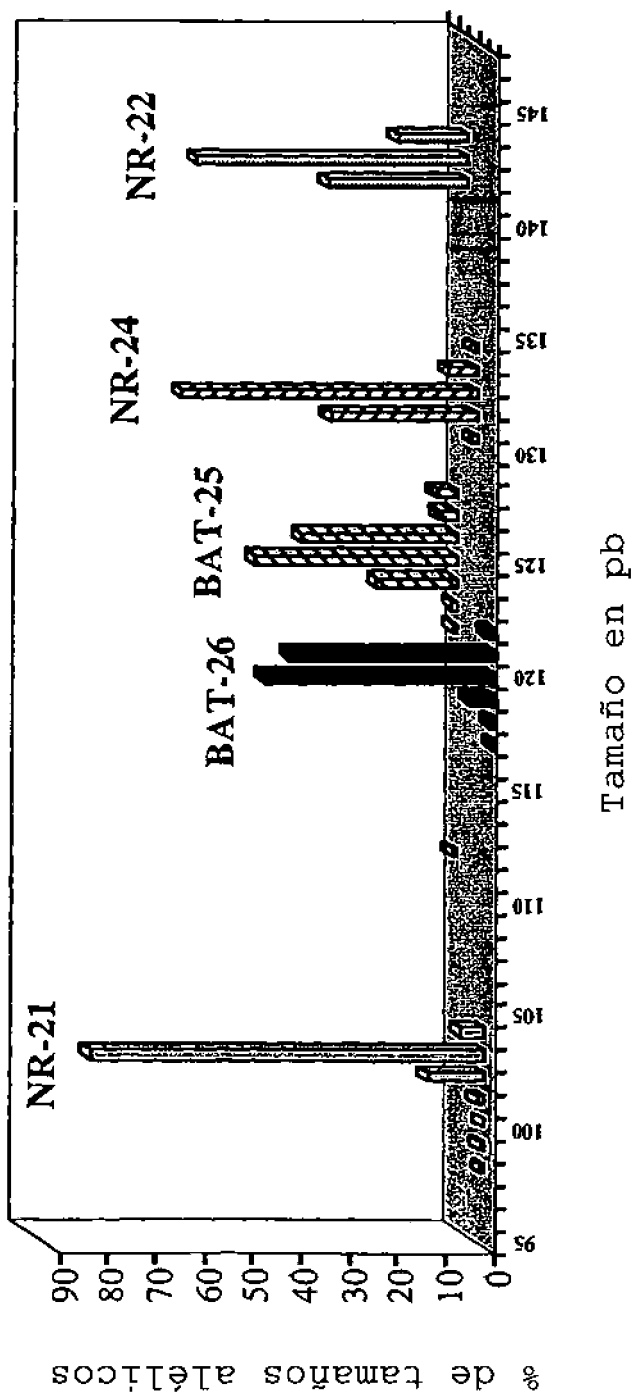


Figura 2

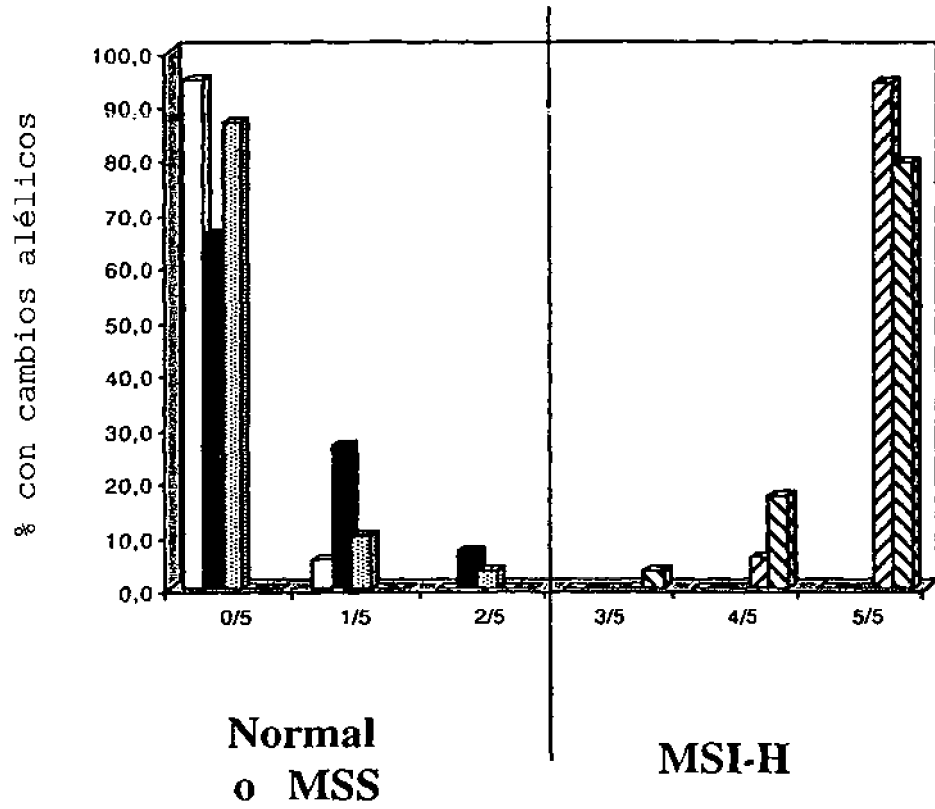


Figura 3

# ES 2 344 636 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> INSERM  
HAMELIN, Richard  
5 SURAWEERA, Nirosha
- <120> MARCADORES MICROSATÉLITES DE REPETICIONES MONONUCLEÓTIDO PARA DETECTAR LA  
10 INESTABILIDAD DE LOS MICROSATÉLITES
- <130> MJPbv598-61
- <150> EP 02 290 483.3  
15 <151> 2002-02-28
- <160> 23
- 20 <170> Patentín versión 3.1  
<210> 1  
<211> 1020  
<212> ADN  
25 <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- 30 tccccgaaacc agagggatgg ggccggctgt gcagtagaac ggggatcgaa aagaggaaaa 60  
caaggggcacg aagaccagcg agaaagaaga ggacacctgg gaaaggcgga agcagaagac 120  
ggggaaggga aaagaacc cc aaagcaggtg gaaaccagat ctagagcaac accgtcaggt 180  
35 tcacagtttg tttttctaga agagaagaaa gtacctgagg attgctcttt tttcctaccg 240  
ttaatgaaaa ctacttttgt cttcatcata aaagaaaaa ctaaggggag gtaaaggcag 300  
tctcctgttt tattaggggg agaggtgaag ggaaatccag gctcactttc tgaataagcc 360  
40 actgcctggg gcacagagca gaaccatcct ggtttctgaa gacacatccc tttcagcaga 420  
attccagccg gagtcgctgg cacagttcta tttttatatt taaatgtatg tctcccctgg 480  
45 cctttttttt tttttttttt tttagcaaca cttttcttgt ttgtaaacgc gagtgaccag 540  
aaagtgtgaa tgcggagtag gaatattttt cgtgttctct tttatctgct tgcctttttt 600  
agagagtagc agtggttcct atttcggaaa aggacgttct aattcaaagc tctctcccaa 660  
50 tatatttaca cgaatacgc tttagaaagg gaggcagctt ttgaggttgc aatcctactg 720  
agaaggatgg aagaaggagc caggcaccga aacaacaccg aaaagaaaca cccaggtggg 780  
ggcgagtcgg acgccagccc cgaggctggt tccggagggg gcggagtagc cctgaagaaa 840  
55 gagatcggat tggtcagtg cgtggtatc atcgtaggtg agttccatc cttcccgcgg 900  
accctctctc tcccctctgg tggctcctct gtgagatctt aaccctcga aagcattatt 960  
60 gttcttctta ttccttagaa aaggattgtc agtcacctga gctgtaactc acctccactg 1020
- <210> 2  
<211> 1020  
65 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

## ES 2 344 636 T3

<400> 2

5	agtgcaggaa atagagaaaa agttcacatg tttatatatta gctacatddd ettctctctc	60
	tgaagaactt aaggatatata gagtcatata gaaccacata ggagtatata tctcatataa	120
	gaaaagattg agaacccttg atctatgtgg agggtagatc agtaatattg gtcctcacag	180
10	aggtattcca aaaggctaag cagagagaat ctagtcteta gtcagtgcct gtgtattcac	240
	agccctaaac caggctgcag aaccaacat aatctgccc actctgggtg aatccatddd	300
	agtagaaaat ttctccaaag ttgatctgat tgtaaattt aaactgacat ctttatgttg	360
15	caggtaaagg acctggataa tggaggcttg tcaaggacat aaatgtcacg tccagctctg	420
	atatgcttcg cactgagcac atcacattda ggacgttga gatttdtdtd ttdtdtdtdtd	480
	ttaatatgc agtttgtaag aacaaaactg gatggcatca gaattgtctg gaagtttdgt	540
20	ctggggcagt atgggctggg ccaaatgaaa tgatttdtat aattctaaac aggttaccaa	600
	atgaaatgc atggcttdac ttdgttcaat taaagggggg aatttdtdtda aaaaatgtgc	660
25	cttattdgtt ttgacttata actgatttga gggaggcaaa agctatgcta ggctgccaga	720
	aggacataag cagaccttgt ccattctctt agctccctaa attagccaaa tagagacttc	780
	ttdctcaaat caggaaaact atcaaagacc aattcagatc ctacattdac agacagtdtd	840
30	gtcataacc ttdgcattgc agcacctagt acaattcctt ggaaacagcg tggctcaata	900
	aatttdtdat gaatgaataa atgtgggacc agaagagtgc tagaagagtg ctttdctggg	960
35	ctactatgc tctgttdtca atgtcttdta tccttagacg ctcttdgact ttataaatca	1020

<210> 3

<211> 960

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

45	gtgctaagct gtggtacagt aacaagcccg cagagagcta tgtctccctt aaaacctgac	60
	gggaaaccatt ctgtcttatt ctatcctcat tatttggaac atctggcttc caaagtcacc	120
50	acaagggcgg aagagaaagc tagaggaatt tgtaggatat ttdcttagac ccaggcttac	180
	atcacttctg tccacatcta ataagccaga acccagcacc tagaagctag gaaagtaaac	240
55	aagcacctcg aaagttggtt aataccaaga acctctctca cagttatatt ttgcatacta	300
	ctgttaagcc agtcttdtga aatgacctt tctgcccac cactgccttc ctcaagacct	360
60	aaaatagctc cctattdtagt gaaaaattat ctgaatattt aaggctgccc ttaacgtgat	420

65

## ES 2 344 636 T3

	ccccattgct gaatTTTacc tctgactcc aaaaactctt ctctccctg ggcccagtec	480
	tatttttttt ttttttttt tttttgtgag acagagtctc actctgtcac ccaggttgg	540
5	atgcaatggc acaatctccg ctcaactgcaa gctccgcctc ccgggttcac gccattctcc	600
	tgcctcagcc tccogaatag ctgggactac aggtgccgc caacacgcc ggctaatttt	660
	ttgtattttt agtagagacg gggtttcacc gtgttagcca ggatggtctc aatctcctga	720
10	cctcgtgac cgcccgcctc ggcctcccaa agtgctgga ttacagacgt aagtcaccgt	780
	gcccggccta tatttttatt ttattaaagg ttaggcacta gatgacctg actctaggca	840
15	tctgcattct cttgatctt gcttaggggtg aagctcagaa aaggacttgg ttctgaaagg	900
	ctgtctggaa ttagattgtc ctacgtgatt cccagtgaat tgagatgaat ttctctgga	960

20 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> cebador PCR

30 <400> 4

taaatgatg tctcccctgg 20

35 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cebador PCR

45 <400> 5

attcctactc cgcatcaca 20

50 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> cebador PCR

60 <400> 6

gaggcttgc aaggacataa 20

65 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN

## ES 2 344 636 T3

<213> Secuencia artificial

<223> cebador PCR

5 <400> 7

aattcggatg ccatccagtt

20

10 <210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> cebador PCR

20 <400> 8

ccattgctga attttacctc

20

25 <210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> cebador PCR

35 <400> 9

attgtgcat tgcattcaa

20

40 <210> 10

<211> 1020

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

45

<400> 10

	ccgcctcgtc ctcccggagt gcttggatta cagcatgagc cactgcgcc ggccccatt	60
50	ttagttttga tggacatttg ggtaattttc ttttttggct attctaaata atgctgcaat	120
	tactgttaat tttcaccttg taaaaacat tttcaaact caagagatta acctttagtt	180
	ttcttggttt ggattgggaa ggaacaccaa ggaaaatgag ggacttcaga atttattttc	240
55	attttgcatt tgttttttaa aatctttaga actggatcca gtggtataga aatcttcgat	300
	ttttaaattc ttaatttttag gttgcagttt catcactgtc tgcggtaatc aagtttttag	360
	aactcttata agatgattcc aactttggac agtttgaact gactactttt gacttcagcc	420
60	agtatatgaa attggatatt gcagcagtca gagcccttaa cctttttcag gtaaaaaaaaa	480
	aaaaaaaaaa aaaaaaaaaag ggttaaaaat gttgaatggt taaaaaatgt tttcattgac	540
	atatactgaa gaagcttata aaggagctaa aatattttga aatattatta tacttggatt	600
65	agataactag ctttaaatgg ctgtattttt ctctcccctc ctccactcca ctttttaact	660
	tttttttttt taagtcagag tctcacttgt tccctaggcc agagtgcagt ggcacaatct	720

## ES 2 344 636 T3

5            **tggttaattt ttatatTTTT agtaggggtg cggggacagg gtttcacat gttggccagg    840**  
               **ttggtctcaa acttctgacc ttaggtgatc ctcccacetc ggcttcccaa agtgctggga    900**  
               **ttacaggcct gagccatcgt gccacgcta ctttttactt ttttagagac tgggcttggg    960**  
               **ggagtgaagt ggcaagatca tagctcactg cagtattgaa ctctgggct caagcgatct   1020**

10 <210> 11  
     <211> 1080  
     <212> ADN  
     <213> *Homo sapiens*

15 <400> 11  
               **cattcccagt agcaatgatg cagaccagt ctgctttatg gtagcagtgc caatgggtcaa    60**  
 20            **tggcagttag ggttgcaagt ggggtgttgg ggtcagagca tatgtttttg tgccctgagta   120**  
               **tctttctata gatatgggat ctttgcttta attcggcacc cctctcctct atggattttg   180**  
               **taaccacagcc taggattggt aatatattaac tttgtgatcc agcatctacc tttcctggac   240**  
 25            **accaggggaag tgatctgect gcaagttcac attagttcat tcattaccag cctttgggat   300**  
               **gtcattgcca ctgtcttttc ctttcctgac ctttatgggt gtaattgcta agaaaaatcc   360**  
 30            **tctcttcttc acaggctcat acatagaaaag agatgtgact cccgccatca tggaggatga   420**  
               **cgagttggcc ctagacttag aagacttgct gagcttttct taccaggtgg caaagggcat   480**  
               **ggctttcttc gcctccaaga atgtaagtgg gagtgattct ctaaagagtt ttgtgttttg   540**  
 35            **tttttttgat ttttttttt ttttttttt tttgagaaca gagcatttta gagccatagt   600**  
               **taaaatgcag aatgtcattt tgaagtgtgg taaccaaaag cagaggaaat ttagtttctt   660**  
               **catgttccaa ctgctgtctc tttggaattc ctgttcta attataagctg taaagtacaa   720**  
 40            **gcctgtctaa atgagttttt ctatgaatat tcttttatat gcagtgaaat tcttttaaaa   780**  
               **cttttgctt ttaggatata ggatattgtc ctagagaaca gaatcatttt atcagtaaaa   840**  
 45            **gcagagggca cctcatagtt acaaggcttg ggggtgaagca tagacttgag ttttattgaa   900**  
               **gttagatcca aatattatat gtgtggctta tgaagtgtca ggaataaagg ggtcagaggg   960**  
               **agtaataaac acttgggaga aggttaggaa tggaaagaat gatggaacca aaacaaggag   1020**  
 50            **catggtctgt ggaaggggtg aaggagtcc ttaggaagta agattaaccg aacagaatga   1080**

55 <210> 12  
     <211> 20  
     <212> ADN  
     <213> Secuencia artificial

60 <220>  
     <223> cebador PCR

65 <400> 12

tcgctccaa gaatgaagt

20

## ES 2 344 636 T3

<210> 13  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador PCR  
 10  
 <400> 13  
  
                   tctgcatttt aactatggct c 21  
 15  
 <210> 14  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador PCR  
 25  
 <400> 14  
  
                   tgactacttt tgacttcagc c 21  
 30  
 <210> 15  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador PCR  
 40  
 <400> 15  
  
                   aaccattcaa catttttaac cc 22  
 45  
 <210> 16  
 <211> 1020  
 <212> ADN  
 50 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 16  
 55       **cttctacagt gacaaagaaa aatcaagaac aaagcttttt gatatgtgca acaaatttag   60**  
           **aggaagtaaa aagataaatg tgatgattgg tcaagaaatt atccagttat ttacaaggcc   120**  
           **actgatattt taaacgtcca aaagtttggt taaatgggct gttaccgctg agaatgatga   180**  
 60       **ggatgagaat gatggttgaa ggttacattt taggaaatga agaaacttag aaaattaata   240**  
           **taaagacagt gatgaataca aagaagattt ttataacaat gtgtaaaatt tttggccagg   300**  
           **gaaaggaata ttgaagttag atacaattac ttaccttga gggaaataat tgttggtaat   360**  
 65       **gagatgtgat gtttctctg ccacctggaa acaaagcatt gaagtctgca gttgaaaagc   420**

## ES 2 344 636 T3

	aaaaaaaaa agccacagtg acttgcttat tggtcattgc tagtattatc gactcagaac	540
	ctctttacta atggctagta aatcataatt gagaaattct gaattttgac aaggtctctg	600
5	ctggtgaaat ggtaaattta ttatTTTTTT tgtcatgata aattctggtt caaggtatgc	660
	ratccatgaa ataatttctg accaaaacta aattgatgca atttgattat ccactctagc	720
	ctacagatgg catctggtaa cttttgactg ttttaaaaaa taaatccact atcagagtag	780
10	atttgatggt ggcttcagaa acatttagaa aaacaaaagt tcaaaaatgt tttcaggagg	840
	tgataagttg aataactcta caatgttagt tctttgaggg ggacaaaaaa tttaaaatct	900
15	ttgaaaggtc ttatTTTtaca gccatatcta aattatctta agaaaatTTT taacaaaggg	960
	aatgaaatat atatcatgat tctgTTTTTC caaaagtaac ctgaatatag caatgaagtt	1020

20 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> cebador PCR

30 <400> 17

gagtcgctgg cacagttcta 20

35 <210> 18  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cebador PCR

45 <400> 18

ctggtcactc gcgTTTtaca 20

50 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> cebador PCR

60 <400> 19

gctgaatTTT acctcctgac 20

65 <210> 20  
 <211> 20

## ES 2 344 636 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador PCR	
	<400> 20	
10	aaccatgctt gcaaaccact	20
	<210> 21	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> cebador PCR	
	<400> 21	
25	cgataatact agcaatgacc	20
	<210> 22	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> cebador PCR	
	<400> 22	
40	taccaggtgg caaaggga	19
	<210> 23	
45	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> cebador PCR	
	<400> 23	
55	ctgcggaat caagtttta g	21
60		
65		