



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 573**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04105159 .0**

96 Fecha de presentación : **19.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1650311**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

54 Título: **Compuestos y procedimientos para la estimación del estado de inestabilidad de microsátélites (MSI).**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.04.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.04.2010**

73 Titular/es: **MTM Laboratories AG.**  
**Im Neuenheimer Feld 583**  
**69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es: **Findeisen, Peter;**  
**Merx, Sabine;**  
**Kloor, Matthias y**  
**Von Knebel Doeberitz, Magnus**

74 Agente: **Riera Blanco, Juan Carlos**

**ES 2 337 573 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

Compuestos y procedimientos para la estimación del estado de inestabilidad de microsátélites (MSI).

5 La presente invención proporciona un procedimiento para la estimación del estado de inestabilidad de microsátélites (MSI en inglés) de afecciones médicamente relevantes asociadas al fenotipo de MSI tales como, por ejemplo, lesiones neoplásicas. El procedimiento está basado en el análisis de una repetición mononucleotídica monomórfica en la 3'-UTR del gen de caspasa 2 (CASP2). Basándose en la determinación de la longitud de la repetición mononucleotídica citada, puede estimarse la presencia o ausencia de MSI. La determinación de la longitud se efectúa en un solo procedimiento de PCR. Como alternativa, puede efectuarse una estimación potenciada combinando el marcador CASP2 con marcadores adicionales tales como BAT25 y BAT26 en un solo proceso de PCR múltiple.

## Antecedentes de la invención

15 Se observa un sistema de reparación de errores de apareamiento de ADN (MMR en inglés) deficiente en aproximadamente un 10-15% de todos los carcinomas colorrectales y en hasta un 90% de los pacientes de cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC en inglés). Los tumores con defectos del MMR adquieren mutaciones en tramos de ADN repetitivos cortos, un fenómeno denominado inestabilidad de microsátélites. La determinación del estado de los microsátélites en cáncer de colon es de relevancia creciente puesto que (1) el estado de los microsátélites es un factor de pronóstico independiente en cáncer colorrectal, (2) la eficacia de la quimioterapia coadyuvante parece depender del estado de los microsátélites del tumor, y (3) la inestabilidad de los microsátélites es la herramienta de selección molecular más importante para la identificación de pacientes de HNPCC y familias afectadas por mutaciones de línea germinal en genes de MMR. Por lo tanto, el ensayo rutinario del MSI parece estar justificado para todos los casos de cáncer colorrectal.

25 La inestabilidad de microsátélites se observa en aproximadamente un 10-15% de los carcinomas colorrectales esporádicos (CRC en inglés) y hasta en un 90% de los pacientes de cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC) que albergan mutaciones de línea germinal en genes de reparación de errores de apareamiento de ADN (MMR) (para una revisión, véase Lynch y de la Chapelle "Microsatellite instability", *N. Engl. J. Med.* 17 de julio de 2003; 349 (3): 247-57). Los CRC que exhiben el fenotipo de inestabilidad de microsátélites (MSI) poseen rasgos patológicos y clínicos particulares. Los CRC con MSI-H están a menudo localizados en el colon proximal y presentes con una densa infiltración de linfocitos intratumorales (Smyrk y col. "Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma", *Cancer*, 15 de junio de 2001; 91(12): 2417-22; Dolcetti y col. "High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability", *Am. J. Pathol.*, junio de 1999; 154(6): 1805-13). Varios estudios reseñan un mejor pronóstico para pacientes de CRC con MSI-H (Gryfe y col. "Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer", *N. Engl. J. Med.*, 13 de enero de 2000; 342(2): 69-77; Wright y col. "Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer", *Br. J. Surg.*, septiembre de 2000; 87(9): 1197-202; Samowitz y col. "Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level", *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, septiembre de 2001; 10(9): 912-23). De forma interesante, la sensibilidad a la quimioterapia parece depender del estado de los microsátélites de células de tumor colorrectal (Claij, "Microsatellite instability in human cancer: a prognostic marker for chemotherapy?", *Exp. Cell. Res.* 10 de enero de 1999; 246(1): 1-10; Hemminki y col. "Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy", *Gastroenterology*, octubre de 2000; 119(4): 921-8; Watanabe y col. "A change in microsatellite instability caused by cisplatin-based chemotherapy of ovarian cancer", *Br. J. Cancer*, 28 de septiembre de 2001; 85(7): 1064-9). El sistema de MMR de ADN parece estar implicado en la inducción de la apoptosis mediante agentes dañinos para el ADN, *in vitro*, varias líneas celulares con un sistema de reparación de errores de apareamiento defectivo han mostrado ser resistentes a dichos agentes (Claij "Microsatellite instability in human cancer: a prognostic marker for chemotherapy?", *Exp. Cell. Res.*, 10 de enero de 1999; 246(1): 1-10; Bawa y Xiao "A mutation in the MSH5 gene results in alkylation tolerance", *Cancer Res.* 1 de julio de 1997; 57(13): 2715-20; Carethers y col. "Mismatch repair proficiency and *in vitro* response to 5-fluorouracil", *Gastroenterology*, julio de 1999, 117(1): 123-31). En un estudio de Ribic y col. ("Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer", *N. Engl. J. Med.*, 17 de julio de 2003; 349(3): 247-57), se observó una tendencia hacia una supervivencia global más corta en pacientes tratados con quimioterapia de 5-fluorouracilo (5-FU) de CRC con MSI-H, mientras que los pacientes de CRC con MSS se beneficiaban de la terapia con 5-FU coadyuvante. En un estudio diferente, la supervivencia mejorada de pacientes de CRC tratados con quimioterapia se limitó a los casos de MSS, mientras que no se detectó efecto en el grupo de MSI-H (Carethers y col. "Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer", *Gastroenterology*, febrero de 2004; 126(2): 688-9).

60 Estos datos apuntan a la importancia clínica del estado de los microsátélites en CRC y proporcionan buenas razones para un ensayo de MSI rutinario de todos los casos de cáncer colorrectal. Sin embargo, el procedimiento estándar actual es largo, laborioso y caro.

65 Actualmente, el ensayo de MSI se aplica habitualmente sólo a pacientes preseleccionados según criterios clínicos (Directrices de Bethesda, Boland y col. "A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer", *Cancer Res.*, 15 de noviembre de 1998; 58(22): 5248-57), debido a que el procedi-

miento de ensayo estándar recomendado por el seminario de ICG-HNPCC (Boland y col. "A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer", *Cancer Res.*, 15 de noviembre de 1998, 15; 58(22): 5248-57) implica una carga de trabajo de laboratorio considerable: tienen que amplificarse a partir del ADN de tejido tumoral y normal cinco marcadores de microsatélite incluyendo dos repeticiones mononucleotídicas (BAT26 y BAT25) y tres repeticiones dinucleotídicas (D2S123, D5S346, D17S250). Se usa un panel de cinco marcadores de MSI adicionales para la clasificación de MSI de los casos límite. Estos numerosos marcadores que requieren análisis del ADN normal apareado del mismo paciente hacen al análisis de MSI un procedimiento de ensayo laborioso y costoso que no es aplicable para selección de alto rendimiento.

Por lo tanto, se requiere una estrategia de ensayo simplificada para ensayos de alto rendimiento. Para reducir la carga de trabajo del ensayo de MSI, se han sugerido varias técnicas en publicaciones anteriores. La inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales específicos de MLH1 y MSH2 se acepta normalmente como una herramienta útil para identificar a tumores relacionados con HNPCC (Marcus y col. 1999 "Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors", *Am. J. Surg. Pathol.*, octubre de 1999; 23(10): 1248-55", Lindor y col. "Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors", *J. Clin. Oncol.*, 15 de febrero de 2002; 20(4): 897-9; Umar y col. "Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability", *J. Natl. Cancer Inst.*, 18 de febrero de 2004; 96(4): 261-8) y la sensibilidad puede potenciarse adicionalmente mediante la inclusión de anticuerpos adicionales que reconozcan MSH6 y PMS2. En comparación con el ensayo de MSI basado en PCR, la IHC tiene algunas ventajas, principalmente los menores costes que se calcularon que eran menos de un tercio en comparación con el análisis de MSI estándar (Debniak y col. "Value of pedigree/clinical data, immunohistochemistry and microsatellite instability analyses in reducing the cost of determining hMLH1 and hMSH2 gene mutations in patients with colorectal cancer", *Eur. J. Cancer.*, enero de 2000; 36(1): 49-54).

Sin embargo, hay varias limitaciones clínicas de la IHC como procedimiento de selección cuando se usa sola. Se omiten algunos casos de tumores con MSI-H (Lindor y col. "Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors", *J. Clin. Oncol.*, 15 de febrero de 2002; 20(4): 897-9), y se han reseñado resultados falsos negativos debido a la heterogeneidad intratumoral, así que se ha recomendado la tinción de al menos dos muestras independientes para cada carcinoma (Chapusot y col. "Microsatellite instability and intratumoural heterogeneity in 100 right-sided sporadic colon carcinomas", *Br. J. Cancer*, 12 de agosto de 2002; 87(4): 400-4). Además, pueden resultar artefactos de tinción del procedimiento de fijación con formalina, especialmente cuando se usan bloques de tejido grandes (revisado por Werner y col. 2000). Por tanto, el uso de procedimientos de detección de MSI basados en PCR es actualmente indispensable para la correcta clasificación de la MSI.

Para minimizar los costes del ensayo de MSI basado en PCR, se ha sugerido el uso de BAT26 solo en varios estudios (Zhou y col. "Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites", *Genes Chromosomes Cancer*, febrero de 1998; 21(2): 101-7; Cravo y col. "BAT-26 identifies sporadic colorectal cancers with mutator phenotype: a correlative study with clinicopathological features and mutations in mismatch repair genes", *J. Pathol.*, julio de 1999; 188(3): 252-7; Stone y col. "Optimising methods for determining RER status in colorectal cancers", *Cancer Lett.*, 28 de febrero de 2000; 149(1-2): 15-20), incluso sin necesidad de tejido normal coincidente (Hoang y col. "BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines", *Cancer Res.*, 15 de enero de 1997; 57(2): 300-3). Aunque este enfoque puede ser suficiente para la mayoría de casos de MSI-H, no iguala la sensibilidad del panel estándar de ICG-HNPCC, puesto que hay resultados falsos negativos. Adicionalmente, dependiendo del origen étnico de los individuos ensayados, los alelos de BAT26 acortados que se han reseñado en hasta un 5,3% (lo más frecuentemente en personas afroamericanas, Pyatt y col. "Polymorphic variation at the BAT-25 and BAT-26 loci in individuals of African origin. Implications for microsatellite instability testing", *Am. J. Pathol.*, agosto de 1999; 155(2): 349-53) conducen a una clasificación de falso positivo cuando el tejido normal correspondiente no está disponible (Perucho "Correspondence re: C.R. Boland *et al.*, A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer". *Cancer Res.*, 58: 5248-5257, 1998, *Cancer Res.*, 1 de enero de 1999; 59(1): 249-56). De forma similar, se han detectado alelos de BAT25 aberrantes del "tipo silvestre" general en 0,6% a 6,8% de los casos (Ichikawa y col. "DNA variants of BAT-25 in Japanese, a locus frequently used for analysis of microsatellite instability", *Jpn. J. Clin. Oncol.*, julio de 2001; 31(7): 346-8); Pyatt y col. 1999). Por lo tanto, Suraweeera y col. ("Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR", *Gastroenterology*, diciembre de 2002; 123(6): 1804-11) recomendaron un sistema de PCR quintuple que usaba BAT25, BAT26 y tres marcadores mononucleotídicos adicionales que permitiera un tipado de microsatélites fiable en la mayoría de los tumores y líneas celulares gastrointestinales que se ensayaban. Sin embargo, el estado de MSI de un número considerable de tumores se pretipaba sólo por marcadores dinucleotídicos o BAT25/BAT26 solo, impidiendo así la evaluación de la sensibilidad y especificidad de diagnóstico del sistema quintuple. Sutter y col. ("Molecular screening of potential HNPCC patients using a multiplex microsatellite PCR system", *Mol. Cell Probes*, abril de 1999; 13(2): 157-65) recomendaron una combinación de cinco marcadores en un sistema múltiple que alcanzaba un 100% de sensibilidad y especificidad, pero sólo cuando se usaba en combinación con el correspondiente tejido normal.

El procedimiento actualmente recomendado que usa el panel marcador ICG-HNPCC estándar con este fin es costoso y largo. Por lo tanto, es deseable establecer un nuevo procedimiento de ensayo de microsatélites. Este procedimiento

podría incluir, por ejemplo, un marcador novedoso altamente indicativo de MSI que podría simplificar los protocolos actuales de evaluación de MSI.

Los compuestos y procedimientos dados a conocer según la presente invención proporcionan la mejora del procedimiento de ensayo de microsatélites. El procedimiento dado a conocer en la presente memoria tiende a simplificar el análisis de MSI en cáncer colorrectal sin reducir la sensibilidad ni especificidad de diagnóstico. Los inventores encontraron que la repetición mononucleotídica T25 en 3'-UTR del gen CASP2 puede usarse para una determinación eficaz y sensible del estado de microsatélites en especímenes. En ciertas realizaciones, el marcador dado a conocer puede combinarse también con los marcadores de microsatélites establecidos BAT25 y BAT26 en una reacción de amplificación múltiple.

### Breve descripción de la invención

En la búsqueda de estrategias de selección más eficaces, los inventores identificaron sorprendentemente una repetición T-25 monomórfica en la 3'-UTR del gen CASP2 que puede usarse como marcador del estado de MSI. Basándose en esta molécula marcadora monomórfica, se ha diseñado un procedimiento para la estimación del estado de MSI de afecciones médicamente relevantes asociadas al fenotipo de MSI. El procedimiento comprende las etapas de i) determinación de la presencia o ausencia de mutaciones en la repetición T-25 localizada en la 3'-UTR del gen CASP2; y ii) estimación del estado de MSI basándose en la presencia o ausencia de mutaciones, siendo indicativa la presencia de mutaciones de la presencia del estado de MSI-H.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: Amplificación por PCR múltiple de BAT26, BAT25 y CASP2 de dos CRC con MSI-H (A y B), un CRC con MSS (C) y un CRC con MSI-L (D). Se exponen los productos de PCR para BAT26 (azul, longitud relativa media de producto 117 pb), BAT25 (verde, 122 pb) y CASP2 (azul, 147 pb). Los picos sombreados cubren el área mayor y se definen como la longitud de producto principal. El intervalo de longitud de producto observado en ADN normal de individuos sanos está indicado por líneas de puntos para cada marcador. Se observaron desplazamientos exclusivamente en tumores con MSI-H, las longitudes de desplazamiento se indican encima de los correspondientes picos de producto.

Figura 2: Distribución de las longitudes de producto de CASP2, BAT25 y BAT26. Se observaron las longitudes de producto relativas en CRC con MSI-H (columnas sombreadas) y muestras de ADN no tumoral (columnas negras). Aproximadamente dos tercios del conjunto de ADN normal ensayado (principalmente de donantes blancos) presentaron una longitud de producto de CASP2 principal de 147 pb. Debido a que no se observaron variaciones que superaran un nucleótido, fue posible la detección de MSI en todos menos en un caso sin el análisis del correspondiente tejido normal.

Figura 3: Amplificación por PCR múltiple de BAT26, BAT25 y CASP2 de dos tumores extracolónicos con MSI-H. Productos amplificados a partir de cáncer endometrial con MSI-H (A) y cáncer de ovario con MSI-H (B). Se observan las longitudes de desplazamiento mayores para CASP2.

Figura 4: Secuencias como ejemplos de cebadores. Pares de amplificación de la repetición T-25 de CASP-2 para un procedimiento según la presente divulgación.

### Descripción detallada de la invención

Es un aspecto de la presente invención un procedimiento para la estimación del estado de MSI de afecciones médicamente relevantes asociadas a MSI tales como por ejemplo tumores. El procedimiento comprende determinar la presencia o ausencia de mutaciones en la repetición T-25 localizada en la 3'-UTR del gen CASP2. Esto puede comprender, por ejemplo, la determinación de la longitud del ácido nucleico de la 3'-UTR.

Se da a conocer un kit para efectuar el procedimiento según la presente invención.

Se da a conocer también el uso de sondas complementarias o complementarias inversas del gen CASP2 para la fabricación de un kit para la estimación del estado de MSI de afecciones médicamente relevantes asociadas a MSI.

Es un aspecto adicional de la presente divulgación un sistema para la estimación del estado de MSI de afecciones médicamente relevantes basado en la detección de mutaciones en la repetición T-25 de la 3'-UTR del gen CASP2.

Es un aspecto adicional de la presente divulgación un ácido nucleico complementario o complementario inverso del gen CASP2 para la determinación del estado de MSI de afecciones médicamente relevantes.

La presente invención está basada en la aplicación de una molécula marcadora que se caracteriza por un alto grado de frecuencia de mutación en los tumores con MSI-H de interés y mutaciones no detectables en especímenes de tejido con MSS. Las características de esta molécula marcadora posibilitan el establecimiento de un procedimiento de detección altamente sensible y específico de casos de MSI-H basado en una detección de mutación sencilla.

## ES 2 337 573 T3

El gen de casp2 o caspasa 2 como se usa en el contexto de la presente invención en sus diversas formas gramaticales designa la caspasa 2, también denominada proteasa de cisteína relacionada con la apoptosis, localizada en la región cromosómica 7q34-q35 (UniGene Cluster Hs.433103). Un corte y empalme alternativos conduce a la transcripción de diferentes isoformas de CASP2, estando identificada la secuencia de ácido nucleico de referencia del ADNc más larga que cubre la región cromosómica más larga y constituida por 11 exones por la secuencia de n° de acceso NM\_032982. Las isoformas alternativas identificadas por las secuencias de n° de acceso NM\_032983, NM\_032984 y NM\_001224 comparten todas un exón 3' idéntico al exón 11 de la secuencia de ADNc NM\_032982 que contiene la repetición T25 descrita anteriormente. La proteína codificada por este gen es también conocida en la técnica como proteasa ICH-1, se identificada como la proteína P42575 y se clasifica como una enzima perteneciente al grupo EC 3.4.22. de hidrolasas (base de datos de nomenclatura de enzimas, SwissProt). La proteína Casp2 es necesaria para la inducción de la apoptosis relacionada con el estrés mediante la liberación de citocromo c y Smac de mitocondrias y mediante la translocación de Bax del citoplasma a mitocondrias (Lassus y col. 2002). Generalmente, el gen de Casp2 como se usa en la presente memoria designa ácidos nucleicos monocatenarios así como bicatenarios y por lo tanto comprende secuencias como las encontradas en la cadena de codificación del gen de Casp2 así como secuencias inversas complementarias de las mismas. Además, las secuencias del gen de Casp2 así como fragmentos de las mismas se entenderán por el término gen de Casp2 o ácido nucleico de Casp2.

El gen de Casp2 o ácido nucleico de Casp2 como se usa en el contexto de la presente invención comprenderá además la repetición T-25 localizada en la 3'-UTR del gen CASP2, según la presente invención con referencia a la repetición T-25 localizada en posición nt 2685 a 2709 de la secuencia NM\_032982. El gen de Casp2 o ácido nucleico de Casp2 como se usa en el contexto de la presente invención designa por lo tanto la secuencia de codificación, las secuencias reguladoras 5' y las regiones no traducidas 3' del gen de Casp2.

Esta repetición tiene una longitud de 25 nucleótidos según la entrada de la base de datos citada. Esta repetición T-25 según la presente invención se considera monomórfica. En el contexto de la presente invención, la repetición T-25 monomórfica puede tener también la longitud de repetición de T-24 y T-26. Como se usa en el contexto de la presente invención, el término "repetición T-25" puede comprender también las formas T-24 y T-26.

La repetición T-25 citada localizada en la posición nt 2685 a 2709 de la secuencia NM\_032982 exhibe una longitud de fragmento relativa de 148 nucleótidos en un sistema de amplificación como se da a conocer en la presente memoria en los ejemplos.

La repetición T-25 como se da a conocer en la presente memoria es monomórfica ya que no pudieron detectarse longitudes alélicas relativas de menos de 146 nt ni de más de 148 nt en muestras originarias de individuos sanos normales. La longitud alélica relativa, como se usa en la presente memoria, designará una longitud de fragmento específica de alelo generada en una reacción de amplificación de ácido nucleico. Por lo tanto, el término "monomórfico" como se usa en el contexto de la presente invención designa la longitud uniforme de la repetición T-25 presente en muestras de individuos sanos normales e incluye un intervalo de desviación de  $\pm 1$  nucleótido. Los alelos que contienen una repetición T-24, T-25 o T-26 se considera que son monomórficos respecto al microsátélite de la repetición T-25.

Las longitudes alélicas de 146 nt y 148 nt respectivamente citadas anteriormente se detectan usando un sistema de detección como se da en el ejemplo 1. Es conocido por los expertos en la técnica que, debido a cuestiones técnicas, pueden aparecer pequeñas variaciones de las longitudes relativas de producto detectadas. En ciertas realizaciones de la presente invención, la variación de las longitudes de los fragmentos detectados puede limitarse a 1 pb o menos por el diseño del sistema de detección. Generalmente, el sistema de detección para aplicación según la presente divulgación debe asegurar una sensibilidad y/o especificidad adecuadas del procedimiento de análisis de MSI. Sin embargo, por ejemplo, podría incluirse una muestra de referencia en cada análisis. En esta realización, la muestra de referencia podría usarse como control externo y puede consistir en cualquier producto de PCR de CASP2 con una longitud de producto determinada anteriormente. Además, pueden aplicarse diversos otros procedimientos para la detección de mutaciones. Las longitudes alélicas detectadas en el sistema de detección respectivo dependen de los parámetros del sistema. Los expertos en la técnica sabrán cómo deben corregirse las longitudes alélicas respectivas correspondientemente a las correcciones de los parámetros del sistema de detección. En el contexto de la presente divulgación, se citarán las longitudes alélicas de 146 nt y 148 nt respectivamente que pueden detectarse con el sistema de detección como se da a conocer en los ejemplos siguientes. Sin embargo, estará comprendida cualquier longitud alélica determinada usando otro sistema, pero correspondiente a las longitudes alélicas citadas, cuando se usen las longitudes alélicas citadas en la presente memoria. Generalmente, una longitud alélica que difiera de la longitud alélica dada en el número de acceso NM\_032982 en +2 nt o -2 nt o más en la repetición oligo-T localizada en la 3'-UTR de la secuencia citada, se considerará que es indicativa de la presencia de una mutación.

La repetición T-25 de CASP2 dada a conocer en la presente memoria exhibe mutaciones en cánceres con MSI-H con alta prevalencia. No están presentes alteraciones de CASP2 en muestras de carcinoma colorrectal con MSS de control. La longitud de desplazamiento media en CRC con MSI-H detectada en un ensayo de detección de CASP2 basado en PCR es comparable con la observada con BAT26 y BAT25. Finalmente, en individuos sanos normales no se observaron alelos que difirieran en más de un nucleótido de la longitud relativa de tipo silvestre para la repetición T-25 en la 3'-UTR de CASP2. En comparación con los marcadores adicionales en el panel múltiple sugerido por Suraweera (Suraweera y col., 2002), la repetición mononucleotídica T-25 de CASP2 exhibe una mayor frecuencia de mutación y una longitud de desplazamiento media más larga.

## ES 2 337 573 T3

En una realización de la presente divulgación, puede aplicarse una combinación de CASP2 con los dos mononucleótidos BAT25 y BAT26 del panel ICG-HNPCC estándar para mejorar la sensibilidad y especificidad de diagnóstico.

5 Generalmente, la molécula marcadora dada a conocer en la presente memoria es aplicable a todas las afecciones médicamente relevantes en que está indicado un análisis del estado de MSI para estimación del diagnóstico o para estratificación de individuos para una terapia adecuada. Dichas afecciones médicamente relevantes comprenden, por ejemplo, tumores de diversas clases y naturalezas.

10 Es conocido por los expertos en la técnica que la aplicabilidad de ciertos marcadores para análisis de MSI puede variar entre diferentes tipos de tumores (Lawes y col., 2003) así como entre diferentes etapas de un tipo tumoral. Se ha reseñado recientemente que BAT26 mostró menor sensibilidad en adenomas colorrectales (Grady y col., 1998), cáncer de ovario (Sood y col., 2001) y cáncer endometrial con deleciones de pares de bases medias significativamente reducidas (Duval y col., 2002).

15 En los experimentos que condujeron a la presente divulgación, los inventores pudieron mostrar que CASP2 es un marcador de microsatélite de aplicación más universal. Resultó que la repetición T-25 en la 3'-UTR del gen CASP2 era indicativa del estado de MSI-H en todas las entidades tumorales ensayadas y que estaban ausentes mutaciones en tumores con MSS. Además de carcinomas colorrectales con MSI-H, los adenomas colorrectales, carcinomas endometriales, cánceres de ovario y cánceres uroteliales presentaron desplazamientos marcados de la repetición T-25 de CASP2 (Ejemplos 2 y 3). Por lo tanto, una amplia aplicabilidad es un rasgo del marcador de microsatélite dado a conocer en la presente memoria.

25 Las moléculas de ácido nucleico según la presente divulgación pueden comprender cualquier clase de polinucleótidos o fragmentos de los mismos. Los polinucleótidos pueden incluir, por ejemplo, moléculas monocatenarias (de codificación o de no codificación) o bicatenarias y pueden ser ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Las moléculas de ARN comprenden tanto ARNhn (que contiene intrones) como ARNm (que no contiene intrones). Según la presente divulgación, los polinucleótidos pueden estar también ligados a otras moléculas tales como materiales de soporte o moléculas marcadoras de detección y pueden contener, aunque no es necesario, secuencias de codificación o no codificación adicionales. El término ácidos nucleicos como se usa en la presente invención comprenderá también cualquier clase de ácidos nucleicos sintéticos o modificados tales como polinucleótidos sintéticos o fragmentos de los mismos, ácidos peptidonucleicos (APN) o similares. Los tipos específicos de dichos ácidos nucleicos sintéticos o modificados son conocidos por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos sintéticos pueden comprender nucleósidos infrecuentes o artificiales o análogos de los mismos.

35 En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos según la presente invención son ácidos nucleicos modificados o alterados. La alteración o modificación puede efectuarse para alterar las condiciones de hibridación necesarias o para introducir mareajes o moléculas informadoras o por cualquier otra razón. Los tipos específicos de dichos ácidos nucleicos sintéticos o modificados son conocidos por los expertos en la técnica.

40 En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos sintéticos pueden comprender nucleósidos (por ejemplo, con componentes de azúcar alterados o con componentes de purina o pirimidina alterados, etc.) o nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos tiofosfato o fosforotioato) o análogos de los mismos infrecuentes o artificiales. Dichas alteraciones pueden comprender, por ejemplo, la introducción de mareajes tales como mareajes radioactivos (por ejemplo, como radioisótopos emisores de radiación <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H, etc.), la introducción de componentes coloreados o fluorescentes (por ejemplo, maleimida, yodoacetamida, etc.) o de restos de unión tales como biotina o similares en los ácidos nucleicos. En ciertas realizaciones, la introducción de grupos tiol en el componente de azúcar y/o pirimidina o purina (por ejemplo, 4-tiouridina o similar) puede tener cierta ventaja para la reacción de detección posterior. Las formas reactivas de tintes fluorescentes tales como, por ejemplo, verde Oregon 488, verde de rodamina, rojo de rodamina, rojo Texas, fluoresceína, tetrametilrodamina, biotina, ésteres de DSB-biotina y DNP-succinimidilo pueden usarse para marcar los ácidos nucleicos aplicados en los procedimientos según la presente invención. Según sea el caso, los mareajes pueden acoplarse mediante espaciadores a los ácidos nucleicos. Dichos espaciadores comprenden, por ejemplo, espaciadores de aminoalcanoilo o similares. En ciertas realizaciones de la presente invención, los ácidos nucleicos se modifican de modo que permitan el análisis FRET de la reacción de hibridación. Los procedimientos para la provisión de ácidos nucleicos modificados y alterados son conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos anteriores de modificaciones, alteraciones y mareajes son sólo para ejemplificación y no se pretende que limiten el alcance de la invención. Son conocidos por los expertos en la técnica diversas otras modificaciones y mareajes para ácidos nucleicos. En ciertas realizaciones de la invención, puede aplicarse cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica para uso en un procedimiento según la presente divulgación.

60 Los ácidos nucleicos para aplicación en un procedimiento según la presente divulgación son ácidos nucleicos de un gen CASP2 como se define anteriormente. Los ácidos nucleicos según la presente divulgación pueden ser también complementarios o complementarios inversos de cualquier ácido nucleico de CASP2. Los ácidos nucleicos para uso en un procedimiento según la presente divulgación pueden desviarse a este respecto de la estructura primaria de la secuencia de ácido nucleico dada en el número de acceso NM\_032982. Estas desviaciones o variaciones de la estructura primaria de los ácidos nucleicos pueden comprender, por ejemplo, sustituciones de ácidos nucleicos por nucleótidos infrecuentes o artificiales. Los ácidos nucleicos modificados se caracterizan por que hibridan con un ácido nucleico derivado del número de acceso NM\_032982 en condiciones de hibridación estándar aplicadas para la

## ES 2 337 573 T3

clase o tipo respectivo de ácido nucleico. Los expertos en la técnica saben cuáles condiciones de hibridación tienen que aplicarse para asegurar una hibridación específica de los diferentes tipos de ácidos nucleicos o ácidos nucleicos modificados o APN.

5 La determinación del estado de MSI presente en muestras en ciertas realizaciones de la presente divulgación está basada en la detección de la presencia o ausencia de mutaciones en los ácidos nucleicos de CASP2. La mutación como se usa en el contexto de la presente invención puede comprender inserciones o deleciones de uno o varios nucleótidos (o repeticiones nucleotídicas) en las secuencias de microsatélite especificadas.

10 Con respecto a la repetición T-25 dada a conocer en la presente memoria, cualquier longitud de repetición de la repetición T-25 en un procedimiento según la presente invención que sea T-23 o menor o T-27 o mayor (correspondiente a longitudes alélicas de 146 nt o menos y 150 nt o más en un sistema de detección como se ejemplifica en la presente memoria) se considera como indicativa de la presencia de una mutación. En ciertas realizaciones de la presente invención, una longitud alélica diferente de la longitud alélica dada en el número de acceso NM\_032982 en  
15 +2 o más nucleótidos o -2 o más nucleótidos en la repetición oligo-T localizada en la 3'-UTR de la secuencia citada será considerada como indicativa de la presencia de una mutación. La presencia de mutaciones en la repetición T-25 monomórfica según la presente invención es indicativa del estado de MSI-H.

20 La inestabilidad de microsatélites (MSI) como se usa en la presente memoria designa un tipo de inestabilidad genética presente en ciertos tumores epiteliales humanos que se caracteriza por variaciones de longitud en secuencias de ADN repetitivas cortas. A lo largo del texto de la presente invención, los términos MSI o fenotipo de MSI pueden usarse intercambiamente. En contraposición con ello, está el fenotipo de MSS (microsatélites estables). El acrónimo MSI-H como se usa en la presente memoria denominará un fenotipo que se caracteriza por un alto nivel de MSI según las recomendaciones de la ICG-HNPCC (Boland y col. 1998).

25 El estado de microsatélites como se usa en el contexto de la presente invención designa la presencia o ausencia de MSI o fenotipo de MSI-H. La estimación del estado de MSI según la presente divulgación puede efectuarse usando la detección de la presencia o ausencia de mutaciones en uno o más microsatélites. Los microsatélites que pueden usarse para tipado de MSI comprenden microsatélites localizados intergénicamente o superpuestos con regiones cromosómicas que contienen genes. Los microsatélites relacionados con genes pueden localizarse en la región 5' no traducida  
30 (UTR), la región de codificación, 3'-UTR o regiones intrónicas.

Se dan a continuación procedimientos para la detección de la presencia o ausencia de mutaciones.

35 Las afecciones médicamente relevantes asociadas a MSI a las que puede aplicarse el procedimiento dado a conocer en la presente memoria comprenden cualquier enfermedad asociada a inestabilidad de microsatélites. En una realización, dichas enfermedades son tumores. Son ejemplos de tumores asociados a inestabilidad de microsatélites los tumores del tracto anogenital, el tracto colorrectal (por ejemplo, carcinoma colorrectal, adenoma colorrectal, pólipos colorrectales, etc.), el tracto gastrointestinal (por ejemplo, cáncer gástrico, carcinoma del intestino delgado, pólipos  
40 del intestino delgado, tumores de los conductos biliares, carcinoma pancreático, etc.) y el tracto respiratorio, tumores endometriales (por ejemplo, carcinoma endometrial, hiperplasia endometrial, etc.), tumores del sistema nervioso central (por ejemplo, glioblastoma multiforme, meduloblastoma, etc.), tumores de próstata, tumores de mama (por ejemplo, carcinoma de mama), etc.

45 Una muestra según el procedimiento dado a conocer en la presente memoria puede comprender cualquier muestra que comprenda ácidos nucleicos de tejidos afectados por un trastorno o sospechosos de estar afectados por un trastorno asociado a la inestabilidad de microsatélites como se describe anteriormente. Las muestras se originan en el tracto anogenital, el tracto colorrectal, el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio y otras regiones en que aparecen afecciones médicamente relevantes asociadas a la inestabilidad de microsatélites.

50 Las muestras pueden comprender diversas clases de muestras de relevancia clínica tales como, por ejemplo, fluidos corporales tales como por ejemplo sangre, plasma, suero, secreciones, frotis, orina, semen, bilis, líquidos, etc. Además, las muestras pueden comprender heces, biopsias, muestras de células y tejidos. Las biopsias como se usa en el contexto de la presente invención pueden comprender, por ejemplo, muestras de resección de tumores, muestras de tejido  
55 preparadas por medios endoscópicos o biopsias de aguja de órganos.

En ciertas realizaciones, las muestras pueden originarse en pulmón, bronquio, tracto respiratorio inferior, tracto respiratorio superior, cavidad oral, estómago, esófago, intestino delgado, colon ascendente, colon transversal, colon descendente o colon sigmoideo, recto, ano, etc.

60 En ciertas realizaciones, la muestra puede ser una muestra histológica, una biopsia o una muestra citológica tal como, por ejemplo, un frotis, una torunda, un lavado que contienen fluido corporal. En ciertas realizaciones de la invención, las muestras pueden comprender especímenes fijados o conservados tales como especímenes citológicos o histológicos. La fijación o conservación pueden efectuarse mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica que comprenden fijación con alcohol, imbibición en parafina, fijación con formalina o similares. Las  
65 muestras pueden comprender en ciertas realizaciones heces o muestras obtenidas mediante medios endoscópicos tales como por ejemplo gastroscopia, colonoscopia, etc.

## ES 2 337 573 T3

Para los procedimientos según la presente divulgación, las muestras pueden procesarse o prepararse de manera adecuada para permitir la detección de las moléculas marcadoras bajo examen. En ciertas realizaciones, dichos procedimientos comprenden procedimientos para el aislamiento o la concentración de ácidos nucleicos de las muestras. Dichos procedimientos pueden comprender también la eliminación de los otros componentes de las muestras tales como, por ejemplo, incubación con enzimas para la degradación de ciertos compuestos tales como proteínas.

En una realización, puede aplicarse una etapa de concentración de células. Esta etapa puede comprender una centrifugación, una clasificación celular por ejemplo por citometría de flujo o similar, una concentración inmunológica de células (usando anticuerpos dirigidos contra epítopos de superficie celular) o cualquier otro procedimiento adecuado conocido por los expertos en la técnica. La concentración de células puede estar relacionada con la concentración de células en general o incluso con la concentración de tipos celulares específicos. En una realización, la concentración puede efectuarse mediante microdissección de preparaciones de tejido. Generalmente, las muestras que comprenden células afectadas por las afecciones médicamente relevantes bajo investigación son adecuadas para la aplicación de un procedimiento según la presente invención. En una realización, se aplican muestras en que al menos un 10% del contenido celular total está afectado por la afección médicamente relevante bajo investigación. En otra realización, al menos un 50% del contenido celular total está afectado por la afección médicamente relevante bajo investigación.

En ciertas realizaciones, las muestras comprenden ácidos nucleicos originarios de células de las regiones del cuerpo citadas. Generalmente, los ácidos nucleicos se preparan a partir de las muestras mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos de las muestras pueden prepararse de un modo que permita un análisis de los ácidos nucleicos mediante el procedimiento de detección respectivo. La extracción de ácidos nucleicos de muestras puede efectuarse mediante diversos procedimientos y puede emplearse un amplio intervalo de reactivos o kits comercialmente disponibles adecuados con este fin. Posteriormente, los ácidos nucleicos purificados pueden someterse a reacciones de detección adecuadas tales como, por ejemplo, reacciones de amplificación o hibridación.

Los procedimientos de detección para aplicación en la presente invención comprenden procedimientos para la detección de ácidos nucleicos en general así como procedimientos para la detección de mutaciones en ácidos nucleicos.

La detección de la presencia o ausencia de mutaciones puede efectuarse mediante cualquier procedimiento adecuado para la detección de mutaciones en moléculas de ácido nucleico conocidos por los expertos en la técnica. Los procedimientos adecuados para el análisis de mutaciones en ácidos nucleicos, y especialmente de mutaciones de delección o inserción en ácidos nucleicos, son conocidos por los expertos en la técnica. Dichos procedimientos pueden comprender, por ejemplo, cualquier procedimiento aplicado en el curso de la detección de la longitud de ácidos nucleicos tal como, por ejemplo, procedimientos de electroforesis (por ejemplo, electroforesis en gel, electroforesis capilar, etc.), procedimientos cromatográficos (por ejemplo, procedimientos de centrifugación en gradiente u otros procedimientos de centrifugación adecuados), procedimientos de espectrometría de masas, procedimientos de escisión endonucleolítica y exonucleolítica, etc.

La detección de los ácidos nucleicos o de mutaciones de los ácidos nucleicos respectivos puede emplear cualquier procedimiento informador adecuado. Dichos procedimientos pueden comprender la aplicación de moléculas informadoras tales como compuestos coloreados, compuestos fluorescentes, compuestos emisores de luz, compuestos emisores de radiación o una estructura de unión adecuada para interacción específica con otras moléculas. Dichos marcapuntos pueden comprender FITC, biotina, estreptavidina o similares. Dichas moléculas informadoras pueden aplicarse en forma de marcapuntos unidos covalente o no covalentemente a sondas o cebadores.

En ciertas realizaciones, los procedimientos para la detección de mutaciones pueden comprender reacciones de amplificación de ácido nucleico. Son conocidas por los expertos en la técnica reacciones de amplificación adecuadas y pueden comprender amplificación basada en ADN así como amplificación basada en ARN. Las reacciones de amplificación según la presente invención pueden comprender PCR, LCR, NASBA, etc. La reacción de amplificación puede efectuarse usando uno o más cebadores específicos.

En una realización, una reacción de amplificación comprende la amplificación de un solo ácido nucleico. En otra realización, la amplificación se lleva a cabo en forma de una reacción de amplificación múltiple que amplifica simultáneamente un conjunto de varios ácidos nucleicos. En aún otra realización, pueden efectuarse una o más reacciones en cadena de la polimerasa. Pueden efectuarse más de una PCR secuencialmente o de manera múltiple.

En una realización, la reacción de amplificación da lugar a fragmentos de ácido nucleico de 50 pb a aproximadamente 500 pb de longitud. En una realización preferida de la invención, la longitud de los productos de amplificación es de 75 pb a 300 pb de longitud. En una realización más preferida, la longitud del producto de amplificación es de 100 pb a 200 pb.

En una realización, puede aplicarse un sistema de amplificación de ácido nucleico como se detalla en los ejemplos de la presente memoria.

Sin embargo, pueden aplicarse diversos otros procedimientos para la detección de los ácidos nucleicos o de mutaciones de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, las longitudes alélicas detectadas en el sistema de detección respectivo dependen de los parámetros del sistema. Los expertos en la técnica saben cómo tienen que corregirse las longitudes

## ES 2 337 573 T3

alélicas respectivas correspondientes a correcciones en el sistema de detección. En el contexto de la presente invención, se citarán las longitudes alélicas que pueden detectarse con el sistema de detección como se da a conocer en los ejemplos de la presente memoria. Sin embargo, cualquier longitud alélica determinada usando otro sistema pero correspondiente a las longitudes alélicas citadas estará comprendida cuando se usen las longitudes alélicas citadas en la presente memoria.

Los cebadores para llevar a cabo la reacción de amplificación en un procedimiento según la presente divulgación se diseñan de modo que den lugar a productos de amplificación de las longitudes de fragmento citadas. Generalmente, son cebadores para uso según la presente divulgación moléculas de ácido nucleico capaces de hibridar con una secuencia de ácido nucleico diana. Los cebadores son ácidos nucleicos capaces de hibridar con ácidos nucleicos del gen CASP2 o fragmentos de los mismos. Dichos cebadores comprenden, por ejemplo, ácidos nucleicos complementarios o complementarios inversos de ácidos nucleicos de CASP2 o de ácidos nucleicos complementarios inversos de ácidos nucleicos de CASP2. El diseño de los cebadores adecuados puede efectuarse usando diversas herramientas para selección de cebador conocidas por los expertos en la técnica. Los ejemplos de cebadores adecuados pueden seleccionarse, por ejemplo, de los siguientes pares:

1 fwd 5'-CTGCCTCAAAGGGACTGC-3'

1 rev 5' -CCTTCCCGATCCTTGATAAGT-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación de 144 pb

2 fwd 5' -CCTAGAAACCTTTATCCCTGCTT-3'

2 rev 5'-GAGCTTGCAGTGAGCTGAGA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación de 148 pb

3 fwd 5'- AACCTTTATCCCTGCTTATCTGA-3'

3 rev 5'- AGTTGGAGCTTGCAGTGAGC-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 148 pb

4 fwd 5' -CCTAGAAACCTTTATCCCTGCTT-3'

4 rev 5'-GAGCTTGCAGTGAGCTGAGA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 149 pb

5 fwd 5'-ACTTCCCAACTTCCCTGTTCTT-3'

5 rev 5'-AGAATGGCGTGAACCCGGGA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 144 pb

6 fwd 5' -GAAACTTCCCAACTTCCCTGT-3'

6 rev 5'-GGCGTGAACCCGGGAGTTGG-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 142 pb

7 fwd 5'-AAACTTCCCAACTTCCCTGTTC-3'

7 rev 5'-ATCATGAGGTCAGGAGATCA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 278 pb

8 fwd 5' -AACTTCCCAACTTCCCTGTTC-3'

8 rev 5'-ATCATGAGGTCAGGAGATC-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 277 pb

9 fwd 5'-CTTCCCAACTTCCCTGTTCTT-3'

9 rev 5'-GGATCATGAGGTCAGGAGA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 277 pb

10 fwd 5'-ACCTAGAAACCTTTATCCCTGCT T-3'

10 rev 5' -CATGAGGTCAGGAGATCAA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 305 pb

11 fwd 5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCT-3'

## ES 2 337 573 T3

11 rev 5'-TTTGGGAGGCTGAGGTGGGT-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 328 pb

122fwd 5'-AACCTAGAAACCTTTATCCCTGCT-3'

5

122rev 5'-ACTTTGGGAGGCTGAGGTGGG-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 332 pb.

10 Los expertos en la técnica saben cómo pueden seleccionarse cebadores y podrían encontrar otras alternativas para los pares de cebadores para inclusión en un kit según la presente divulgación. Además, los cebadores dados pueden usarse en combinaciones distintas de las dadas. Por tanto, los cebadores de codificación de cualquiera de los pares de cebadores dados pueden usarse con un cebador inverso adecuado seleccionado de uno cualquiera de los pares de cebadores dados o un cebador completamente diferente. Los expertos en la técnica saben cómo elegir los pares de cebadores adecuados. En ciertas realizaciones, la longitud de los amplímeros puede ser superior a 200 pb o inferior a 15 100 pb dependiendo de las condiciones de amplificación.

20 En ciertas realizaciones, las sondas o cebadores pueden marcarse detectablemente. Los mareajes adecuados pueden ser compuestos coloreados, compuestos fluorescentes, compuestos emisores de luz, compuestos emisores de radiación o de estructura de unión adecuada para interacción específica con otras moléculas. Dichos mareajes pueden comprender FITC, biotina, estreptavidina o similares.

25 En ciertas realizaciones de la presente invención, la detección de mutaciones en la repetición T-25 del gen de caspasa 2 puede usarse con fines de diagnóstico en combinación con la detección de mutaciones en otras regiones de microsatélites. Generalmente, puede emplearse cualquier otra región de microsatélites conocida por estar asociada al estado de MSI. En ciertas realizaciones de la invención, el microsatélite de T-25 de caspasa 2 puede usarse en combinación con los microsatélites de los genes BAT25 y/o BAT26.

30 Además, puede aplicarse una combinación de repetición T-25 con microsatélite BAT40. En una realización de la presente invención, la detección de mutaciones en la repetición T-25 del gen de caspasa 2 puede combinarse con la detección de mutaciones de todos o algunos genes incluidos en el panel Bethesda (D2S123, D17S250, D5S346). En ciertas realizaciones, pueden efectuarse combinaciones que emplean dos o varios microsatélites para examen de diagnóstico de tejido normal. Las combinaciones más adecuadas adicionales para la determinación del estado de microsatélites pueden comprender la determinación de mutaciones en una o más de las regiones de microsatélites seleccionadas del grupo que comprende: CASP2, BAT25, BAT26, BAT40, APdelta3, U79260, PPP3CA, CTNNB1, 35 GTF2E1 y otras.

Los expertos en la técnica saben cómo pueden seleccionarse los cebadores adecuados para efectuar la reacción de la presente invención. Los cebadores adecuados de algunos de los marcadores citados anteriormente comprenden:

40 BAT40 fwd ATTAACCTTCCTACACCACAAC  
rev GTAGAGCAAGACCACCTTG

D2S123 fwd AACAGGATGCCTGCCTTTA  
45 rev GGACTTTCCACCTATGGGAC

D17S250 fwd GGAAGAATCAAATAGACAAT  
rev GCTGGCCATATATATATTTAAACC

50 D5S346 fwd ACTCACTCTAGTGATAAATCG  
rev AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT

55 GTF2E1 fwd CCCTTCCTTGCTGTCCTACA  
rev TGAACCCAGGAGGCAGAG

PPP3CA fwd GTCGCAGCACTAAAAATGGA  
60 rev GAAGGGCATTCAAGCACACT

CTNNB1 fwd AATTTAGCAAACCCTAGCCTTG  
rev AAGAGCTACTTCAAAGCAAGCA

65 APdelta3 fwd AGCAGTGGCAGCTCAGAAAT  
rev GCCTCTTGATCACGTCCAA

## ES 2 337 573 T3

U79260 fwd TTTGTTATATCCCATTAGGTGCC  
rev AGCCTGGTGACAGAGTGAGAC

5

Es otro aspecto de la presente divulgación un kit para efectuar los procedimientos dados a conocer en la presente memoria. Un kit comprende uno o más agentes de unión que reconocen específicamente un ácido nucleico de CASP2. En ciertas realizaciones, los kits pueden proporcionarse en forma de dispositivos de diagnóstico *in vitro*.

10

Un dispositivo de diagnóstico *in vitro* es un kit que se pretende para estimación del diagnóstico de una afección médicamente relevante de muestras de cuerpo humano o animal. En ciertas realizaciones, será un dispositivo de diagnóstico *in vitro* cualquier dispositivo que entre dentro del alcance de la definición de dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* como se da en la directiva 98/79 EC, artículo 1 (b):

15

“dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*” significa cualquier dispositivo médico que sea un producto reactivo, calibrador, material de control, kit, instrumento, aparato, equipo o sistema, usado solo o en combinación, que el fabricante pretende usar *in vitro* para el examen de especímenes, incluyendo donaciones de sangre y tejido, derivados del cuerpo humano, única o principalmente con el fin de proporcionar información referente a un estado fisiológico o patológico; o referente a una anomalía congénita; o para determinar la seguridad y compatibilidad con receptores potenciales; o para controlar medidas terapéuticas”.

20

El dispositivo de diagnóstico *in vitro* se aplicará también a IVD de clase I de EE.UU. y en general a dispositivos de diagnóstico *in vitro* que se proporcionan sin reivindicaciones respecto a su desempeño de diagnóstico. Por lo tanto, se entenderá también que cualquier clase de ASR o similar es un dispositivo de diagnóstico *in vitro* como se usa en la presente memoria. En una realización, el dispositivo de diagnóstico *in vitro* se caracteriza por reactivos de detección fijados a una fase sólida específicos de una molécula marcadora.

25

Los agentes de unión incluidos en los kits y dispositivos de diagnóstico *in vitro* pueden comprender moléculas de ácido nucleico de cualquier clase y naturaleza tales como, por ejemplo, polinucleótidos o fragmentos de los mismos. Los polinucleótidos pueden incluir, por ejemplo, moléculas monocatenarias (de codificación o no de codificación) o bicatenarias, y pueden ser ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Las moléculas de ARN comprenden tanto ARNhn (que contiene intrones) como ARNm (que no contiene intrones). Los polinucleótidos incluidos en un kit pueden estar también ligados a cualquier otra molécula tal como materiales de soporte o moléculas marcadoras de detección, y pueden contener, pero no necesariamente, secuencias de codificación o no codificación adicionales. Los ácidos nucleicos proporcionados como partes de un kit pueden comprender también cualquier clase de ácido nucleico sintético o modificado tal como polinucleótidos sintéticos o modificados o fragmentos de los mismos, ácidos peptidonucleicos (APN) o similares. Son conocidos tipos específicos de dichos ácidos nucleicos sintéticos o modificados por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos sintéticos pueden comprender nucleósidos (por ejemplo, con componentes de azúcar alterados o con componentes de purina o pirimidina alterados, etc.) o nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos de tiofosfato o fosforotioato) o análogos de los mismos infrecuentes o artificiales. Dichas alteraciones pueden comprender, por ejemplo, la introducción de marcadores tales como marcadores radiactivos (por ejemplo, en forma de radioisótopos emisores de radiación  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ , etc.), la introducción de componentes coloreados o fluorescentes (por ejemplo, maleimida, yodoacetamida, etc.) o de restos de unión tales como biotina o similares en los ácidos nucleicos. En ciertas realizaciones, la introducción de grupos tiol en el componente de azúcar y/o pirimidina o purina (por ejemplo, 4-tiouridina o similar) puede tener cierta ventaja para la reacción de detección posterior. Pueden usarse formas reactivas de tintes fluorescentes tales como, por ejemplo, verde Oregon 488, verde de rodamina, rojo de rodamina, rojo Texas, fluoresceína, tetrametilrodamina, biotina, ásteres de DSB-biotina y DNP-succinimidilo para marcar los ácidos nucleicos para uso en los kits y los dispositivos de diagnóstico *in vitro* según la presente divulgación. Según sea el caso, los marcadores pueden acoplarse con los ácidos nucleicos mediante espaciadores. Dichos espaciadores contienen, por ejemplo, espaciadores de aminohexanoilo o similares. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos se modifican de modo que permitan el análisis FRET de la reacción de hibridación. Los procedimientos para la provisión de ácidos nucleicos modificados o alterados son conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos anteriores de modificaciones, alteraciones y marcadores son sólo para ejemplificación y no se pretende que limiten el alcance de la invención. Son conocidos por los expertos en la técnica diversas otras modificaciones y marcadores para ácidos nucleicos. En ciertas realizaciones, puede aplicarse cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica para la inclusión de ácidos nucleicos en un kit o dispositivo de diagnóstico *in vitro* según la presente divulgación.

55

60

En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden proporcionarse en forma de sondas o cebadores para efectuar reacciones de hibridación de ácido nucleico o amplificación de ácido nucleico. Las sondas y cebadores pueden ser de cualquier clase y naturaleza conocida por los expertos en la técnica. Preferiblemente, los cebadores son de un tamaño de 5 a 50 nt, más preferiblemente de un tamaño de 10 nt a 35 nt y lo más preferiblemente de un tamaño de 15 nt a 25 nt. Los expertos en la técnica saben cómo seleccionar cebadores adecuados para la reacción de amplificación de ácido nucleico. El tamaño de los cebadores depende de las condiciones de amplificación así como de la secuencia del ácido nucleico para amplificar. Por lo tanto, bajo ciertas circunstancias, pueden preferirse cebadores mayores, mientras que en condiciones de amplificación estándar conocidas por los expertos en la técnica, pueden ser aplicables los tamaños de cebador como se prefieren anteriormente.

65

## ES 2 337 573 T3

En ciertas realizaciones, pueden incluirse componentes adicionales en un kit o dispositivo de diagnóstico *in vitro* según la presente divulgación. Dichos componentes pueden comprender, por ejemplo, reactivos útiles o necesarios en una reacción de amplificación de ácido nucleico que comprenden una o más enzimas polimerasas, sustratos para la reacción de amplificación, tampones y/o activadores o similares.

Además, en ciertas realizaciones los kits y dispositivos de diagnóstico *in vitro* pueden comprender compuestos para uso en el acondicionamiento, purificación o concentración de muestras o ácidos nucleicos que comprenden fases sólidas (por ejemplo, partículas, perlas, perlas magnéticas de cualquier forma tal como, por ejemplo, en forma de columnas de centrifugación, columnas cromatográficas o similares), dispositivos para centrifugación o cromatografía, tubos listos para usar y/o filtros y/o membranas. También pueden incluirse (adicionalmente) en ciertas realizaciones de la presente invención reactivos y tampones adecuados para la preparación de ADN genómico a partir de muestras dadas (por ejemplo, de células, suspensiones celulares, tejidos y/o heces y/o sangre y/o esputo). En ciertas realizaciones adicionales de los kits y dispositivos de diagnóstico *in vitro*, el empaquetado de dichos kits y dispositivos de diagnóstico *in vitro* puede ser adecuado para uso en sistemas automatizados.

Cada uno de los rasgos anteriores de los kits y dispositivos de diagnóstico *in vitro* puede aplicarse a los kits de la presente divulgación solo o en combinación con cada uno de los demás rasgos, en una combinación con algunos de los demás rasgos (más de uno) o incluso en una combinación con todos los demás rasgos dados.

En una realización, un kit puede comprender un par de cebadores para el desempeño de una reacción de amplificación. El par de cebadores puede dar lugar a amplímeros de una longitud de 100 pb a 200 pb. El par de cebadores puede tener en ciertas realizaciones secuencias seleccionadas de los siguientes pares de cebadores:

1fwd 5'-CTGCCTCAAAGGGACTGC-3'

1rev 5'-CCTTCCCGATCCTTGATAAGT-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación de 144 pb

2fwd 5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCTT-3'

2rev 5'-GAGCTTGCAGTGAGCTGAGA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación de 148 pb

3fwd 5'-AACCTTTATCCCTGCTTATCTGA-3'

3rev 5'-AGTTGGAGCTTGCAGTGAGC-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 148 pb

4fwd 5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCTT-3'

4rev 5'-GAGCTTGCAGTGAGCTGAGA-3' correspondiente a una longitud de producto de amplificación predicho de 149 pb

5fwd 5'-ACTTCCCAACTTCCCTGTTCTT-3'

5rev 5'-AGAATGGCGTGAACCCGGGA-3' correspondiente a una longitud de producto de amplificación predicho de 144 pb

6fwd 5'-GAAACTTCCCAACTTCCCTGT-3'

6rev 5'-GGCGTGAACCCGGGAGTTGG-3' correspondiente a una longitud de producto de amplificación predicho de 142 pb

7fwd 5'-AAACTTCCCAACTTCCCTGTTC-3'

7rev 5'-ATCATGAGGTCAGGAGATCA-3' correspondiente a una longitud de producto de amplificación predicho de 278 pb

8fwd 5'-AACTTCCCAACTTCCCTGTTC-3'

8rev 5'-ATCATGAGGTCAGGAGATC-3' correspondiente a una longitud de producto de amplificación predicho de 277 pb

9fwd 5'-CTTCCCAACTTCCCTGTTCTT-3'

9rev 5'-GGATCATGAGGTCAGGAGA-3' correspondiente a una longitud de producto de amplificación predicho de 277 pb

## ES 2 337 573 T3

10fwd 5'-ACCTAGAAACCTTTATCCCTGCT T-3'

10rev 5'-CATGAGGTCAGGAGATCAA-3' correspondiente a una longitud de producto de amplificación predicho de 305 pb

11fwd 5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCT-3'

11 rev 5'-TTTGGGAGGCTGAGGTGGGT-3' correspondiente a una longitud de producto de amplificación predicho de 328 pb

122fwd 5'-AACCTAGAAACCTTTATCCCTGCT-3'

122rev 5'-ACTTTGGGAGGCTGAGGTGGG-3' correspondiente a una longitud de producto de amplificación predicho de 332 pb.

Los expertos en la técnica saben cómo pueden seleccionarse cebadores y podrían encontrar otras alternativas para los pares de cebadores para inclusión en un kit. Además, los cebadores dados pueden usarse en combinaciones distintas de las dadas. Por tanto, los cebadores de codificación de cualquiera de los pares de cebadores dados pueden usarse con un cebador inverso adecuado seleccionado de uno cualquiera de los pares de cebadores dados o de un cebador completamente diferente. Los expertos en la técnica saben cómo elegir los pares de cebadores adecuados. En ciertas realizaciones, la longitud de los amplímeros puede ser superior a 200 pb o inferior a 100 pb dependiendo de las condiciones de la amplificación.

En ciertas realizaciones, el kit comprende adicionalmente compuestos para la detección de mutaciones en otros genes. Dichos genes pueden seleccionarse de un grupo que comprende, pero sin limitación, CASP2, BAT25, BAT26, BAT40, APdelta3, U79260, PPP3CA, CTNNB1 y GTF2E1.

Un aspecto adicional de la presente divulgación está relacionado con el uso de sondas y cebadores específicos del gen CASP2 dado a conocer con el número de acceso NM\_032982. Las sondas y cebadores pueden ser complementarios o complementarios inversos de la secuencia de ácido nucleico dada en dicho número de acceso. Las sondas o cebadores pueden ser ácidos nucleicos de cualquier clase y naturaleza como se definen anteriormente.

Fabricar un kit o dispositivo de diagnóstico *in vitro* como se usa en este contexto designa cualquier acción que pretenda proporcionar de modo comercial a clientes un kit o dispositivo de diagnóstico *in vitro* como se definen anteriormente. Dicha acción comprende acciones tales como la fabricación de partes de un kit o dispositivo de diagnóstico *in vitro* acabado, el ensamblaje de las partes en un kit, y volver a empaquetar, etiquetar y/o restaurar los kits o dispositivos de diagnóstico *in vitro*.

A este respecto, la presente divulgación designa también un procedimiento para el desarrollo de kits y dispositivos de diagnóstico *in vitro* haciendo uso de las sondas y cebadores específicos del gen CASP2 dado a conocer con el número de acceso NM\_032982. Dichas sondas y cebadores pueden usarse a este respecto como ayuda en el desarrollo de kits y dispositivos de diagnóstico *in vitro* o ser parte de los kits y dispositivos de diagnóstico *in vitro* en desarrollo.

El desarrollo como se usa en el contexto de la presente divulgación estará relacionado con todas las actividades de diseño y desarrollo efectuadas para posibilitar a un fabricante la producción controlada de un kit o dispositivo de diagnóstico *in vitro* acabado pretendida para la distribución comercial o la venta de dicho kit o dispositivo de diagnóstico *in vitro*. El desarrollo de kits y dispositivos de diagnóstico *in vitro* como se usan en el contexto de la presente divulgación estará relacionado en consecuencia con todas las actividades en relación con el diseño y desarrollo, verificación de diseño y desarrollo, validación de diseño y desarrollo, estimación de los datos de desempeño, evaluación de los datos de seguridad y eficacia de kits y dispositivos de diagnóstico *in vitro*. En una realización, el desarrollo estará relacionado con el ensayo de los resultados de diseño y desarrollo de kits y dispositivos de diagnóstico *in vitro* para adecuación respecto al uso pretendido propuesto. El uso pretendido a este respecto se entenderá como los fines de detección o diagnóstico para los que el kit o dispositivo de diagnóstico *in vitro* se aplicará.

El procedimiento de desarrollo de kits y dispositivos de diagnóstico *in vitro* como se da a conocer en la presente memoria puede emplear las sondas y cebadores como se dan a conocer en la presente memoria en todas las etapas del diseño, desarrollo, verificación, validación, provisión de datos para solicitud de registro y autorización/aprobación, o pueden emplearse las sondas y cebadores como se dan a conocer en la presente memoria sólo en una o varias de las etapas citadas de diseño y desarrollo del kit o dispositivo de diagnóstico *in vitro*. En una realización, el procedimiento de desarrollo de los kits o dispositivos de diagnóstico *in vitro* según la presente divulgación es un procedimiento para el diseño y desarrollo de dichos kits o dispositivos de diagnóstico *in vitro* en el que las sondas y cebadores como se dan a conocer en la presente memoria se usan para la verificación y/o validación del diseño y desarrollo. En otra realización, el procedimiento de desarrollo de kits y dispositivos de diagnóstico *in vitro* es un procedimiento para la provisión de datos para solicitud de registro y autorización/aprobación de los kits y/o dispositivos de diagnóstico *in vitro* ante las autoridades reguladoras nacionales o regionales y/u organismos reguladores nacionales o regionales (notificados), en el que las sondas y cebadores como se dan a conocer en la presente memoria se usan para la provisión de datos técnicos, datos de desempeño o datos de seguridad y eficacia respecto al kit o dispositivo de diagnóstico *in vitro*. En una realización adicional, el procedimiento de desarrollo de kits y dispositivos de diagnóstico *in vitro* es un procedimiento en el que se combinan los últimos procedimientos.

## ES 2 337 573 T3

Es un aspecto adicional un sistema para la estimación del estado de MSI de afecciones médicamente relevantes basado en la detección de mutaciones en la repetición T-25 de la 3'-UTR del gen CASP2. El sistema puede comprender varios componentes incluyendo, pero sin limitación, al menos un componente para la detección y/o evaluación de niveles y/o intensidades de señal, en el que las señales son indicativas de la presencia o ausencia de mutaciones en la repetición T-25 de la 3'-UTR del gen CASP2, al menos un componente para la correlación de los niveles y/o intensidades de señal detectados y/o evaluados con datos clínicos, en el que los datos clínicos están relacionados con la esperanza de éxito y/o la eficacia de las medidas terapéuticas aplicadas a la afección médicamente relevante bajo investigación.

El sistema puede estar informatizado en ciertas realizaciones.

El componente para la detección y/o evaluación de los niveles y/o intensidades de señal, en el que las señales son indicativas de la presencia o ausencia de mutaciones en la repetición T-25 de la 3'-UTR del gen CASP2, puede comprender dispositivos de cualquier clase y naturaleza aplicados para análisis de los resultados de los procedimientos dados a conocer en la presente memoria para la detección de mutaciones. En ciertas realizaciones, el componente puede ser un dispositivo aplicable para la detección de señales de fluorescencia, un dispositivo aplicable para la detección de la absorción de luz o similar.

El componente para la correlación de los niveles y/o intensidades de señal detectados y/o evaluados con datos clínicos, en el que los datos clínicos están relacionados con la esperanza de éxito y/o eficacia de las medidas terapéuticas aplicadas a la afección médicamente relevante bajo investigación, puede comprender un medio de almacenamiento para almacenar y/o proporcionar información sobre la esperanza de éxito y/o eficacia de las medidas terapéuticas en correlación con la presencia o ausencia de mutaciones en la repetición T-25 de la 3'-UTR del gen CASP2. Dichos medios de almacenamiento pueden ser, por ejemplo, una base de datos, una genoteca, un fichero o cualquier otro medio adecuado. El medio de almacenamiento puede proporcionarse de forma digital o analógica. Los medios de almacenamiento para aplicación en un sistema según la presente invención pueden comprender, por ejemplo, micro(chips) de ordenadores, cualquier medio de almacenamiento digital, formatos basados en papel, medios de almacenamiento de base magnética, medios de almacenamiento fotográficos, microfichas o cualquier otro formato adecuado.

El sistema puede usarse en ciertas realizaciones para un procedimiento de estimación de la terapia adecuada de individuos. Un aspecto adicional de la presente invención es por lo tanto un procedimiento informatizado para crear una estrategia para la terapia de afecciones médicamente relevantes asociadas a MSI que comprende i) comparar los datos que representan la presencia o ausencia de mutaciones en la repetición T-25 localizada en la 3'-UTR del gen CASP2 con datos clínicos que comprenden información sobre la presencia o ausencia de mutaciones en dicha repetición T-25 e información sobre el curso de la enfermedad de los pacientes y el resultado mediante un medio de comparación; ii) crear subgrupos de datos que representan individuos según la presencia o ausencia de mutaciones y suministrar los subgrupos a un medio de estimación; y iii) estimar la comparación basada en los subgrupos de datos mediante el medio de estimación y suministrar la estimación del medio de estimación a un medio de ajuste de terapia, ajustando el medio de ajuste de terapia una terapia adecuada para los individuos según la estimación. Es un aspecto adicional de la presente divulgación ácidos nucleicos para efectuar un procedimiento de estimación del estado de MSI de afecciones médicamente relevantes. Dichos ácidos nucleicos pueden comprender sondas y cebadores útiles para la detección de la presencia o ausencia de mutaciones en la repetición T-25 localizada en la 3'-UTR del gen CASP2.

En una realización, los ácidos nucleicos pueden comprender, por ejemplo, (pares de) cebadores para el desempeño de una reacción de amplificación. Los cebadores pueden dar lugar a amplímeros de una longitud de, por ejemplo, 100 pb a 200 pb. El par de cebadores puede tener en ciertas realizaciones secuencias seleccionadas de los siguientes pares de cebadores:

1fwd 5'-CTGCCTCAAAGGGACTGC-3'

1rev 5'-CCTTCCCGATCCTTGATAAGT-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación de 144 pb

2fwd 5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCTT-3'

2rev 5'-GAGCTTGCAGTGAGCTGAGA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación de 148 pb

3fwd 5'- AACCTTTATCCCTGCTTATCTGA-3'

3rev 5'- AGTTGGAGCTTGCAGTGAGC-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 148 pb

4fwd 5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCTT-3'

4rev 5'-GAGCTTGCAGTGAGCTGAGA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 149 pb

## ES 2 337 573 T3

5fwd 5'-ACTTCCCAACTTCCCTGTTCTT-3'

5rev 5'-AGAATGGCGTGAACCCGGGA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 144 pb

6fwd 5'-GAAACTTCCCAACTTCCCTGT-3'

6rev 5'-GGCGTGAACCCGGGAGTTGG-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 142 pb

7fwd 5'-AAACTTCCCAACTTCCCTGTTC-3'

7rev 5'-ATCATGAGGTCAGGAGATCA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 278 pb

8fwd 5'-AACTTCCCAACTTCCCTGTTC-3'

8rev 5'-ATCATGAGGTCAGGAGATC-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 277 pb

9fwd 5'-CTTCCCAACTTCCCTGTTCTT-3'

9rev 5'-GGATCATGAGGTCAGGAGA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 277 pb

10fwd 5'-ACCTAGAAACCTTTATCCCTGCT T-3'

10rev 5'-CATGAGGTCAGGAGATCAA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 305 pb

11fwd 5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCT-3'

11rev 5'-TTTGGGAGGCTGAGGTGGGT-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 328 pb

12fwd 5'-AACCTAGAAACCTTTATCCCTGCT-3'

12rev 5'-ACTTTGGGAGGCTGAGGTGGG-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 332 pb.

Los expertos en la técnica saben cómo pueden seleccionarse los cebadores y podrían encontrar otros alternativos a los pares de cebadores para inclusión en un kit según la presente divulgación. Además los cebadores dados pueden usarse en combinaciones distintas de las dadas. Por tanto, los cebadores de codificación de cualquiera de los pares de cebadores pueden usarse con un cebador inverso adecuado seleccionado de uno cualquiera de los pares de cebadores dados o de un cebador completamente diferente. Los expertos en la técnica saben cómo elegir los pares de cebadores adecuados. En ciertas realizaciones, la longitud de los amplímeros puede ser superior a 200 pb o inferior a 100 pb, dependiendo de las condiciones de amplificación.

La presente divulgación proporciona compuestos y procedimientos para el desempeño mejorado de la estimación del estado de MSI en afecciones médicamente relevantes asociadas al MSI.

Lo siguiente se pretende únicamente como ejemplificación de la invención y no se pretende que limite el alcance de la invención.

### Ejemplo 1

*Estimación de la inestabilidad en la repetición mononucleotídica CASP2 en carcinomas colorrectales con MSI-H y MSS*

#### *Preparación de muestra y extracción de ADN*

Se aisló ADN genómico de especímenes de CRC fijados con formalina y embebidos en parafina (n=117) después de microdissección manual usando un kit comercialmente disponible (DNeasy Tissue KIT, Qiagen, Hilden, Alemania). Para la evaluación de la distribución alélica, se aisló ADN genómico de muestras de tejido no enfermo de donantes no relacionados (n=200).

## ES 2 337 573 T3

### *Análisis de la inestabilidad de microsatélites y PCR múltiple*

Se llevó a cabo el tipado de la inestabilidad de microsatélites usando el panel marcador de ICG-HNPCC estándar como se describe en (Boland y col. 1998, Sutter y col. 1999). Se clasificaron los tumores como de microsatélites altamente inestables (MSI-H) si más de un 30% de los marcadores exhibían inestabilidad, de microsatélites poco inestables (MSI-L) con inestabilidad en sólo un marcador, o de microsatélites estables (MSS) si no se detectaron inestabilidades.

Los cebadores de PCR para la amplificación de T<sub>25</sub>-CASP2 (fwd 5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCTT-3' y rev 5'-GAGCTTGCAGTGAGCTGAGA-3') se diseñaron usando el software "Primer3" (Whitehead, MIT, EE.UU.). Los cebadores de PCR de codificación se marcaron en 5' con isotiocianato de fluoresceína (FITC; BAT26 y T<sub>25</sub>-CASP2) o tinte fluorescente HEX (BAT25), respectivamente. Se llevó a cabo la PCR múltiple en un volumen de reacción total de 25 µl usando una concentración final de 200 µM de dNTP, 12,5 pM de cada cebador, 1x tampón de PCR (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y 0,75 unidades de ADN polimerasa Taq (GIBCO/BRL, Eggenstein, Alemania). Se usaron 50 ng de ADN genómico como molde. Se sometieron las mezclas de reacción a las siguientes etapas: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 38 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, asociación a 55°C durante 30 s, extensión a 72°C durante 1 min y una etapa de extensión final a 72°C durante 7 min. Se sometieron a electroforesis los productos de PCR en geles de agarosa al 2%.

### *Análisis de fragmentos y evaluación estadística*

Para el análisis de fragmentos, se mezclaron 2 µl de productos de PCR apropiadamente diluidos con 12 µl de formamida y 0,2 µl de ROX500 de longitud estándar (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). Se separaron las diluciones con ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) usando el conjunto de filtros D. Se analizaron tamaño, altura y perfiles de los picos de microsatélites usando el software GeneScan 3.7 (Applied Biosystems). El producto de PCR con el área de pico mayor se definió como el alelo principal. Para cada tumor, se contó el número de bases desplazadas en comparación con la mucosa normal correspondiente, y se calcularon las delecciones medias de pares de bases para cada marcador de microsatélite mononucleotídico. El análisis estadístico y representaciones gráficas (diagrama Box-Whisker, histograma) se efectuaron usando el software Statistica 6.0 (StatSoft, Tulsa, EE.UU.).

Durante la búsqueda de microsatélites localizados en las regiones 3' no traducidas (3'-UTR) de genes relevantes para cáncer, se identificó una repetición T<sub>25</sub> localizada en la 3'-UTR del gen de caspasa 2 (CASP2). Para ensayar la sensibilidad y especificidad de diagnóstico de la T<sub>25</sub>-CASP2, se analizó la inestabilidad en el locus T<sub>25</sub>-CASP2 de especímenes de cáncer colorrectal tipados previamente en su estado de microsatélite usando el panel marcador de ICG-HNPCC estándar (Boland y col. 1998) como MSI-H (n=57) o no MSI-H (MSI-L, n=10; MSS, n=50). En todos los CRC con MSI-H, se observaron mutaciones de T<sub>25</sub>-CASP2 (Tabla 1).

TABLA 1

### *Mutaciones de marcadores de microsatélites en CRC con MSI-H*

Círculos negros- mutados, círculos blancos- tipo silvestre, n.a.- no analizable

Caso	Panel de referencia (ICG HNPCC)					
	BAT25	BAT26	D17S250	D2S123	D5S346	CASP2
HD-01	•	•	•	○	•	•
HD-02	•	•	•	○	•	•
HD-03	•	•	•	•	•	•
HD-04	•	•	•	•	○	•
HD-05	•	•	•	○	•	•
HD-06	•	•	•	○	○	•
HD-07	•	•	○	•	○	•
HD-08	•	•	•	•	•	•
HD-09	•	•	•	○	•	•
HD-10	•	•	•	○	•	•

ES 2 337 573 T3

	HD-11	•	•	•	•	•	•
	HD-12	•	•	•	•	•	•
5	HD-13	•	•	○	○	○	•
	HD-14	•	•	n.a.	•	•	•
10	HD-15	•	○	•	•	•	•
	HD-16	•	•	•	•	•	•
	HD-17	•	•	•	•	•	•
15	HD-18	•	•	○	•	•	•
	HD-19	•	•	○	•	•	•
	HD-20	•	•	•	•	•	•
20	HD-21	•	•	•	•	•	•
	HD-22	•	•	•	•	•	•
	HD-23	•	•	•	•	○	•
25	HD-24	•	•	○	•	○	•
	HD-25	•	•	•	•	•	•
	HD-26	•	•	•	•	•	•
30	HD-27	•	•	•	•	•	•
	HD-28	•	•	•	•	•	•
35	HD-29	•	•	•	•	○	•
	HD-30	•	•	•	•	•	•
	HD-31	•	•	○	•	•	•
40	HD-32	○	•	•	•	•	•
	HD-33	•	•	•	•	○	•
	HD-34	•	•	○	○	○	•
45	HD-35	•	•	○	○	○	•
	HD-36	•	•	•	•	•	•
	HD-37	•	•	•	•	•	•
50	HD-38	•	•	•	•	•	•
	HD-39	•	•	•	○	•	•
55	HD-40	•	•	•	•	•	•
	HD-41	•	•	•	•	•	•
	HD-42	•	•	•	•	•	•
60	HD-43	•	•	•	•	•	•
	HD-44	•	•	•	•	•	•

65

## ES 2 337 573 T3

	HD-45	•	•	○	•	•	•
5	HD-46	•	•	•	•	•	•
	HD-47	•	•	○	○	○	•
	HD-48	•	•	•	•	○	•
10	HD-49	•	•	•	•	•	•
	HD-50	•	•	•	•	•	•
	HD-51	•	•	•	•	•	•
15	HD-52	•	•	•	•	•	•
	HD-53	•	•	•	•	•	•
	HD-54	•	•	•	•	•	•
20	HD-55	•	•	•	•	•	•
	HD-56	•	•	•	•	•	•
	HD-57	•	•	•	•	•	•
25	MSI pos.	56	56	46	46	45	57
	Total	57	57	56	57	57	57
30	Sensibilidad (%)	98,2	98,2	82,1	80,7	78,9	100,0

35 Por tanto, la T<sub>25</sub>-CASP2 superaba a los marcadores de ICG-HNPCC estándar con las frecuencias de mutación mayores, BAT25 y BAT26, en sensibilidad de diagnóstico del fenotipo MSI-H (mutaciones en 56/57 casos cada uno). En contraposición, no se observaron mutaciones en ninguna de las muestras de CRC con MSS o MSI-L (no mostrado).

### 40 *Distribución de las longitudes alélicas de CASP2 en especímenes de tejido normal*

Para reducir adicionalmente la carga de trabajo necesaria para el tipado de microsatélites, se evaluó la aplicabilidad de T<sub>25</sub>-CASP2 para el análisis de MSI sin el correspondiente tejido normal. Con este fin, se requieren marcadores con una distribución alélica monomórfica. Para ensayar si T<sub>25</sub>-CASP2 satisfacía este criterio, se determinó 45 la distribución de longitud alélica en ADN normal (especímenes de tejido no tumoral y sangre periférica) de 200 donantes no relacionados. El producto de PCR más frecuentemente observado (128 individuos, 64,0%) era de 147 pb de longitud (designado como alelo de tipo silvestre), se detectó un producto de 146 pb en 18 casos (9,0%) y un producto de 148 pb en 54 casos (27,0%). No se observaron alelos adicionales más cortos de 146 pb ni más largos de 148 pb de longitud. Por tanto, se encontró que T<sub>25</sub>-CASP2 era casi monomórfica ( $wt \pm 1$  pb, según la definición 50 de Hoang y col. 1997 e Ichikawa y col. 2001) en 200 muestras de ADN normal. Se representa en la Figura 1 una comparación de las longitudes de producto obtenidas a partir de muestras de ADN normal y muestras de CRC con MSI-H.

### 55 *Combinación de T<sub>25</sub>-CASP2, BAT25 y BAT26 en un enfoque de PCR múltiple*

El análisis de MSI sin tejido de control normal requiere un umbral que define la inestabilidad en cierto locus de microsatélite. Para T<sub>25</sub>-CASP2, no se observaron productos más largos de 148 pb ni más cortos de 146 pb en muestras de ADN de especímenes de CRC con MSS no tumorales. Por lo tanto, cualquier longitud de producto <146 pb o >148 60 pb se definió como indicativa de MSI en el locus T<sub>25</sub>-CASP2. En un tumor con MSI-H (HD-35), el producto T<sub>25</sub>-CASP2 amplificado a partir de ADN tumoral era de 146 pb (correspondiente a un desplazamiento de -1 nucleótido en comparación con tejido de control normal del mismo paciente). En este caso, el fenotipo MSI-H se habría omitido con la amplificación de T<sub>25</sub>-CASP2 a partir de tejido tumoral solo.

65 Por lo tanto, se estableció un protocolo múltiple que combina T<sub>25</sub>-CASP2, BAT25 y BAT26 en una PCR. Al usar este enfoque, se clasificaron 117/117 (100%) de muestras de CRC correctamente como MSI-H o no MSI-H. Se presentan en la Figura 2 ejemplos de patrones de fragmentos obtenidos mediante este enfoque múltiple.

## ES 2 337 573 T3

### *Delección media de pares de bases de T<sub>25</sub>-CASP2, BAT25 y BAT26 en CRC con MSI-H*

Se detecta el fenotipo MSI-H más fácilmente si está acompañado por grandes deleciones y/o inserciones en los loci de microsatélites usados para el tipado de MSI. Para BAT26, la delección media de pares de bases era la mayor, con 8,8 pb (DE ± 3,2), seguido de CASP2 (8,1 pb ± 2,9) y BAT25 (6,0 pb ± 2,3). En consecuencia, el marcador T<sub>25</sub>-CASP2 novedoso estaba en el intervalo entre los marcadores mononucleotídicos BAT26 y BAT25 respecto a la delección media de pares de bases.

### 10 Ejemplo 2

#### *Estimación de la inestabilidad en la repetición mononucleotídica de CASP2 en adenomas colorrectales del fenotipo de inestabilidad de microsatélites*

#### 15 *Preparación de muestra y análisis de microsatélites*

La preparación de adenomas colorrectales, extracción de ADN y análisis de microsatélites se efectuaron como se describe en el ejemplo 1.

20 Se analizaron en 14 adenomas colorrectales, que se hablan tipado anteriormente como MSI-H usando el panel marcador ICG-HNPCC estándar (Boland y col. 1998), los desplazamientos en la repetición mononucleotídica T25 localizada en la 3'-UTR del gen CASP2. Se representa en la Tabla 2 la frecuencia de mutación de los loci de microsatélites CASP2, BAT25 y BAT26.

25

TABLA 2

30

Frecuencia de mutación en adenomas colorrectales con MSI-H	
	<b>Frecuencia de mutación (%)</b>
<b>CASP2</b>	13/14 (92,9)
<b>BAT25</b>	11/14 (78,6)
<b>BAT26</b>	11/13 (84,6)

35

40

Las longitudes medias de desplazamiento observadas en adenomas colorrectales fueron de 6,0 para CASP2, 4,6 para BAT25 y 5,0 para BAT26. Por tanto, CASP2 superó a BAT25 y BAT26 en la detección de carcinomas colorrectales de MSI-H respecto a la sensibilidad y la longitud media de desplazamiento.

45

### Ejemplo 3

50 *Estimación de la inestabilidad en la repetición mononucleotídica CASP2 en malignidades extracolónicas del fenotipo de inestabilidad de microsatélites (cáncer endometrial, cáncer de ovario, cáncer urotelial)*

#### *Preparación de muestra y análisis de microsatélites*

55 La preparación de muestras de tejido tumoral, extracción de ADN y análisis de microsatélites se efectuaron como se describe en el ejemplo 1. Para la amplificación de BAT25, se usó un cebador oligonucleotídico no codificante alternativo (5'-TATGGCTCTAAAATGCTCTGTTC-3'), dando como resultado una longitud media de producto principal de 109 nt (Figura 3).

60 Se analizaron en malignidades extracolónicas (n=7), que se hablan tipado anteriormente como MSI-H usando el panel marcador ICG-HNPCC estándar (Boland y col. 1998), los desplazamientos en la repetición mononucleotídica T25 localizada en la 3'-UTR del gen CASP2. Para amplificación, se aplicó un sistema múltiple que combinaba CASP2, BAT25 y BAT26 en una reacción (descripción detallada en el ejemplo 1). Usando este enfoque, se clasificaron 7 (100%) de 7 lesiones tumorales extracolónicas correctamente como MSI-H. Estas lesiones comprendían cáncer endometrial (n=4), cáncer urotelial (n=2) y cáncer de ovario (n=1). Se detectaron desplazamientos en todos los loci mononucleotídicos ensayados en todos los tumores. La amplificación de BAT26 y BAT25 falló

65

en una reacción de un carcinoma endometrial, respectivamente. Se enumeran en la Tabla 2 las longitudes de desplazamiento para CASP2, BAT25 y BAT26. Se presentan en la Figura 3 los patrones de pico de tumores EC3 y OC1.

TABLA 3

	<b>CASP2</b>	<b>BAT25</b>	<b>BAT26</b>	
10	<b>EC1</b>	3	5	na
	<b>EC2</b>	3	4	3
	<b>EC3</b>	8	3	6
15	<b>EC4</b>	3	na	5
	<b>UC1</b>	5	3	3
	<b>UC2</b>	4	2	3
20	<b>OC1</b>	7	2	6

Longitudes de desplazamiento (nucleótidos) observadas en lesiones tumorales extracolónicas MSI-H (EC- cáncer endometrial, UC- cáncer urotelial, OC- cáncer de ovario).

#### Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo por conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido un gran cuidado al recopilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad a este respecto.

#### Bibliografía no de patentes citada en la descripción

- **Lynch;** de la **Chapelle**. “Microsatellite instability”. *N. Engl. J. Med.*, 17 de julio de 2003, vol. 349 (3), 247-57.
- **Smyrk y col.** “Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma”. *Cancer*, 15 de junio de 2001, vol. 91 (12), 2417-22.
- **Dolcetti y col.** “High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability”. *Am J Pathol.*, junio de 1999, vol. 154 (6), 1805-13.
- **Gryfe y col.** “Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer”. *N. Engl. J. Med.*, 13 de enero de 2000, vol. 342 (2), 69-77.
- **Wright y col.** “Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer”. *Br. J. Surg.*, septiembre de 2000, vol. 87 (9), 1197-202.
- **Samowitz y col.** “Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level”. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, septiembre de 2001, vol. 10 (9), 912-23.
- **Claij.** “Microsatellite instability in human cancer: a prognostic marker for chemotherapy?”. *Exp. Cell. Res.*, 10 de enero de 1999, vol. 246 (1), 1-10.
- **Hemminki y col.** “Microsatellite instability is a favourable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy”. *Gastroenterology*, octubre de 2000, vol. 119 (4), 921-8.
- **Watanabe y col.** “A change in microsatellite instability caused by cisplatin-based chemotherapy of ovarian cancer”. *Br. J. Cancer*, 28 de septiembre de 2001, vol. 85 (7), 1064-9.
- **Bawa; Xiao.** “A mutation in the MSH5 gene results in alkylation tolerance”. *Cancer Res.*, 1 de julio de 1997, vol. 57 (13), 2715-20.
- **Carethers y col.** “Mismatch repair proficiency and *in vitro* response to 5-fluorouracil”. *Gastroenterology*, julio de 1999, vol. 117 (1), 123-31.

## ES 2 337 573 T3

- **Ribic y col.** "Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer". *N. Engl. J. Med.*, 17 de julio de 2003, vol. 349 (3), 247-57.
- 5 • **Carethers y col.** "Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer". *Gastroenterology*, febrero de 2004, vol. 126 (2), 688-9.
- 10 • **Boland y col.** "A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer". *Cancer Res.*, 15 de noviembre de 1998, vol. 58 (22), 5248-57.
- 15 • **Marcus y col.** "Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors". *Am. J. Surg. Pathol.*, octubre de 1999, vol. 23 (10), 1248-55.
- **Lindor y col.** "Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors". *J. Clin. Oncol.*, 15 de febrero de 2002, vol. 20 (4), 897-9.
- 20 • **Umar y col.** "Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability". *J. Natl. Cancer Inst.*, 18 de febrero de 2004, vol. 96 (4), 261-8.
- **Debniak y col.** "Value of pedigree/clinical data, immunohistochemistry and microsatellite instability analyses in reducing the cost of determining hMLH1 and hMSH2 gene mutations in patients with colorectal cancer". *Eur. J. Cancer*, enero de 2000, vol. 36 (1), 49-54.
- 25 • **Chapusot y col.** "Microsatellite instability and intratumoural heterogeneity in 100 right-sided sporadic colon carcinomas". *Br. J. Cancer*, 12 de agosto de 2002, vol. 87 (4), 400-4.
- **Zhou y col.** "Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites". *Genes Chromosomes Cancer*, febrero de 1998, vol. 21 (2), 101-7.
- 30 • **Cravo y col.** "BAT-2 6 identifies sporadic colorectal cancers with mutator phenotype: a correlative study with clinico-pathological features and mutations in mismatch repair genes". *J. Pathol.*, julio de 1999, vol. 188 (3), 252-7.
- 35 • **Stone y col.** "Optimising methods for determining RER status in colorectal cancers". *Cancer Lett.*, 28 de febrero de 2000, vol. 149 (1-2), 15-20.
- **Hoang y col.** "BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines". *Cancer Res.*, 15 de enero de 1997, vol. 57 (2), 300-3.
- 40 • **Pyatt y col.** "Polymorphic variation at the BAT-25 and BAT-26 loci in individuals of African origin. Implications for microsatellite instability testing". *Am. J. Pathol.*, agosto de 1999, vol. 155 (2), 349-53.
- 45 • **C. R. Boland y col.** "A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer". *Cancer Res.*, 1998, vol. 58, 5248-5257.
- *Cancer Res.*, 1 de enero de 1999, vol. 59 (1), 249-56.
- 50 • **Ichikawa y col.** "DNA variants of BAT-25 in Japanese, a locus frequently used for analysis of microsatellite instability". *Jpn. J. Clin. Oncol.*, julio de 2001, vol. 31 (7), 346-8.
- **Suraweera y col.** "Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR". *Gastroenterology*, diciembre de 2002, vol. 123 (6), 1804-11.
- 55 • **Sutter y col.** "Molecular screening of potential HNPCC patients using a multiplex microsatellite PCR system". *Mol. Cell. Probes.*, abril de 1999, vol. 13 (2), 157-65.
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento de estimación del estado de MSI de afecciones médicamente relevantes asociadas a MSI que comprende determinar la presencia o ausencia de mutaciones en la repetición T-25 localizada en la 3'-UTR del gen CASP2 y estimar el estado de MSI a partir de dicha presencia o ausencia de mutaciones en la T-25 localizada en la 3'-UTR del gen CASP2, en el que la presencia de mutaciones es indicativa de la presencia de un estado de MSI-H.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la afección médicamente relevante es un tumor.

10 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el tumor se selecciona de un grupo que comprende tumores del tracto anogenital, tumores del tracto colorrectal, carcinoma colorrectal, adenoma colorrectal, pólipos colorrectales, tumores del tracto gastrointestinal, carcinoma del intestino delgado, pólipos del intestino delgado, tumores de los conductos biliares, carcinoma pancreático, tumores del tracto respiratorio, tumores endometriales, carcinoma endometrial, hiperplasia endometrial, tumores del sistema nervioso central, glioblastoma multiforme, meduloblastoma, tumores de próstata, tumores de mama y carcinoma de mama.

20 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la determinación de la presencia o ausencia de mutaciones en la repetición T-25 localizada en la 3'-UTR del gen CASP2 se lleva a cabo usando sondas o cebadores de ácidos nucleicos como agentes de unión para la reacción de detección.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la reacción de detección se lleva a cabo usando una reacción de hibridación de ácido nucleico o una reacción de amplificación de ácido nucleico.

25 6. Un kit para efectuar un procedimiento de estimación del estado de MSI de afecciones médicamente relevantes asociadas a MSI, que comprende al menos un par de cebadores que permiten la amplificación de un ácido nucleico que comprende la repetición T-25 localizada en la 3'-UTR del gen CASP2, seleccionados de un grupo constituido por los pares de cebadores

- 30 a) 2fwd 5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCTT-3'  
2rev 5'-GAGCTTGCAGTGAGCTGAGA-3'
- 35 b) 3fwd 5'- AACCTTTATCCCTGCTTATCTGA-3'  
3rev 5'- AGTTGGAGCTTGCAGTGAGC-3'
- 40 c) 4fwd 5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCTT-3'  
4rev 5'-GAGCTTGCAGTGAGCTGAGA-3'
- d) 5fwd 5'-ACTTCCCAACTTCCCTGTTCTT-3'  
5rev 5'-AGAATGGCGTGAACCCGGGA-3'
- 45 e) 6fwd 5'-GAAACTTCCCAACTTCCCTGT-3'  
6rev 5'-GGCGTGAACCCGGGAGTTGG-3'
- 50 f) 7fwd 5'-AAACTTCCCAACTTCCCTGTTT-3'  
7rev 5' -ATCATGAGGTCAGGAGATCA-3'
- 55 g) 8fwd 5'-AACTTCCCAACTTCCCTGTTT-3'  
8rev 5'-ATCATGAGGTCAGGAGATC-3'
- h) 9fwd 5'-CTTCCCAACTTCCCTGTTCTT-3'  
9rev 5' -GGATCATGAGGTCAGGAGA-3'
- 60 i) 10fwd 5'-ACCTAGAAACCTTTATCCCTGCT T-3'  
10rev 5'-CATGAGGTCAGGAGATCAA-3 '
- 65 j) 11fwd 5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCT-3'  
11 rev 5'-TTTGGGAGGCTGAGGTGGGT-3'

## ES 2 337 573 T3

k) 12fwd 5'-AACCTAGAAACCTTTATCCCTGCT-3'

12rev 5'-ACTTTGGGAGGCTGAGGTGGG-3'.

5 7. Un procedimiento informatizado para crear una estrategia para la terapia de afecciones médicamente relevantes  
asociadas a MSI que comprende i) comparar los datos que representan la presencia o ausencia de mutaciones en la  
repetición T-25 localizada en la 3'-UTR del gen CASP2 con datos clínicos que comprenden información sobre la  
presencia o ausencia de mutaciones en dicha repetición T-25 e información sobre el curso de la enfermedad de los  
pacientes y el resultado mediante un medio de comparación; ii) crear subgrupos de datos que representan individuos  
10 según la presencia o ausencia de mutaciones y suministrar los subgrupos a un medio de valoración; y iii) estimar  
la comparación basada en los subgrupos de datos mediante el medio de valoración y suministrar la valoración del  
medio de valoración a un medio de ajuste de terapia, ajustando el medio de ajuste de terapia la terapia adecuada para  
individuos según la estimación.

15 8. Un par de cebadores de ácido nucleico complementarios y complementarios inversos del gen CASP2 que se  
diseñan para permitir la amplificación de un ácido nucleico de 50 a 500 nt de longitud que comprende la repetición  
T-25 localizada en la 3'-UTR del gen CASP2 para uso en un procedimiento de estimación del estado de MSI de  
afecciones médicamente relevante asociadas a MSI según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

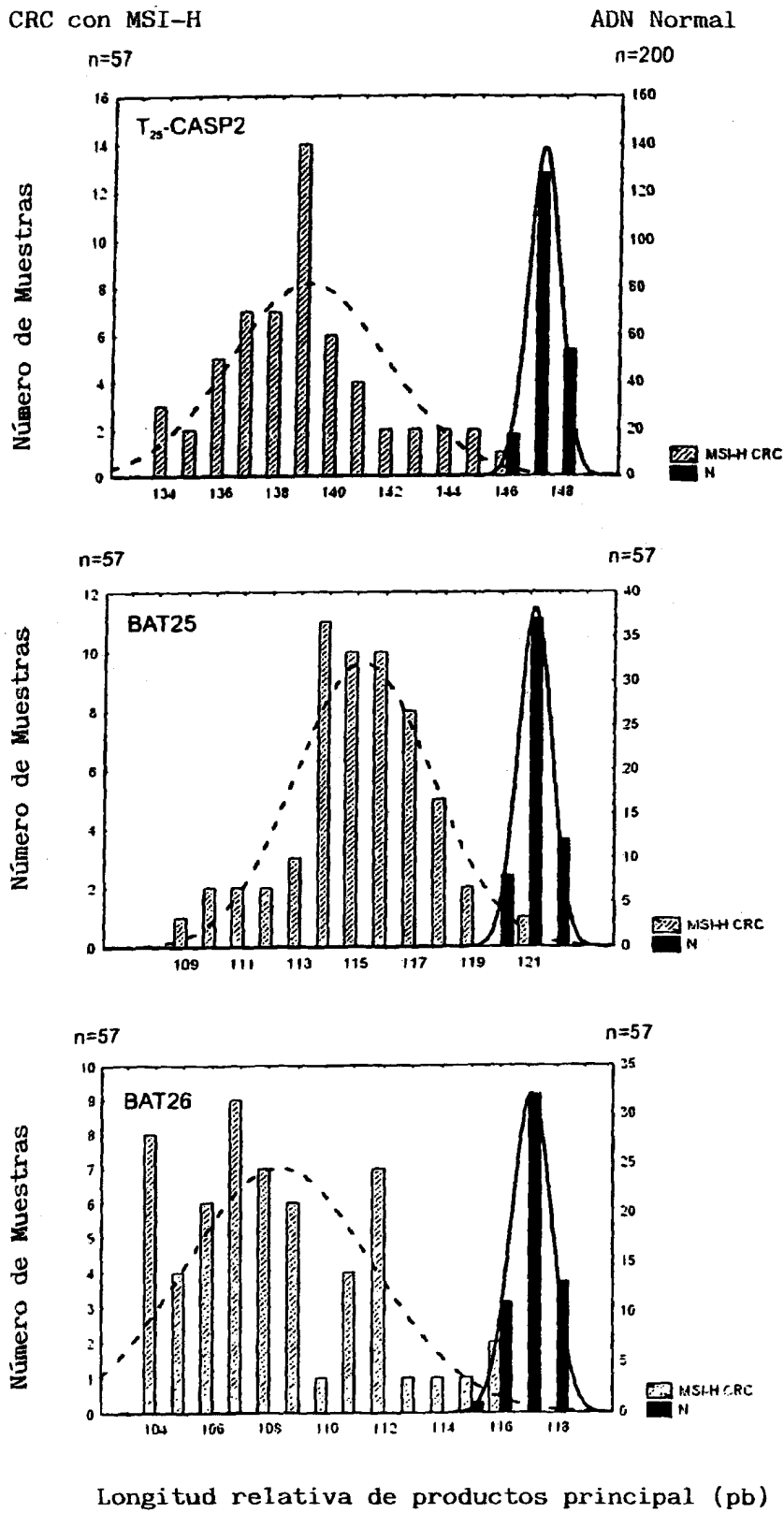


Figura 1

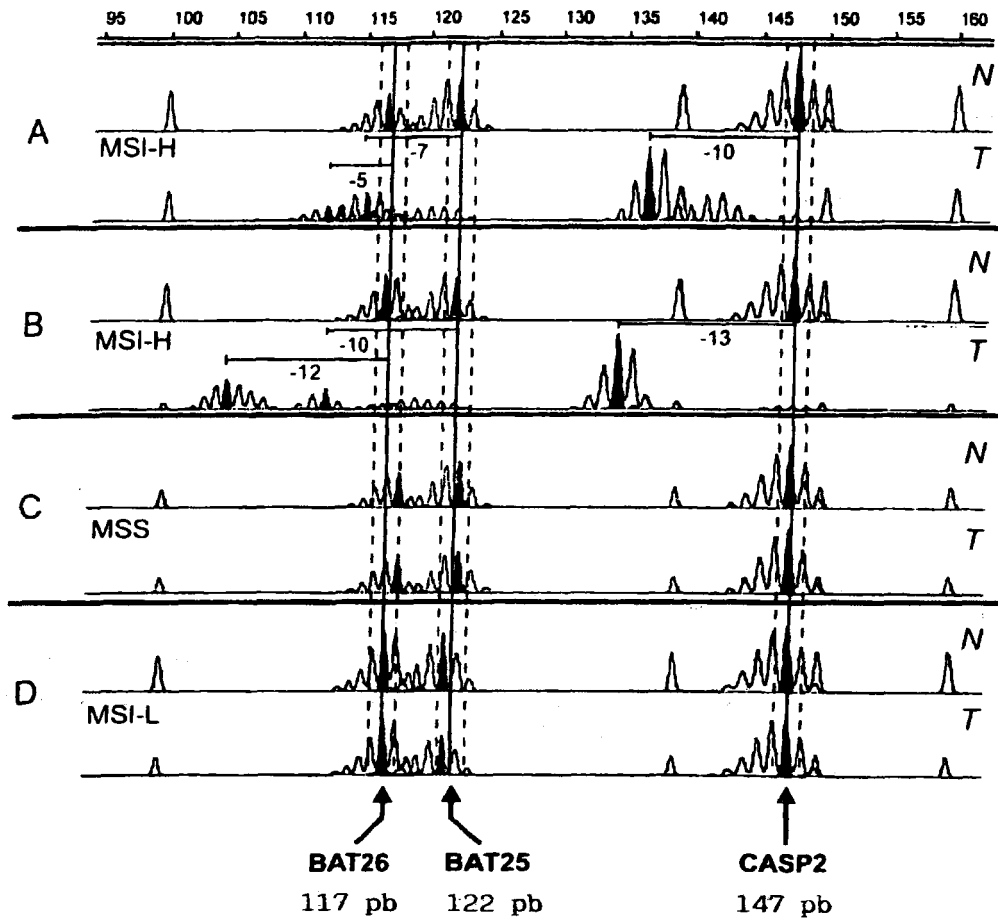


Figura 2

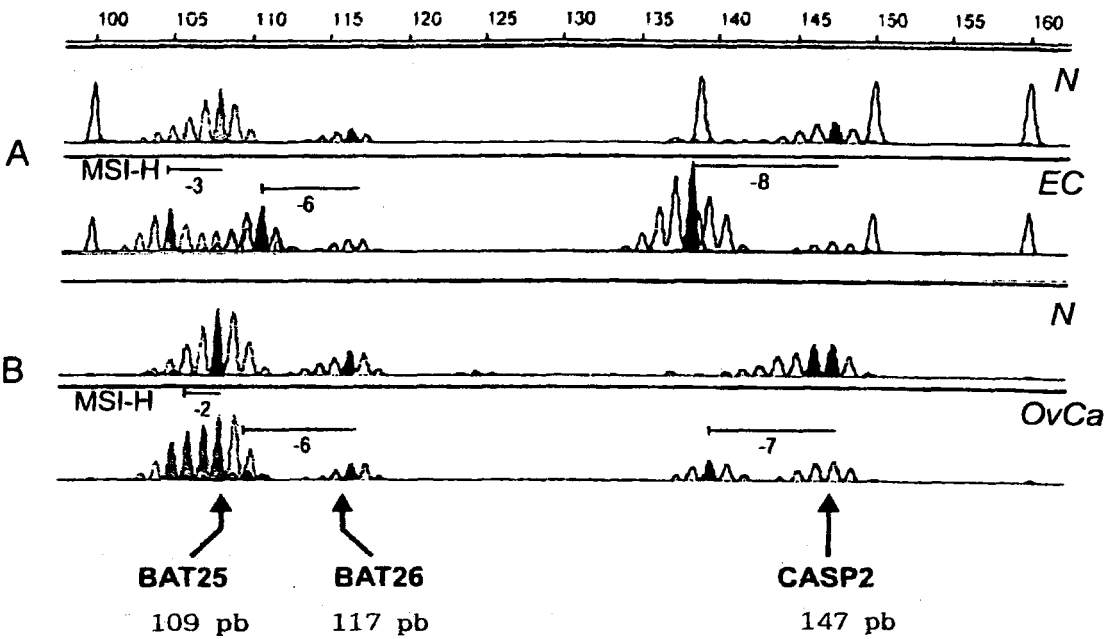


Figura 3

## ES 2 337 573 T3

CRC con MSI-H (4)

ADN normal

Número de muestras (3)

Longitud relativa de producto principal (pb)

**Figura 1**

pb (3)

**Figura 2**

pb (3)

**Figura 3**

**Figura 4:**

1fwd 5'CTGCCTCAAAGGGACTGC-3'

1rev 5'-CCTTCCCGATCCTTGATAAGT-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación de 144 pb

2fwd 5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCTT-3'

2rev 5'-GAGCTTGACAGTGAGCTGAGA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación de 148 pb

3fwd 5'-AACCTTTATCCCTGCTTATCTGA-3'

3rev 5'-AGTTGGAGCTTGACAGTGAGC-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 148 pb

4fwd 5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCTT-3'

4rev 5'-GAGCTTGACAGTGAGCTGAGA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 149 pb

5fwd 5'-ACTTCCCAACTTCCCTGTTCTT-3'

5rev 5'-AGAATGGCGTGAACCCGGGA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 144 pb

## ES 2 337 573 T3

6fwd 5'GAAACTTCCCAACTTCCCTGT-3' 55

6rev 5'-GGCGTGAACCCGGGAGTTGG-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 142 pb

7fwd 5'-AAACTTCCCAACTTCCCTGTTC-3'

7rev 5'-ATCATGAGGTCAGGAGATCA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 278 pb

8fwd 5'-AACTTCCCAACTTCCCTGTTC-3'

8rev 5'-ATCATGAGGTCAGGAGATC-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 277 pb

9fwd 5'-CTTCCCAACTTCCCTGTTCTT-3'

9rev 5'GGATCATGAGGTCAGGAGA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 277 pb

10fwd 5'-ACCTAGAAACCTTTATCCCTGCT T-3'

10rev 5'-CATGAGGTCAGGAGATCAA-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 305 pb

11fwd 5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCT-3'

11rev 5'-TTTGGGAGGCTGAGGTGGGT-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 328 pb

12fwd 5'-AACCTAGAAACCTTTATCCCTGCT-3'

12rev 5'ACTTTGGGAGGCTGAGGTGGG-3' correspondiente a una longitud del producto de amplificación predicho de 332 pb