



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 765**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02731467 .3**

96 Fecha de presentación : **24.04.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1390538**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

54 Título: **Detección de inestabilidad de microsátélites y su utilización en el diagnóstico de tumores.**

30 Prioridad: **24.04.2001 US 841366**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.05.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.05.2010**

73 Titular/es: **PROMEGA CORPORATION**  
**2800 Words Hollow Road**  
**Madison, Wisconsin 53711-5399, US**

72 Inventor/es: **Bacher, Jeffery, W.;**  
**Flanagan, Laura y**  
**Nassif, Nadine**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 338 765 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

Detección de inestabilidad de microsatélites y su utilización en el diagnóstico de tumores.

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente US número 09/841,366, presentada el 24 de abril de 2001, que es una “continuation-in-part” de la solicitud de patente US número 09/663,020, presentada el 15 de septiembre de 2000.

10 **Campo técnico de la invención**

Esta invención se refiere a la detección de inestabilidad en regiones de ADN genómico que contienen repeticiones en tándem simples, tales como loci de microsatélites. La invención se refiere particularmente al análisis múltiple de la presencia o ausencia de inestabilidad en un conjunto de loci de microsatélites en ADN genómico de células, tejidos o fluidos corporales procedentes de un tumor. La invención también se refiere a la utilización de análisis de la inestabilidad de microsatélites en la detección y el diagnóstico de cáncer y la predisposición para el cáncer.

20 **Antecedentes de la invención**

Los loci de microsatélites de ADN genómico se han analizado para una amplia variedad de aplicaciones, incluyendo pero no limitado a, prueba de paternidad, trabajo forense, y en la detección y el diagnóstico del cáncer. El cáncer puede detectarse o diagnosticarse basándose en la presencia de inestabilidad en loci de microsatélites particulares que son inestables en uno o más tipos de células tumorales.

Un locus de microsatélites es una región del ADN genómico con repeticiones en tándem simples que son unidades repetitivas de una y cinco pares de bases de longitud. Cientos de miles de estos loci de microsatélites están dispersos por todo el genoma humano. Los loci de microsatélites se clasifican en función de la longitud de la unidad repetitiva más pequeña. Por ejemplo, los loci con unidades repetitivas de 1 a 5 pares de bases de longitud se denominan loci repetitivos “mononucleótido”, “dinucleótido”, “trinucleótido”, “tetranucleótido”, y “pentanucleótido”, respectivamente.

Cada locus de microsatélites de ADN genómico normal de las especies más diploides, tal como ADN genómico de especies de mamíferos, consiste en dos alelos en cada locus. Los dos alelos pueden ser iguales o diferentes entre sí en longitud y pueden variar de un individuo a otro. Los alelos microsatélites normalmente se mantienen en una longitud constante en un individuo dado y sus descendientes; pero, se ha observado inestabilidad en la longitud de los microsatélites en algunos tipos de tumores (Aaltonen *et al.*, 1993, *Science* 260:812-815; Thibodeau *et al.*, 1993 *Science* 260:816-819; Peltomäki *et al.*, 1993 *Cancer Research* 53:5853-5855; Ionov *et al.*, 1993 *Nature* 363:558-561). Esta forma de inestabilidad genómica en los tumores, denominada inestabilidad de microsatélites (a partir de ahora, “MSI”), es un sello distintivo molecular del síndrome de cáncer hereditario heredado de cáncer colorrectal no poliposo (en lo sucesivo, “HNPCC”). La causa de la MSI en el HNPCC se cree que es un desajuste disfuncional del sistema de reparación del ADN que no logra revertir los errores que se producen durante la replicación del ADN (Fishel *et al.*, 1993 *Cell* 75:1027-38; Leach *et al.*, 1993 *Cell* 75:215-25; Bronner *et al.*, 1994 *Nature* 368:258-61; Nicolaidis *et al.*, 1994 *Nature* 371:75-80; Miyaki *et al.*, 1997 *Nat Genetics* 17:271-2). La inserción o supresión de una o más unidades repetitivas durante la replicación del ADN se mantienen sin los genes de reparación y puede detectarse como polimorfismos de longitud por comparación de los tamaños de los alelos en los loci de microsatélites amplificados a partir de muestras de ADN normal y tumoral (Thibodeau *et al.*, 1993, *supra*).

La MSI se ha encontrado en más del 90% del HNPCC y en el 10-20% de los tumores colorrectales esporádicos (Liu *et al.*, 1996 *Nature Med* 2:169-174; Thibodeau *et al.*, 1993, *supra*; Ionov *et al.*, 1993 *Nature* 363:558-561; Aaltonen *et al.*, 1993 *Science* 260: 812-816; Lothe *et al.*, 1993 *Cancer Res.* 53: 5849-5852). Sin embargo, la MSI no se limita a los tumores colorrectales. La MSI también ha sido detectada en el cáncer de páncreas (Han *et al.*, 1993 *Cancer Res* 53:5087-5089), el cáncer gástrico (*Id.*; Peltomäki *et al.*, 1993 *Cancer Res* 53:5853-5855; Mironov *et al.*, 1994 *Cancer Res.* 54:41-44; Rhyu *et al.*, 1994 *Oncogene* 9:29-32; Chong *et al.*, 1994 *Cancer Res* 54:4595-4597), el cáncer de próstata (Gao *et al.*, 1994 *Oncogene* 9:2999- 3003), el cáncer de endometrio (Risinger *et al.*, 1993 *Cancer Res* 53:5100-5103; Peltomäki *et al.*, 1993 *Cancer Res* 53:5853-5855), y el cáncer de mama (Patel *et al.*, 1994 *Oncogene* 9:3695-3700).

La base genética del HNPCC se cree que es una mutación de línea germinal en uno de varios genes de reparación de errores de emparejamiento de ADN (a partir de ahora “MMR”) (Leach *et al.*, 1993 *Cell* 75:1215-1225; Fishel *et al.*, 1993 *Cell* 75:1027-38; Leach *et al.*, 1993 *Cell* 75:215-25; Bronner *et al.*, 1994 *Nature* 368:258-61; Nicolaidis *et al.*, 1994 *Nature* 371:75-80; Miyaki *et al.*, 1997 *Nat Genetics* 17:271-2; Papadopoulos *et al.*, 1994 *Science* 263:1625-1629). Entre los pacientes del HNPCC, se ha informado que el 50-60% llevan mutaciones heredadas en los genes de reparación de errores de emparejamiento MSH2 y MLH1 (Kolodner *et al.*, 1999 *Cancer Research* 59:5068:5074). Por otra parte, el 70-100% de los casos de HNPCC cuyos tumores manifiestan un fenotipo de alta frecuencia de MSI (a partir de ahora “MSI-H”) presuntamente tienen mutaciones de línea germinal en estos dos genes. Pocas mutaciones de línea germinal en genes MSH6, MSH3, PMS1 y PMS2 han sido detectadas en pacientes de HNPCC, lo que indica que las mutaciones heredadas en estos genes de reparación de errores de emparejamiento juegan un papel menor en el HNPCC (Peltomäki *et al.*, 1997 *Gastroenterology* 113:1146-1158; Liu *et al.*, 1996 *Nat Med* 2:169-174; Kolodner *et*

*al.*, 1999 *Cancer Research* 59:5068-5074). Sin proteínas de reparación funcionales, los errores que producen durante la replicación no se reparan, provocando altos índices de mutación y una probabilidad aumentada de desarrollo del tumor.

5 El ADN repetitivo es particularmente sensible a los errores en la replicación y, por lo tanto, los sistemas de reparación de genes disfuncionales dan lugar a alteraciones generalizadas en las regiones microsatélites. Un estudio de células de levadura sin sistemas de reparación disfuncional mostró un aumento de 2800, 284, 52, y 19 veces en los índices de mutación en repeticiones de mono-, di-, tri-, tetra-, y pentanucleótido, respectivamente (Sia *et al.*, 1997 *Molecular and Cellular Biology* 17:2851-2858). Las mutaciones en los genes de reparación de errores de emparejamiento  
10 no se cree que desempeñan un papel directo en la génesis de los tumores, sino que actúan permitiendo que persista la replicación de errores de ADN. La reparación de los errores de emparejamiento de las células de los genes que tienen altos índices de mutación, y si estas mutaciones se producen en los genes implicados en la tumorigénesis, el resultado puede conducir al desarrollo de cáncer. Los tumores positivos en MSI se han encontrado que llevan mutaciones de cambio de estructura somáticas en las repeticiones de mononucleótido en la región codificante de varios genes implicados en el control del crecimiento, la apoptosis y la reparación del ADN (por ejemplo, TGFBR2, BAX, IGF1R, TCF4, MSH3, MSH6) (Planck, *et al.*, 2000 *Genes, Chromosomes & Cancer* 29:33-39; Yamamoto *et al.*, 1998 *Cancer Research* 58:997-1003; Grady *et al.*, 1999 *Cancer Research* 59:320-324; Markowitz *et al.*, 1995 *Science* 268:1336-1338; Parsons *et al.*, 1995 *Cancer Research* 55:5548-5550). El locus más frecuentemente alterado es TGFBR2, en el que aproximadamente el 90% de los tumores de colon MSI-H se han encontrado que contienen una mutación en la  
20 repetición de poliadenina de base 10 presente en el gen (Markowitz *et al.*, 1995 *Science* 268:1336-1338).

La MSI se produce en casi todos los tumores HNPCC independientemente de qué gen de reparación de errores de emparejamiento está implicado. La MSI también ha sido observada de forma precoz en la formación de tumores. Estos dos factores contribuyen a hacer el análisis de la MSI una prueba de diagnóstico excelente para la detección  
25 de HNPCC. Además, el análisis de la MSI puede servir como una útil prueba previa de detección para identificar los posibles pacientes de HNPCC para pruebas genéticas adicionales. El análisis de la MSI de los carcinomas colorrectales esporádicos también es deseable, ya que la incidencia de la MSI se correlaciona con un mejor pronóstico (Bertario *et al.*, 1999 *International Journal of Cancer* 80:83-7).

30 Un problema de hace mucho tiempo con el diagnóstico de HNPCC es que la biopsia del tumor de colon de una persona con HNPCC tiene el mismo aspecto patológico que un tumor de colon esporádico, haciendo difícil el diagnóstico del síndrome. Dado que el pronóstico, el tratamiento y el seguimiento serán diferentes para los pacientes con HNPCC, es importante encontrar procedimientos de diagnóstico más definitivos. Sin embargo, la detección de mutaciones en los pacientes con HNPCC sigue siendo difícil porque hay al menos 5 genes MMR conocidos que son  
35 genes sin grandes focos conocidos de mutaciones. La secuenciación directa de los genes sigue siendo el procedimiento más preciso de detección de mutaciones, pero es lento y costoso (Terdiman *et al.*, 1999 *The American Journal of Gastroenterology* 94:23544-23560). Además, la alta sensibilidad y especificidad pueden ser difíciles de obtener con la secuencia solamente, porque muchas mutaciones que se detectan pueden ser polimorfismos inocuos que no tienen ningún efecto sobre la función de las proteínas de reparación de errores de emparejamiento.

40 El análisis de ADN de los loci de microsatélites hace teóricamente posible desarrollar una prueba de sangre para su uso en la detección de determinados tipos de cáncer. Los primeros estudios han demostrado que el ADN del tumor se libera a la circulación, y está presente en concentraciones particularmente elevadas en plasma y suero en una serie de diferentes tipos de cáncer (León *et al.*, 1977 *Cancer Res.* 37:646-650; Stroun *et al.*, 1989 *Oncology* 46:318-322). Desde entonces, el ADN liberado en la sangre de varios tipos de tumores ha sido detectado mediante el análisis de ADN de microsatélites utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (a partir de ahora, "PCR") (Hibi  
45 *et al.*, 1998 *Cancer Research* 58:1405-1407; Chen *et al.*, 1999 *Clinical Cancer Research* 5:2297-2303; Kopreski *et al.*, 1999 *Clinical Cancer Research* 5:1961-1965; Fujiwara *et al.*, 1999 *Cancer Research* 59:1567-1571; Chen *et al.*, 1996 *Nature Medicine*, 2:1033-1034; Goessl *et al.*, 1998 *Cancer Research* 58:4728-4732; Miozzo *et al.*, 1996 *Cancer Research* 56:2285-2288).

Las primeras secuencias de genes específicos de tumores detectados en la sangre de pacientes con cáncer se muraron a genes *K-ras* (Vasioukhin *et al.*, 1994 *fr. J Haematol* 86: 774-779; Sorenson *et al.*, 1994 *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 3:67-71; Sorenson *et al.*, 2000 *Clinical Cancer Research* 6:2129-2137; Anker *et al.*, 1997 *Gastroenterology* 112:1114-1120). Más recientemente, se ha mostrado la detección de inestabilidad de microsatélites en el ADN del tumor soluble de plasma y suero procedente células escamosas de la cabeza y el cuello (Nawroz *et al.*, 1996 *Nature Med* 2:1035-1037) y los cánceres de pulmón de células pequeñas (Chen *et al.*, 1996 *Nature Med* 2:1033-1035). Estos éxitos han estimulado la búsqueda de la inestabilidad de microsatélites en ADN tumoral circulante de muchos otros tipos de cáncer. Hibi *et al.* Se utilizaron marcadores de microsatélites para buscar la presencia de alteraciones genéticas  
60 en el ADN de suero de pacientes con cáncer de colon (Hibi, K. *et al.*, 1998 *Cancer Research* 58:1405-1407). Hibi *et al.* también informó de que el ochenta por ciento de los tumores primarios en los pacientes de cáncer de colon mostró MSI y/o pérdida de heterocigosidad (a partir de ahora, "LOH"), otro tipo de mutación descrita a continuación. No se detectaron mutaciones de microsatélites o LOH en el ADN de suero pareado. Sin embargo, se encontraron idénticas mutaciones *K-ras* en correspondientes ADN de tumor y suero, lo que indica que el ADN del tumor estaba presente en la sangre. (*Id.*)  
65

La detección de células tumorales circulantes y micrometástasis también puede tener importantes implicaciones pronósticas y terapéuticas. Como las células tumorales diseminadas están presentes en cantidades muy pequeñas,

no son fácilmente detectables mediante pruebas convencionales inmunocitológicas, que solamente pueden detectar una célula tumoral única entre 10.000 y 100.000 células normales (Ghoussein *et al.*, 1999 *Clinical Cancer Research* 5:1950-1960). Las técnicas moleculares más sensibles basadas en la amplificación por PCR de anomalías tumorales específicas en ADN o ARN han facilitado enormemente la detección de células tumorales ocultas (escondidas).

5 Los ensayos basados en PCR capaces de detectar de manera rutinaria células tumorales en un millón de células normales se han diseñado para la identificación de células tumorales circulantes y micrometástasis en leucemias, linfomas, melanoma, neuroblastoma, y varios tipos de carcinomas. (*Id.*)

10 La mayoría de objetivos para la detección de células tumorales diseminadas han sido ARNm. Sin embargo, algunos objetivos de ADN se han utilizado con éxito, incluyendo mutaciones *K-ras* en cánceres de colon, tal como se señaló anteriormente. La presencia de inestabilidad de microsatélites en algunos tipos de células tumorales plantea la posibilidad de que estas mutaciones tumorales específicas creadas por la inestabilidad podrían servir como objetivo para la detección basada en PCR de células tumorales ocultas.

15 Ha habido una considerable controversia acerca de cómo definir con precisión y medir con precisión MSI (Boland, 1998 *Cancer Research* 58:5248-5257). Informes sobre la frecuencia de MSI en diversos tumores varía considerablemente. Por ejemplo, diversos estudios han reportado rangos del 3% al 95% de MSI para la frecuencia de MSI en el cáncer de vejiga (González-Zulueta *et al.*, 1993 *Cancer Research* 53:28-30; Mao *et al.*, 1996 *PNAS* 91:9871-9875). Un problema con la definición de MSI es que depende tanto del tumor específico como del locus (Boland *et al.* 1998, *supra*). Así, la frecuencia observada de MSI con un tipo de tumor en particular en un solo estudio dependerá del número de tumores analizados, el número de loci investigados, cuántos loci deben estar alterados para la puntuación de un tumor con MSI y qué loci particulares se han incluido en el análisis. Para ayudar a resolver estos problemas, el National Cancer Institute patrocinó un taller sobre MSI para revisar y unificar el campo (*Id.*). Como resultado del taller se recomendó un panel de cinco microsatélites como panel de referencia para futuras investigaciones en el campo. Este panel incluía a dos loci de mononucleótidos BAT-25, BAT-26, y tres loci de dinucleótidos D5S346, D2S123, D17S250.

30 Un problema particular en el análisis de MSI de muestras de tumor se produce cuando uno de los alelos normales para un marcador dado falta debido a LOH, y no hay nuevos fragmentos presentes otros para ese marcador (*Id.*). No se puede discernir fácilmente si esto representa LOH o MSI verdaderos, en los que el alelo cambiado ha co-migrado con el resto de alelos de tipo salvaje. En casos como este, la recomendación del taller del NCI sobre MSI fue no llamarlo MSI. Una forma de minimizar este tipo de problema sería utilizar loci que muestren una baja frecuencia de LOH en tumores de colon.

35 Los ensayos clínicos de diagnóstico utilizados para determinar el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad requieren que las pruebas sean muy precisas (bajo falsos negativos) y específicas (bajo índice de falsos positivos). Muchos loci de microsatélites informativos han sido identificados y recomendados para las pruebas de MSI (Boland *et al.* 1998, *supra*). Sin embargo, incluso los loci de microsatélites más informativos no son 100% sensibles y 100% específicos. Para compensar la falta de sensibilidad usando marcadores individuales, se pueden utilizar marcadores múltiples para aumentar el poder de detección. El mayor esfuerzo requerido para analizar múltiples marcadores puede compensarse mediante multiplexado. El multiplexado permite la amplificación simultánea y el análisis de un conjunto de loci en un solo tubo y con frecuencia puede reducir la cantidad total de ADN necesario para el análisis completo. Para aumentar la especificidad de una prueba de MSI para un determinado tipo de cáncer, se ha recomendado que el panel de cinco loci de microsatélites muy informativos identificados en el taller del National Institute (ver arriba) se modifiquen para sustituir o añadir otros loci de igual utilidad (Boland *et al.* 1998, *supra*, en p. 5250). El aumento de la información por la amplificación y el análisis de un mayor número de resultados de loci se traduce en una mayor confianza y precisión en la interpretación de los resultados de la prueba.

50 El análisis de MSI mediante multiplexado resuelve los problemas de exactitud y de discriminación de los fenotipos de MSI, pero la complejidad adicional puede hacer el análisis más difícil. Por ejemplo, cuando los loci de microsatélites son co-amplificados y analizados en un formato múltiple, los factores que afectan a la facilidad y a la precisión de la interpretación de los datos son mucho más esenciales. Uno de los principales factores que afectan a la interpretación precisa de los datos es la cantidad de tartamudeo que se produce en los loci de microsatélites en la PCR (Bacher y Schumm, 1998 *Profiles in DNA* 2:3-6; Perucho, 1999 *Cancer Research* 59:249-256). Los productos de tartamudeo son fragmentos menores que se producen mediante el proceso de PCR que difieren en el tamaño del alelo principal en múltiplos de la unidad de repetición del núcleo. La cantidad de tartamudeo observada en los loci de microsatélites tiende a ser inversamente proporcional a la longitud de la unidad de repetición del núcleo. Por lo tanto, el tartamudeo se muestra de manera más severa con loci de repetición de mono- y dinucleótido, y en menor grado con repeticiones de tri-, tetra- y pentanucleótidos (Bacher y Schumm, 1998, *supra*). El uso de loci de bajo tartamudeo en el multiplexado reduciría en gran medida este problema. Sin embargo, la selección cuidadosa de los loci sigue siendo necesaria en la elección de los loci de bajo tartamudeo debido a que el porcentaje de tartamudeo puede variar considerablemente, incluso dentro de un tipo de repetición particular (Micka *et al.*, 1999 *Journal of Forensic Sciences* 44:1-15).

65 Los sistemas de multiplexado de microsatélites se han desarrollado principalmente para su uso en la determinación del genotipo, estudios de mapeado y aplicaciones de tipificación del ADN. Estos sistemas de multiplexado están diseñados para permitir la co-amplificación de múltiples loci de microsatélites en una sola reacción, seguido por la detección del tamaño de los alelos amplificados resultantes. Para el análisis de la tipificación de ADN, el uso de múltiples loci de microsatélites aumenta drásticamente la probabilidad de coincidencia en un solo locus. La probabilidad

de coincidencia es una estadística común usada en la tipificación de ADN que define el número de personas que habría que analizar antes de encontrar el mismo patrón de ADN que una persona seleccionada al azar. Por ejemplo, un sistema de multiplexado de cuatro locus (sistema GenePrint™ CTTv Multiplex, Promega) tiene una probabilidad de coincidencia de 1 en 252,4 en poblaciones afroamericanas, en comparación con un sistema de multiplexado de ocho locus (sistema GenePrint™ PowerPlex™ 1.2, Promega), que tiene una probabilidad de coincidencia de 1 en 2,74 x 10<sup>5</sup> (Proceedings: American Academy of Forensic Sciences (febrero 9-14, 1998), Schumm, James W. *et al.*, P. 53, B88; Id. Gibson, Sandra D. *et al.*, P. 53, B89; Id., Lazaruk, Katherine, *et al.*, P. 51, B83; Sparkes, R. *et al.*, 1996 Int J Legal Med 109:186-194). Otros sistemas de multiplexado disponibles comercialmente para la tipificación de ADN incluyen AMPF/STR Profiler™ y AmpFISTR COfiler™ (*AmpFISTR Profiler™ PCR Amplification Equipo User's Manual* (1997), i-viii y 1-1 a 1-10, y *AmpFISTR COfiler™ PCR Amplification Equipo User Bulletin* (1998), i-iii y 1-1 a 1-10, ambos publicados por Perkin-Elmer Corp.). Además del multiplexado para la tipificación de ADN, se han desarrollado algunos sistemas de multiplexado de microsatélites para la detección de enfermedades, tal como el cáncer. Uno de estos sistemas ha sido desarrollado por Roche Diagnostics, el "HNPCC Microsatellite Instability Test", en el que cinco loci MSI (BAT25, BAT26, D5S436, D17S250 y D2S123) son co-amplificados y analizados. Sistemas adicionales son necesarios, en particular sistemas que incluyen loci adicionales; mostrando una alta sensibilidad a MSI y un bajo tartamudeo para facilidad y precisión de análisis.

Los materiales y los procedimientos de la presente invención se han diseñado para su uso en el análisis de multiplexado de loci de microsatélites particulares de ADN genómico humano de diversas fuentes, incluyendo varios tipos de tejidos, células y fluidos corporales. La presente invención representa una mejora significativa sobre la tecnología existente, proporcionando una potencia mayor de discriminación, precisión y rendimiento para el análisis de los loci de MSI y para el diagnóstico de enfermedades, tal como el cáncer, relacionados con mutaciones en estos loci.

## 25 Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona procedimientos y equipos para amplificar y analizar loci de microsatélites o conjuntos de loci de microsatélites. La presente invención también proporciona procedimientos y equipos para detectar cáncer en un individuo mediante la co-amplificación de múltiples loci de microsatélites de ADN genómico humano procedente de tejido tumoral o células cancerosas.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un procedimiento de análisis de loci de microsatélites, que comprende: (a) proporcionar cebadores para la co-amplificación en un solo tubo de un conjunto de al menos tres loci de microsatélites de ADN genómico, comprendiendo por lo menos un locus de repetición de mononucleótido y por lo menos dos loci de repetición de tetranucleótido, (b) co-amplificar el conjunto de por lo menos tres loci de microsatélites en una muestra de ADN genómico en una reacción de amplificación de multiplexado, usando los cebadores, produciendo así fragmentos de ADN amplificado, y (c) determinar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un procedimiento de co-amplificación de un conjunto de por lo menos tres loci de microsatélites de por lo menos dos muestras diferentes de ADN genómico, una primera muestra procedente de material biológico normal no canceroso de una persona y una segunda muestra procedente de un segundo material biológico de la persona. Las por lo menos dos muestras de ADN genómico humano son co-amplificadas en reacciones de amplificación de multiplexado separadas, utilizando cebadores para cada uno de los loci en el conjunto de por lo menos tres loci de microsatélites. El tamaño de los fragmentos de ADN amplificados resultantes de las dos reacciones de multiplexado se comparan entre sí para detectar inestabilidad en cualquiera de los por lo menos tres loci de microsatélites de la segunda muestra de ADN genómico humano.

Otra realización de la presente descripción es un procedimiento de análisis de al menos un locus de repetición de mononucleótido de ADN genómico humano seleccionado entre el grupo consistente en MONO-11 y MONO-15. El procedimiento de análisis del por lo menos un locus de repetición de mononucleótido seleccionado entre el grupo consistente en MONO-11 y MONO-15 comprende las etapas de: (a) proporcionar al menos un cebador de por lo menos un locus de repetición de mononucleótido; (b) ampliar el al menos un locus de repetición de mononucleótido de una muestra de ADN genómico procedente de material biológico de un sujeto humano individual, usando al menos un cebador, produciendo así un fragmento de ADN amplificado, y (c) determinar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados. Los fragmentos de ADN amplificados se analizan preferentemente para detectar la inestabilidad de microsatélites en el por lo menos un locus de repetición de mononucleótido comparando el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados con el tamaño de los alelos más comúnmente observados en ese locus en una población humana. Alternativamente, el procedimiento se utiliza para ampliar el al menos un locus de repetición de mononucleótido de una muestra de ADN genómico de material biológico normal no canceroso de un individuo, y la inestabilidad de microsatélites se detecta mediante la comparación de los fragmentos de ADN amplificados con los obtenidos en la etapa (b).

Otra realización de la presente descripción es un equipo para la detección de inestabilidad de microsatélites en ADN aislado de un sujeto individual, que comprende un único contenedor con cebadores de oligonucleótidos para la co-amplificación de un conjunto de al menos tres loci de microsatélites que comprenden un locus de mononucleótido y dos loci de tetranucleótido.

Las varias realizaciones del procedimiento y el equipo de la presente invención, descritas brevemente más arriba, son particularmente adecuadas para su uso en la detección de MSI en células tumorales y células cancerosas. Específicamente, el procedimiento o el equipo de la presente invención pueden utilizarse para ampliar, al menos, un locus de repetición de mononucleótido seleccionado entre el grupo consistente en MONO-11 y MONO-15 o el conjunto de al menos tres loci de microsatélites, que comprenden al menos un locus de repetición de mononucleótido y al menos dos loci de repetición de tetranucleótido de al menos una muestra de ADN genómico de material biológico, tal como tejidos o fluidos corporales, preferiblemente material biológico que contenga de preferencia o sea sospechoso de contener ADN de tumores o células cancerosas. Para loci monomórficos o casi monomórficos, tal como MONO-11 y MONO-15, uno puede comparar el modelo resultante producido por el patrón de amplificación de ADN normal de cualquier persona en una población con un patrón estándar en ese locus. Sin embargo, es preferible utilizar ADN de tejido normal de la misma persona de la que se ha obtenido el ADN del tumor, para garantizar que un resultado positivo no refleje una mutación germinal, en lugar de MSI.

El procedimiento y el equipo también pueden utilizarse para comparar los resultados de amplificación de multiplexado de ADN de tejido normal de un individuo con los resultados de la amplificación de multiplexado de ADN de otro material biológico de la misma persona. El uso de esta realización particular del procedimiento de la presente invención para detectar MSI en las células tumorales en comparación con las células normales se muestra en la Figura 1. En concreto, la Figura 1 muestra una repetición de tetranucleótido (GATA), amplificada por un par de cebadores ("cebador A" y "cebador B") en una reacción en cadena de polimerasa ("PCR"), seguida de la separación de alelos amplificados por tamaño mediante electroforesis capilar, y un trazado de alelos fraccionados amplificados utilizando el software GeneScan™. Nótese que sólo los dos alelos y pequeños picos tartamudeo aparecen en el trazado de ADN amplificado de ADN normal, mientras que tres picos MSI aparecen además de los dos picos de alelos en el trazado de ADN tumoral amplificado.

Las ventajas y una apreciación más completa de los atributos específicos de la presente invención se obtendrán en un examen de las siguientes figuras, la descripción detallada de realizaciones preferidas, y las reivindicaciones adjuntas. Se entiende expresamente que los dibujos son para propósitos de ilustración y descripción solamente, y no pretenden ser una definición de los límites de la invención.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Ilustración del análisis de la inestabilidad de microsatélites. La figura es un diagrama de un par de cebadores recocidos en un locus de tetranucleótido en dos alelos del mismo ADN genómico, y los trazados de los resultados de electroforesis capilar de los productos de amplificación de un locus de tetranucleótido de ADN procedente de tejido normal frente a tejido tumoral. Los picos de MSI se indican en el trazado de ADN amplificado de tejido tumoral.

Figura 2. Ilustración del efecto de la longitud de la unidad de repetición de microsatélites de la cantidad de tartamudeo observada. La figura incluye un diagrama de un par de cebadores recocidos en un locus de repetición de tetranucleótido en dos alelos diferentes de ADN genómico, y una serie de exploraciones fluorescentes y trazados de loci de repetición de mono-, di-, tri-, tetra- y pentanucleótidos de ADN genómico de varias personas, amplificado y fraccionado mediante gel o mediante electroforesis capilar.

Figura 3. Demostración de que los loci de repetición de tetranucleótidos de baja tartamudeo son más fáciles de interpretar que los loci de repetición de dinucleótidos de alta tartamudeo. La figura es un trazado de los resultados de la electroforesis capilar de productos de la amplificación de dos tetranucleótidos y dos loci de repetición de dinucleótidos de dos conjuntos diferentes de muestras de ADN procedentes de tejido normal frente a tejido tumoral.

Figura 4. Ilustración de la variación en la cantidad de tartamudeo en loci de repetición de tetranucleótidos y pentanucleótidos seleccionados. La figura es un trazado de la variabilidad en el porcentaje de tartamudeo observado en 13 loci de repetición diferentes tetranucleótidos y 5 pentanucleótido diferentes. Las cajas representan el porcentaje promedio de tartamudeo y las barras sólidas el intervalo de tartamudeo observado para cada locus.

Figura 5. Resultados del cribado de marcadores de repetición de tetranucleótidos para la frecuencia de inestabilidad de microsatélites. La figura es un trazado del número de loci de microsatélites, de un total de 273 marcadores, que muestra un porcentaje de MSI dado. Por ejemplo, aproximadamente 15 loci fueron alterados en 100% de muestras de tumores de MSI-H evaluados.

Figura 6. Resultados del cribado de marcadores de repetición de pentanucleótido para la frecuencia de inestabilidad de microsatélites. La figura es un trazado del porcentaje de MSI observado en cada uno de los ocho diferentes loci de repetición de tetranucleótido en un conjunto de nueve MSI-H y un conjunto de 30 tumores MSS.

Figura 7. Análisis de inestabilidad de microsatélites mediante marcador MONO-15. La figura es un trazado de los productos generados por electroforesis capilar de amplificación de locus MONO-15 de ADN de cuatro diferentes conjuntos de pares normales y muestras de tumores procedentes de cuatro personas diferentes.

Figura 8. Porcentaje de MSI en 59 muestras de cáncer de colon usando un multiplexado de MSI de nueve locus. La figura es un trazado del porcentaje de MSI observado en 59 muestras de cáncer de colon (29 MSH y 30 MSI-L).

## ES 2 338 765 T3

o muestras MSS) usando el multiplexado de MSI de nueve locus descrito en el Ejemplo 6, a continuación (es decir, D1S518, D3S2432, D7S1808, D7S3046, D7S9070, D10S1426, BAT-25, BAT-26, y MONO-15).

5 Figura 9. Análisis fluorescente de microsatélites mediante un multiplexado de MSI de nueve locus. La figura es un trazado generado a partir de electroforesis capilar de productos de amplificación multiplexado de genómico humano normal no canceroso, utilizando el multiplexado de MSI de nueve locus utilizado en la Figura 8.

10 Figura 10. Detección de inestabilidad de microsatélites en muestras de cáncer de colon usando un multiplexado de MSI de nueve locus. La figura es un trazado generado a partir de electroforesis capilar de productos de amplificación multiplexado de ADN de muestras de tumor de colon y parejas normales, usando el multiplexado de MSI de nueve locus utilizados en la Figura 8.

15 Figura 11. La detección de inestabilidad de microsatélites en muestras de cáncer de colon mediante multiplexado de MSI de nueve locus es del mismo tipo de trazado que se muestra en la Figura 10, generado con una muestra diferente de pares de ADN normal y cáncer de colon de una persona diferente.

20 Figura 12. Detección de inestabilidad de microsatélites en muestras de cáncer de estómago utilizando un multiplexado de MSI de nueve locus. La figura es un trazado generado a partir de electroforesis capilar de los productos de amplificación multiplexado de ADN de pareja normal y muestras de tumor de cáncer de estómago, con el multiplexado de MSI de nueve locus descritos en la figura 8.

25 Figura 13. Análisis de microsatélites de tejido incrustados en parafina, con un multiplexado de MSI de nueve locus. La figura es un trazado generado a partir de electroforesis capilar de los productos de amplificación de multiplexado de ADN de tejido incrustado en parafina, utilizando el multiplexado de MSI de nueve locus descrito en la figura 8.

30 Figura 14. Porcentaje de MSI en muestras de cáncer de colon en 10 diferentes loci de microsatélites. La figura es un gráfico de barras del porcentaje de MSI observado en 66 muestras de cáncer de colon (36 MSI-H y 30 MSI estable o muestras MSI-L) usando nueve loci contenidos en el multiplexado MSI descrito en el Ejemplo 8 (es decir, BAT-26, D7S3070, D7S3046, BAT-40, MONO-15, D7S1808, BAT-25, D10S1426 y D3S2432) y D1S518.

35 Figura 15. Análisis fluorescente multiplexado de microsatélites mediante un multiplexado de MSI de nueve locus. La figura es un trazado generado a partir de electroforesis capilar de los productos de amplificación multiplexado de ADN genómico humano normal no canceroso, utilizando el multiplexado de MSI de nueve locus descrito en el Ejemplo 8 etiquetados con cebadores marcados con tintes fluorescentes, como sigue. Los cebadores para BAT-26, D7S3070, y D7S3046 fueron marcados con fluoresceína; los cebadores para BAT-40, MONO-15 y D7S1808 fueron etiquetados con JOE; y los cebadores para BAT-25, D10S1426 y D3S2432 fueron etiquetados con TMR.

40 Figura 16. Detección de inestabilidad de microsatélites en muestras de cáncer de colon usando un multiplexado MSI de nueve locus. La figura es un trazado generado a partir de electroforesis capilar de los productos de amplificación multiplexado de ADN de parejas normales y muestras de tumores de colon, utilizando el mismo multiplexado de MSI de nueve locus y los cebadores etiquetados utilizados en la Figura 15.

### 45 Descripción detallada de la invención

#### A. Definiciones

50 Las siguientes definiciones están pensadas para ayudar a proporcionar una comprensión clara y consistente sobre el alcance y el detalle de los siguientes términos, tal como se utilizan para describir y definir la presente invención:

“Alelo”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una de varias formas alternativas de un gen o secuencia de ADN en una localización cromosómica específica (locus). En cada locus autosómico un individuo posee dos alelos, uno heredado del padre y uno de la madre.

55 “Amplificar”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un proceso por el cual se hacen varias copias de un locus particular de un ácido nucleico, tal como ADN genómico. La amplificación se puede realizar utilizando cualquiera de una serie de medios conocidos, incluyendo pero no limitado a reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki, R. K., *et al.*, 1985 Science 230: 1350-1354), amplificación basada en la transcripción (Kwoh, D.Y., y Kwoh, T.J., *American Biotechnology Laboratory*, Octubre, 1990) y amplificación de desplazamiento de cadena (SDA) (Walker, G. T., *et al.*, 60 1992 Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 89: 392-396).

“Co-amplificar”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un proceso por el cual se hacen varias copias de dos o más loci en el mismo contenedor, en una única reacción de amplificación.

65 “Polimorfismo de ADN”, tal como se utiliza aquí, se refiere a la existencia de dos o más alelos de un locus dado en la población. “Locus” o “locus genético”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una localización cromosómica única que define la posición de un gen individual o secuencia de ADN. “Cebadores de locus específico”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un cebador que específicamente se hibrida con una porción de el locus indicado o su cadena

## ES 2 338 765 T3

complementaria, al menos para un alelo del locus, y no se hibrida eficientemente con otras secuencias de ADN bajo las condiciones utilizadas en el procedimiento de amplificación.

5 “Pérdida de heterocigosidad” (en lo sucesivo, “LOH”), tal como se utiliza aquí, se refiere a la pérdida de alelos en un cromosoma detectado analizando los marcadores para los que un individuo es constitucionalmente heterocigoto. En concreto, LOH se puede observar en la amplificación de dos muestras diferentes de ADN de un sujeto particular, una muestra procedente de material biológico normal y otra procedente de un tumor o tejidos precancerosos. El tumor presenta LOH si el ADN del material biológico normal produce alelos amplificados de dos longitudes diferentes y las muestras de tumor producen solamente una de las dos longitudes de alelos amplificados en el mismo locus.

10 “Locus de microsatélites”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una región del ADN genómico que contiene cortos elementos de secuencia repetitiva de uno (1) a siete (7), más preferiblemente de uno (1) a cinco (5), más preferiblemente de uno (1) a cuatro (4) pares de bases en longitud. Cada secuencia que se repite al menos una vez en un locus de microsatélites se refiere aquí como una “unidad de repetición”. Cada locus de microsatélites preferentemente incluye al menos siete unidades de repetición, más preferiblemente al menos diez unidades de repetición, y más preferiblemente al menos veinte unidades de repetición.

15 “Inestabilidad de microsatélites” (en adelante, “MSI”), tal como se utiliza aquí, se refiere a una forma de inestabilidad genética en la que los alelos de ADN genómico obtenidos de algunos tejidos, células o fluidos corporales de un sujeto dado cambian de longitud en un locus de microsatélites. En concreto, MSI se puede observar en la amplificación de dos muestras diferentes de ADN de un sujeto particular, tal como ADN de tejidos sanos y cancerosos, en el que la muestra normal produce alelos amplificados de una o dos longitudes diferentes, y la muestra del tumor produce alelos amplificados, en el que al menos uno de los alelos es de una longitud diferente de los alelos amplificados de la muestra normal de ADN en ese locus. MSI aparece generalmente como consecuencia de la inserción o supresión de al menos una unidad de repetición en un locus de microsatélites.

20 “MSI-H”, tal como se utiliza aquí, es un término que se utiliza para clasificar los tumores que tienen una alta frecuencia de MSI. Cuando cinco loci de microsatélites son analizados, tales como los cinco loci de microsatélites seleccionados por un taller sobre HNPCC en el National Cancer Institute en 1998 para su uso en la detección de HNPCC, un tumor se clasifica como MSI-H cuando al menos dos de los loci muestran inestabilidad (Boland, 1998 Cancer Research 58: 5248-5257). Cuando se analizan más de cinco loci de microsatélites, el tumor se clasifica como MSI-H cuando al menos el 30% de los loci de microsatélites de ADN genómico procedentes del tumor se encuentran que son inestables.

25 “MSI-L”, tal como se utiliza aquí, es un término que se utiliza para clasificar los tumores que tienen una baja frecuencia de MSI. Cuando cinco loci de microsatélites son analizados, tales como los cinco loci de microsatélites seleccionados por un taller sobre HNPCC en el National Cancer Institute en 1998 para su uso en la detección de HNPCC, un tumor se clasifica como MSI-L cuando sólo uno de los loci muestra inestabilidad. Cuando se analizan más de cinco loci de microsatélites, el tumor se clasifica como MSI-L cuando menos el 30% de los loci de microsatélites de ADN genómico procedente del tumor se encuentran que son inestables. Los tumores MSI-L se cree que representan un fenotipo mutador distinto con etiología molecular potencialmente diferente de los tumores MSI-H (Thibodeau, 1998; Wu *et al.*, 1999, American Journal of Human Genetics 65:1291-1298). Para distinguir con precisión los fenotipos de MSI-H y MSI-L se ha recomendado analizar más de cinco marcadores de microsatélites (Boland, 1998, *supra*; Frazer, *et al.*, 1999 Oncology Research 6:497-505).

30 “MSS”, tal como se utiliza aquí, se refiere a tumores que son estables a los microsatélites, cuando ningún loci de microsatélites presenta inestabilidad. La distinción entre MSI-L y MSS sólo pueden lograrse cuando se utiliza un número de marcadores significativamente mayor de cinco. El National Cancer Institute recomienda el uso de un 19 loci de repetición de mono- y dinucleótidos para este propósito, y para el propósito de hacer distinciones más claras entre tumores MSI-H y MSI-L, tal como se describió anteriormente (Boland, 1998, *supra*).

35 “MSI-L/S”, tal como se utiliza aquí, se refiere a todos los clasificados como MSI-L o MSS.

40 “Marcador de microsatélites”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un fragmento de ADN genómico que incluye una repetición de microsatélites y secuencias de ácido nucleico que flanquean la región de repetición.

45 “Monomorfo”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un locus de ADN genómico donde se ha encontrado solamente un patrón de alelo que está presente en el ADN genómico normal de todos los miembros de una población.

50 “Nucleótido”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una unidad básica de una molécula de ADN, que incluye una unidad de un fosfatidil de médula ósea y una de cuatro bases, adenina (“A”), timina (“T”), guanina (“G”) y citosina (“C”).

55 “Reacción en cadena de la polimerasa” o “PCR”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una técnica en la que los ciclos de desnaturalización, recocido con cebador y extensión con polimerasa de ADN se utilizan para amplificar el número de copias de una secuencia de ADN de objetivo en aproximadamente unas 10<sup>6</sup> veces o más. El proceso de reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de ácido nucleico está cubierto por las patentes US 4.683.195 y 4.683.202.

“Cebador”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido de cadena sencilla o fragmento de ADN que se hibrida con una cadena de un locus de ADN de objetivo de tal manera que el terminal 3' del cebador puede actuar como sitio de polimerización usando una enzima de ADN de polimerasa.

5 “Par de cebadores”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un par de cebadores que se hibridan con cadenas opuestas una molécula de ADN de objetivo, en regiones del ADN objetivo que flanquean una secuencia de nucleótidos que se amplifica.

10 “Sitio cebador”, tal como se utiliza aquí, se refiere a la zona del ADN objetivo en la que se hibrida un cebador.

“Cuasi-monomórfica”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un locus de ADN genómico donde solamente un patrón de alelo se ha encontrado que está presentes en el ADN genómico normal de casi todos los miembros de una población.

15 “Tartamudeo”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un fragmento menor observado después de la amplificación de un locus de microsatélites, una o más longitudes de unidad de repetición más pequeñas que el fragmento predominante o alelo. Se cree que es el resultado de un evento de deslizamiento de la polimerasa de ADN durante el proceso de amplificación (Levinson y Gutman, 1987 *Molecular Biology Evolution* 4:203; Schlotterer y Tautz, 1992 *Nucleic Acids Research* 20:211).

## 20 B. Selección de los loci a amplificarse o co-amplificarse

Por lo menos un locus MSI amplificados o co-amplificado en cada una de las realizaciones de la presente invención aquí ilustradas y descritas es un locus de repetición de mononucleótido. Estos loci han demostrado ser muy sensibles a alteraciones en tumores con sistemas de reparación de errores de emparejamiento de ADN disfuncionales (Parsons, 1995 *supra*), haciendo estos loci particularmente útiles para la detección de cáncer y otras enfermedades asociadas a disfunciones del sistema de reparación de errores de emparejamiento de ADN disfuncional. Un grupo de investigadores informó que mediante la amplificación y el análisis de un solo locus de repetición de mononucleótido, BAT-26, eran capaces de confirmar correctamente el estado de MSI-H de 159 de 160 (99,4% de exactitud) de las muestras de tumores (Hoang *et al.*, 1997 *Cancer Research* 57:300-303).

Algunos loci de repetición de mononucleótidos, incluyendo BAT-26, también han sido identificados como que tienen propiedades cuasi-monomórfico. Las propiedades monomórficas o cuasi-monomórficas hacen la comparación de pares normales/tumorales más sencilla, ya que los productos PCR de muestras normales son generalmente todos del mismo tamaño y cualquier alteración en muestras de tumores son fácilmente identificables.

El principal inconveniente de utilizar un locus de repetición de mononucleótidos en el análisis de ADN genómico es que la amplificación de cualquier locus resulta en un gran número de extraños fragmentos amplificados de ADN de diferentes longitudes, el producto de “tartamudeo” durante la reacción de amplificación. Estos artefactos están presentes en menor grado en los productos de amplificación de loci con unidades de repetición cada vez más largas. Para una ilustración de la relación entre la longitud de la unidad de repetición y la presencia de extraños fragmentos amplificados, véase la figura 2. La figura 2 muestra artefactos de tartamudeo amplificados con una disminución de la longitud de la unidad de repetición de loci de repetición de pentanucleótidos a mononucleótidos.

45 Cuando un locus de mononucleótidos es monomórfico o cuasi- monomórfico, sin embargo, uno puede detectar cambios fácilmente en el tamaño de un alelo, indicando MSI, incluso en presencia de un alto grado de tartamudeo. Cuando un locus es cuasi-monomórfico, la detección de cambios en el tamaño se puede hacer mediante la comparación de los alelos amplificados a partir de ADN genómico de material biológico de un individuo, tales como el tejido tumoral o fluidos corporales, sospechoso de exhibir inestabilidad de microsatélites en el tamaño de alelo más comúnmente observado en ese locus en una población. Esta característica permite utilizar un único estándar o panel de patrones de alelo estándar para analizar los resultados individuales, minimizando la cantidad de muestras que deben tomarse de un individuo para detectar la inestabilidad de microsatélites en cierto ADN genómico de los individuos.

Al menos uno de los loci de microsatélites amplificados en el procedimiento o con el equipo de la presente invención es preferiblemente un locus de repetición de mononucleótidos, más preferiblemente un locus de repetición de mononucleótidos cuasi-monomórfico. El locus de repetición de mononucleótidos seleccionado para su uso en los procedimientos y los equipos de la presente invención es preferentemente inestable en material biológico canceroso, pero no en material biológico normal. BAT-25, BAT-26 y BAT-40 han sido identificados como loci de repetición de mononucleótidos útiles en la identificación de MSI en tumores colorrectales característicos de cáncer de colon sin poliposis hereditario (Zhou *et al.*, 1998 *Genes, Chromosomes & Cancer* 21:101-107; Boland *et al.*, 1998 *Cancer Research* 58:5248-5257, Dietmaier *et al.*, 1997 *Cancer Research* 57:4749-4756; Hoang *et al.*, 1997 *Cancer Research* 57:300-303). Dos loci adicionales, identificados aquí como MONO-11 y MONO-15 se identificaron mediante una búsqueda en una base de datos informatizada pública de información de secuencias (GenBank), y se constató que tenían las características preferidas para estos loci, identificados anteriormente. La búsqueda y la identificación de los loci de repetición de mononucleótidos adecuados para su uso en la presente invención se muestran en el Ejemplo 2. Técnicas similares podrían utilizarse para identificar otros locis de repetición de mononucleótidos adecuados para su uso en los procedimientos y los equipos de la presente invención.

Los loci de repetición de mononucleótidos amplificados o co-amplificados de acuerdo con los procedimientos actuales o utilizando los equipos actuales son preferiblemente cuasi-monomórficos y exhiben una inestabilidad en el tipo de tejido de interés para una aplicación dada. MONO-11 y MONO-15, BAT-25, y en particular BAT-26 son cuasi-monomórficos monomórficos y exhiben inestabilidad en varios tejidos tumorales canceroso. Los cuatro loci cuasi-monomórficos de repetición de mononucleótidos se han encontrado que son particularmente útiles en los procedimientos y los equipos de la presente invención. BAT-40 también se ha encontrado que es útil en los procedimientos y los equipos de la presente invención, debido a su inestabilidad en varios tejidos tumorales cancerosos. Sin embargo, BAT-40 no es un locus cuasi-monomórfico. Al menos uno, más preferiblemente al menos dos loci de microsatélites de repetición de mononucleótidos se amplifican o co- amplifican en el procedimiento de la presente invención.

Al menos un locus de repetición de mononucleótidos y al menos dos loci de repetición de tetranucleótidos son co-amplificados y analizados de acuerdo con al menos algunas formas de realización del procedimiento y los equipos de la presente invención. Los loci de repetición de tetranucleótidos inherentemente generan muy pocos artefactos tartamudeo cuando se amplifican, en comparación con los loci de microsatélites con unidades de repetición más cortas, especialmente en comparación con los loci de repetición mono- y dinucleótido. (*ver*, por ejemplo, la Figura 2). Artefactos de ese tipo puede ser difíciles de distinguir de MSI si se produce un alelo cambiado en la posición de tartamudeo del segundo alelo. Por lo tanto, no están presentes aspectos sobre la interpretación, y sobre la necesidad de cuasi-monomorfismo con el fin de hacer posible la interpretación de datos, como lo es para los loci de repetición de mononucleótidos. De hecho, uno puede incluso utilizar loci de repetición de tetranucleótidos que son muy polimórficos en una población, siempre que sea estable, en un sujeto individual. Estos loci se utilizan comúnmente la tipificación de ADN.

Como con cualquier loci a amplificar en cualquier procedimiento o utilizando cualquier equipo de la presente invención, los loci de repetición de tetranucleótidos son preferiblemente seleccionados sobre la base de ser estables en el ADN de un individuo, excepto en el tipo de material biológico de interés. Loci de repetición de tetranucleótidos preferidos utilizados en los procedimientos y equipos de la presente invención son: FGA, DIS518, DIS547, DIS1677, D2S1790, D3S2432, D5S818, D5S2849, D6S1053, D7S3046, D7S1808, D7S3070, D8S1179, D9S2169, D10S1426, D10S2470, D12S391, D17S1294, D17S1299, y D18S51.

Loci de mononucleótidos o tetranucleótidos adicionales con los mismos criterios preferidos descritos anteriormente son preferentemente co-amplificados con un conjunto de al menos tres loci de microsatélites descritos anteriormente. Sin embargo, se contempla que los loci de microsatélites diferentes de los loci de repetición de mononucleótidos o tetranucleótidos podrían incluirse en el conjunto de al menos tres loci de microsatélites co-amplificados y analizados según el procedimiento o usando el equipo de la presente invención.

Procedimientos preferidos para la selección de locis y conjuntos de loci amplificados y analizados según los procedimientos o usando los equipos de la presente invención se describen mayor detalle a continuación. Sin embargo, una vez que el procedimiento y los materiales de esta invención se describen, procedimientos de selección de loci adicionales, pares de cebadores, y técnicas de amplificación para su uso en el procedimiento y el equipo de esta invención es probable que se puedan proponer a un experto en la materia. Todos estos procedimientos están pensados para estar en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

### C. Cribado adicional de loci

Cuando el procedimiento o el equipo de la presente invención se utilizan en ensayos clínicos de diagnóstico que se utilizarán para determinar el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad, deben diseñarse para producir resultados que sean de gran precisión (bajo índice de falsos negativos) y específicos (bajo índice de falsos positivos). Loci de microsatélites informativos se identifican preferiblemente mediante cribado, más preferiblemente mediante un cribado muy extensivo (véanse los ejemplos 1 y 2). Sin embargo, incluso los loci de microsatélites más informativos no son 100% sensibles y 100% específicos.

La potencia de los marcadores individuales en la detección de la presencia de MSI en el tejido asociado a una enfermedad concreta, tal como tumores cancerosos, se puede aumentar enormemente mediante el multiplexado mediante múltiples marcadores. La información aumentada producto de la amplificación y el análisis de un mayor número de loci resulta en una mayor confianza y precisión en la interpretación de los resultados de la prueba. Para obtener la necesaria sensibilidad en la detección o diagnóstico de enfermedades tales como el cáncer, se ha recomendado un análisis de cinco o más loci de microsatélites muy informativos (Boland, 1998 *Cancer Research* 58: 5248-5257). El multiplexado de los loci de microsatélites simplifica aún más el análisis de MSI, permitiendo la amplificación y el análisis simultáneo de todos los loci múltiples, mientras que reduce la cantidad de ADN a menudo limitada requerida para la amplificación.

Otro problema común en la determinación de MSI se refiere a la aparición de un fenotipo MSI intermedio donde sólo un pequeño porcentaje (<30%) de los marcadores de microsatélites están alterados en los tumores (Boland, 1998, *supra*). Estos tumores de baja MSI se piensa que representan un fenotipo mutador distinto con etiología molecular potencialmente diferente de los tumores MSI-H (Thibodeau *et al.*, 1993 *Science* 260: 816-8; Wu *et al.*, 1999 *American Journal of Human Genetics* 65:1291-1298; Kolodner *et al.*, 1999 *Cancer Research* 59:5068-5074; Wijnen *et al.*, 1999 *Nature Genetics* 23:142-144). No está claro, sin embargo, si existe una diferencia real entre tumores MSI-L y MSS.

## ES 2 338 765 T3

Para fines de diagnóstico, los tumores MSI-L y MSS son generalmente considerados como una clase fenotípica estable. Para distinguir con precisión los fenotipos MSI-H y MSI-L se ha recomendado que sean analizados los múltiples marcadores de microsatélites (Boland, 1998; Frazer, 1999 *supra*).

5 Se ha previsto que cuando los loci se co-amplifican y analizan en una reacción de amplificación de multiplexado, otros factores se tengan en cuenta, incluyendo la facilidad y la precisión de la interpretación de los datos. Uno de los principales factores que afectan a la interpretación precisa de los datos es la cantidad de tartamudeo que se produce en los loci de microsatélites en PCR. Fueron seleccionados loci de repetición de tetranucleótidos para su inclusión en el MSI multiplexado analizado según el procedimiento y usando el equipo de la presente invención, ya que muestran  
10 un tartamudeo considerablemente menor que los tipos de repetición más corta, como dinucleótidos (Figura 2). Sin embargo, la selección cuidadosa de los loci sigue siendo necesaria en la elección de los loci de bajo tartamudeo porque el % de tartamudeo puede variar considerablemente, incluso dentro de un determinado tipo de repetición (Figura 4). Fueron escogidos loci de repetición de mononucleótidos para el análisis individual y para la inclusión en el multiplexado de MSI debido al alto índice de inestabilidad en el material biológico enfermo de interés.

15 La incidencia de LOH es otro factor en la selección de los loci de MSI a amplificar y analizar en los procedimientos o los equipos de la presente invención. LOH puede dar lugar a errores de identificación de un alelo normal que falta en un marcador de microsatélites como indicación de MSI cuando no hay otros nuevos fragmentos presentes para ese marcador. Específicamente, no se puede discernir fácilmente si esto representa LOH o MSI verdaderos en los loci que el alelo cambiado ha co-migrado con el resto de los alelos de tipo salvaje. Para minimizar el problema descrito anteriormente, los marcadores de microsatélites seleccionados para su utilización en los actuales procedimientos y equipos preferentemente muestran una baja frecuencia de LOH, preferentemente no mayor de un 20% LOH, más preferiblemente no mayor de 14% LOH, aún más preferentemente, no más de un 3% LOH.

25 Es un suceso relativamente poco común que un marcador de microsatélites tenga todas las cualidades necesarias descritas anteriormente (es decir, alta sensibilidad, alta especificidad, bajo tartamudeo, bajo LOH). El límite para un sistema de análisis de MSI para utilizarse en una prueba de diagnóstico es aún mayor, requiriendo resultados robustos y reproducibles de múltiples loci en un ensayo utilizando pequeñas cantidades de ADN de muestras difíciles y ser capaz de distinguir entre fenotipos MSI-L y MSI-H. Todos los loci de repetición de tetranucleótidos preferidos específicos  
30 identificados aquí como preferidos para su uso en la presente invención se demostraron que cumplen cada uno de los criterios para loci MSI adecuados para su uso en el análisis de diagnóstico, aquí establecido anteriormente.

Criterios de selección adicionales de loci particulares a los dos tipos principales de loci MSI amplificados en los procedimientos de análisis de multiplexado preferidos y utilizando los equipos de los loci presentes se describen a  
35 continuación.

### D. Diseño de cebadores

40 Se proporcionan cebadores para uno o más loci de microsatélites en cada realización del procedimiento y el equipo de la presente invención. Al menos un cebador se proporciona para cada locus, más preferiblemente al menos dos cebadores para cada locus, con al menos dos cebadores siendo en forma de un par de cebadores que flanquean el locus. Cuando los cebadores se utilizan en una reacción de amplificación de multiplexado es preferible seleccionar cebadores y condiciones de amplificación que generen alelos amplificados a partir de múltiples loci co-amplificados que no se  
45 solapen en tamaño o, si se solapan en tamaño, que estén etiquetados de una de manera que permita distinguirlos entre los alelos superpuestos.

Los cebadores adecuados para la amplificación de loci individuales preferiblemente co-amplificados de acuerdo con los procedimientos de la presente invención se proporcionan en el ejemplo 4, la tabla 9, aquí a continuación. Los  
50 cebadores adecuados para su uso en un multiplexado preferido de nueve loci (es decir, BAT-25, D10S1426, D3S2432, BAT-26, D7S3046, D7S3070, MONO-15, D1S518 y D7S1808) se describen en el Ejemplo 6, tabla 11. Los cebadores adecuados para su uso en un multiplexado más preferido de nueve loci (es decir, BAT-25, D10S1426, D3S2432, BAT-26, D7S3046, D7S3070, MONO-15, BAT-40, y D7S1808) se describen en el Ejemplo 8, Tabla 13. Se proporciona una guía para el diseño de estos y de otros multiplexados a continuación. Se contempla que otros cebadores adecuados  
55 para amplificar los mismos loci u otros grupos de loci dentro del alcance de la presente invención podrían determinarse por parte de un experto en la materia.

### E. Diseño y Prueba de Multiplexado de MSI

60 El procedimiento de análisis de multiplexado de loci de microsatélites de la presente invención contempla la selección de un conjunto adecuado de loci, cebadores, y protocolos de amplificación para generar alelos amplificados a partir de múltiples loci co-amplificados que preferiblemente no se solapan en tamaño o, más preferiblemente, que se etiquetan de una manera que se pueden distinguir entre los alelos de loci diferentes que se solapan en tamaño.  
65 Las combinaciones de loci pueden rechazarse por cualquiera de estos dos motivos, o porque, en combinación con uno o más de los loci no producen rendimiento de producto adecuado, o se producen fragmentos que no representan auténticos alelos en esta reacción.

Los siguientes factores son preferentemente tomados en cuenta para decidir sobre qué loci se incluyen en un multiplexado de la presente invención. Para diseñar eficazmente el multiplexado de microsátélites, se determinan intervalos de tamaño de alelos de cada locus. Esta información se utiliza para facilitar la separación de los alelos entre todos los loci diferentes, ya que cualquier solapado podría resultar en un alelo de un locus inadecuadamente identificado como inestable en otro locus.

La cantidad de tartamudeo exhibida por los loci de repetición de mononucleótidos también se toma preferiblemente en consideración, ya que la cantidad de tartamudeo exhibida por un locus puede ser un factor importante en la facilidad y precisión de la interpretación de los datos. Es preferible llevar a cabo un estudio poblacional para determinar el nivel de tartamudeo presente en cada loci de repetición de no mononucleótidos. Tal como se señaló anteriormente, los marcadores de repetición de tetranucleótidos muestran un tartamudeo considerablemente menor que tipos de repetición más cortos, tales como dinucleótidos y, por lo tanto, puede marcarse con precisión en los análisis de MSI (Figuras 2 y 3) (Bacher y Schumm, 1998 Profiles in DNA 2(2):3-6). Hay que tener en cuenta que incluso dentro de una clase de loci de microsátélites, tal como loci de repetición de tetra- y pentanucleótidos, que se sabe que presentan un bajo tartamudeo, el porcentaje de tartamudeo puede variar considerablemente en el tipo de repetición (Figura 3; véase también la Figura 2) (Micka *et al.* 1999, *supra*).

Aunque al menos un mononucleótido y al menos dos loci de repetición de tetranucleótidos se incluyen en el multiplexado de MSI, se pueden incluir en el multiplexado loci co-amplificados según el procedimiento o con el equipo de la presente invención, mononucleótido adicional y/o loci de repetición de tetranucleótidos. También se contempla que los loci de multisátélites distintos de los o loci de repetición de mono-o tetranucleótidos que satisfacen criterios idénticos o similares a los criterios descritos anteriormente se incluyan en el multiplexado.

El multiplexado analizado de acuerdo con la presente invención preferiblemente incluye un conjunto de al menos tres loci de MSI. Más preferiblemente incluye un conjunto de al menos cinco loci de MSI, aún más preferiblemente un conjunto de al menos nueve loci de MSI. Cuando el multiplexado es un conjunto de al menos nueve loci, es preferible un conjunto de por lo menos los loci siguientes: BAT-25, D10S1426, D3S2432, BAT-26, D7S3046, D7S3070, MONO-15, D1S518, y D7S1808, o más preferentemente un conjunto de al menos los loci siguientes: BAT-25, D10S1426, D3S2432, BAT-26, D7S3046, D7S3070, BAT-40, MONO-15 y D7S1808. Una lista de cebadores adecuados para su uso en el primer multiplexado se muestra en el Tabla 11 del ejemplo 6, a continuación. Una lista de cebadores adecuados para su uso en el segundo multiplexado más preferido se proporciona en la tabla 13 del Ejemplo 8, a continuación.

También está previsto que otros factores, tales como combinaciones exitosas de materiales y procedimientos, se tengan en cuenta en el diseño de un multiplexado de loci de MSI. La determinación de estos factores adicionales se puede determinar siguiendo los procedimientos de selección y las directrices aquí descritas, y mediante el uso de técnicas conocidas para un experto en la materia de la presente invención. Específicamente, técnicas iguales o sustancialmente similares pueden utilizarse para identificar los loci preferidos de MSI y conjuntos de loci de MSI aquí descritos a continuación para seleccionar secuencias de un primer par, y para ajustar las concentraciones de cebadores para identificar un equilibrio en el que todos los loci incluidos pueden ser amplificados. En otras palabras, una vez que el procedimiento y los materiales de esta invención se describen, diversos procedimientos de selección de loci, pares de cebadores, y técnicas de amplificación para su uso en el procedimiento y el equipo de esta invención es probable que se propongan por parte de un experto en la materia. Todos estos procedimientos están pensados para estar incluidos en el alcance de las presentes reivindicaciones.

#### F. Fuentes de ADN genómico

El ADN genómico amplificado o co-amplificado de acuerdo con los procedimientos de la presente invención se origina de material biológico de un sujeto individual, preferentemente un mamífero, más preferiblemente un perro, gato, caballo, oveja, ratón, rata, conejo, mono, o humano, aún más preferiblemente de un humano o un ratón, y más preferiblemente de un ser humano. El material biológico puede ser de cualquier tejido, células o fluidos biológicos del sujeto que contienen el ADN genómico. El material biológico se selecciona preferentemente del grupo que consiste de tejido tumoral, células diseminadas, heces, células sanguíneas, plasma sanguíneo, suero, ganglios linfáticos, orina y otros fluidos corporales.

El material biológico puede ser en forma de muestras de tejido fijadas en formalina e incrustadas en parafina (en adelante "PET"). Las muestras de tejido de biopsias se suelen almacenar en PET para una conservación a largo plazo. La formalina crea enlaces cruzados en la muestra de tejido que pueden ser difíciles de romper, a veces resultando en bajos rendimientos de ADN. Otro problema asociado con las muestras fijadas en formalina e incrustadas en parafina es que la amplificación de fragmentos más largos es a menudo problemática. Cuando el ADN de las muestras se utiliza en las reacciones de amplificación de multiplexado, se aprecia una disminución significativa en la altura de los picos cuando aumenta el tamaño del fragmento. El procedimiento de análisis de microsátélites y el equipo de la presente invención están preferiblemente diseñados para ampliar y analizar el ADN de muestras de tejidos de PET. (Véase el ejemplo 7 para un ejemplo de la amplificación de estas muestras mediante un procedimiento de la presente invención).

Cuando el procedimiento o el equipo de la presente invención se utiliza en el análisis o la detección de tumores, por lo menos una muestra de ADN genómico analizada se origina en un tumor. Cuando un locus monomórfico o

## ES 2 338 765 T3

cuasi-monomórfico, tal como MONO-11 o MONO-15 se amplifica, el tamaño de los alelos amplificados resultantes puede compararse con el tamaño de los alelos más comúnmente observados en ese locus en la población general. El presente procedimiento y el equipo se utilizan preferentemente para diagnosticar o detectar tumores mediante la co-amplificación de al menos dos muestras diferentes de ADN de la misma persona, en el que una de las dos muestras no se origina de material biológico normal no canceroso.

La presente invención se explica en los siguientes ejemplos, que no debe ser interpretados a modo de limitación del alcance de la presente invención.

### Ejemplo 1

#### *Cribado de marcadores de microsatélites para la frecuencia de MSI*

En este ejemplo, los marcadores de microsatélites en ADN aislado de tumores se compararon con los marcadores de microsatélites en ADN aislado de células o el tejido normal con el fin de detectar MSI. En concreto, los loci de microsatélites fueron amplificados a partir de muestras de ADN normal/tumoral emparejadas y genotipo. Si uno o más alelos diferentes están presentes en la muestra de ADN del tumor que no se encontraron en la muestra normal de la misma persona, entonces se calificó como MSI positiva. Se analizaron marcadores de microsatélites de repetición de dinucleótidos, tetranucleótidos y pentanucleótidos para la frecuencia de alteración para determinar la sensibilidad relativa de los marcadores particulares de MSI. La información detallada sobre los procedimientos específicos utilizados en este ejemplo se proporciona aquí, a continuación.

*Tejidos y aislamiento de ADN.* Muestras de tejido normal (sangre) y neoplásico coincidentes de 39 pacientes se obtuvieron de la Cooperative Human Tissue Network (en lo sucesivo, "CHTN") (Ohio State University, Columbus, OH). Después de resección quirúrgica, las muestras de tejido fueron congeladas en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se tomaron muestras de sangre por punción venosa utilizando tubos de vacío. La extracción de ADN de la sangre y los tejidos sólidos se llevó a cabo por procedimiento de fenol/cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press, Cold Springs Harbor, Nueva York) o con el equipo QIAamp Blood and Tissue (QIAGEN, Santa Clarita, CA) siguiendo el protocolo del fabricante.

*Análisis PCR y de microsatélites.* Se utilizaron cebadores marcados de manera fluorescente de 275 loci de microsatélites para amplificar el ADN de la plantilla de pares normal/tumoral de muestras de tumor. Doscientos cuarenta y cinco marcadores de repetición de tetranucleótidos de Research Genetics CHLC/Weber Human Screening Set Version 9.0 fueron evaluados (Research Genetics, Huntsville, AL). Conjuntos de cebadores adicionales para marcadores de repetición de tetranucleótido y pentanucleótidos fueron obtenidos de Promega Corporation (Madison, WI) (el sistema PowerPlex™ 16 contiene loci D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, VWA, D8S1179, TPOX, y FGA). Los marcadores de repetición de pentanucleótidos TP53, Penta A, B Penta, Penta C, Penta D, Penta E, Penta F y Penta F se sintetizaron de manera personalizada (Promega Corporation, Madison, WI), utilizando datos de la secuencia de bases de datos públicas de marcadores de dinucleótidos incluidos para propósitos de comparación (D8S254, NM23, D18S35, D5S346, TP53-di, D2S123, D1S2883, D3S1611, D7S501) se obtuvieron de PE Biosystems (actualmente conocido en el mercado como Applied Biosystems Group, Foster City, CA).

Los marcadores de Research Genetics, Human Screening Set versión 9.0, fueron multiplexados y cribados para detectar MSI, utilizando 2,5 ng de ADN en  $10\mu\text{l}$  de reacciones de PCR que se describen a continuación. Otros loci fueron evaluados como monoplexados utilizando 1 ng de ADN en  $25\mu\text{l}$  de reacciones de PCR, tal como se describe a continuación. Todos los marcadores fueron amplificados con PCR bajo las mismas condiciones utilizando un Perkin-Elmer® GeneAmp PCR System 9600 Thermal Cycler, salvo que se indique lo contrario a continuación. Los marcadores de microsatélites de PowerPlex™ 16 System (Manual Técnico #TMD012, Promega Corporation, Madison, WI) y los marcadores de repetición de dinucleótido del sistema de ensayo de microsatélites RER (véase la documentación del producto de PE Biosystems, biosistemas no aplicados, Foster City, CA) fueron analizados siguiendo el protocolo del fabricante.

## ES 2 338 765 T3

TABLA 1

*10 µl de reacción de PCR triple para los marcadores de Research Genetics*

<i>Componentes PCR de la Mezcla maestra</i>	<i>volumen por muestra</i>
Agua Libre de Nucleasa	3,30µl
Tampón GoldST*R 10X (Promega)	1,00µl
Cebador 1	0,50µl
Cebador 2	0,50µl
Cebador 3	0,50µl
Cebador 4	0,50µl
Cebador 5	0,50µl
Cebador 6	0,50µl
ADN de Polimerasa AmpliTaq Gold (5 Unidades/µl) (Perkin Elmer)	0,50µl
ADN (1 ng/µl)	2,50µl
Volumen total de reacción	10,00µl

TABLA 2

*25 µl de reacción de PCR*

<i>Componente de PCR de la Mezcla maestra</i>	<i>Volumen por muestra</i>
Agua Libre de Nucleasa	17,45µl
Tampón GoldST*R 10X (Promega)	2,50µl
Mezcla de Pares de Cebadores 10X (10µM)	2,50µl
Polimerasa de ADN AmpliTaq Gold (5 Unidades/µl) (Perkin Elmer)	0,05µl
Plantilla de ADN (0,4 ng/µl)	2,50µl
Volumen total de reacción	25,00µl

## ES 2 338 765 T3

TABLA 3

*Perfil cíclico para PE 9600 Thermal Cycler*

5

	1 ciclo	95°C durante 11 minutos
	1 ciclo	96°C durante 1 minuto
10	10 ciclos	94°C durante 30 segundos
		rampa de 68 segundos a 56°C, mantenida durante 30 segundos
15		rampa de 50 segundos a 70°C, mantenida durante 45 segundos
	20 ciclos	94°C durante 30 segundos
20		rampa de 60 segundos a 56°C, mantenida durante 30 segundos
		rampa de 50 segundos a 70°C, mantenida durante 45 segundos
25	1 ciclo	60°C durante 30 minutos
	1 ciclo	Remojado 4°C

30

Un microlitro de producto de PCR (marcadores de Research Genetics fueron diluidos primero 1:4 en tampón PCR 1X GoldST®R) se combinó con 1 µl of Internal Lane Standard (Promega Corporation, Madison, WI) y 24 µl de formamida desionizada. Las muestras fueron desnaturalizadas por calentamiento a 95°C durante 3 minutos y se refrigeraron con hielo durante 3 minutos. La separación y la detección de los fragmentos amplificados se realizó en un ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer siguiendo el protocolo estándar recomendado en el Manual del usuario con los siguientes valores: 5 segundos tiempo de inyección, 15 kV tensión de inyección, 15 kV tensión de ejecución, 60°C temperatura de ejecución, y 28 minutos tiempo de ejecución.

35

40

*Interpretación del ensayo.* La identificación de los tamaños de los alelos normales y tumorales fue realizada en el electroferograma apropiado del ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y se determinaron los picos predominantes para cada locus. Uno o dos picos o alelos pueden estar presentes en cada locus en las muestras normales, dependiendo de si la persona es homocigótica o heterocigótica para un marcador particular. Los patrones de alelos de los pares de genotipos normales y tumorales fueron comparados y se calificaron como MSI positivo si uno o más alelos diferentes están presentes en las muestras tumorales de ADN que no fueron encontrados en una muestra normal de la misma persona.

45

50

Una amplia gama en frecuencia de alteración fue observada entre las muestras y entre los marcadores evaluados. Las muestras se dividen en dos grupos en función de la frecuencia de la alteración usando las directrices recomendadas en el taller NCI sobre MSI (Boland *et al.* 1998). Las muestras con mayor del 30-40% de marcadores que presentaban alteración en muestras de tumores fueron clasificadas como MSI-H y <30-40% como MSI-L. Las muestras sin alteraciones fueron clasificadas como de microsatélites estables (MSS). Basándose en esta definición de fenotipos de MSI, nueve muestras fueron clasificadas como MSI-H y las restantes 30, como MSI-L o MSS.

55

60

Los loci de repetición de tetra- y pentanucleótidos exhibieron la menor cantidad de tartamudeo de los loci examinados, anteriormente. Ver la Figura 4 para un trazado de los resultados de % de tartamudeo observado en los loci de repetición de tetra- y pentanucleótidos. Los marcadores de repetición de tetranucleótidos también varían en la frecuencia de la alteración, que van desde el 0 al 100% de MSI en el grupo de MSI-H (Figura 5). Los marcadores de pentanucleótidos, en general, muestran bajos niveles de MSI (Figura 6). Los marcadores de microsatélites muestran una alta sensibilidad a MSI (>88% MSI con muestras de MSI-H) y una alta especificidad (<8% MSI con muestras MSI-L y MSS) con las muestras de CHTN que fueron seleccionadas para la evaluación adicional con 20 muestras de tumores de cáncer de colon/normales adicionales de la Mayo Clinic (Rochester, MN) (véase el ejemplo 5).

65

## Ejemplo 2

*Identificación y caracterización de los loci de repetición de mononucleótidos*

5 Debido a la naturaleza altamente informativa de los loci de repetición de mononucleótidos en la determinación de fenotipo de MSI, también se investigaron las regiones poli (A) del genoma humano como una nueva fuente de marcadores para los ensayos de MSI. Para lograr esto, las repeticiones de mononucleótidos fueron identificadas en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando BLASTN (Altschul, *et al.* 1990 J. Mol. Biol. 215:402-410) buscando secuencias (A)<sub>30</sub>(N)<sub>30</sub>. La secuencia (N)<sub>30</sub> fue añadida para eliminar frecuentes resultados de ARNm y para asegurar que la secuencia de flaqueo estaba disponible para el diseño de cebadores para PCR. A continuación, se diseñaron cebadores de flaqueo para 33 secuencias de ADN de GenBank utilizando el software Oligo Primer Analysis versión 6.0 (National Biosciences, Inc., Plymouth, MN) para amplificar la región que contiene la repetición poli (A). La Evaluación de los loci se realizó con 9 muestras de MSI-H y 30 de MSS de cáncer de colon y las correspondientes muestras de ADN normal. Los protocolos para PCR, la detección y el análisis se describen en el Ejemplo 1.

15 Dos características se cribaron en los nuevos loci. En primer lugar, los loci se cribaron para que puedan detectar MSI en el grupo MSI-H y no en el grupo MSS. En segundo lugar, los loci fueron seleccionados sobre la base de ser monomórficos o casi monomórficos (cuasi-monomórficos). La naturaleza monomórfica de los nuevos loci fue determinada mediante el genotipo de 96 muestras de 5 grupos raciales (afroamericanos, asiático-americanos, caucásico-americanos, hispano-americanos, indio-americanos). El cribado de los 33 loci de repetición de mononucleótidos reveló cuatro nuevos loci de repetición de mononucleótidos (MONO-3, MONO-11, MONO-15, y MONO-19) que muestran una alta sensibilidad a MSI (Tabla 4 y Figura 7) y eran relativamente homocigóticos y monomórficos (Tabla 5). El grado de homocigosis y mono-morfismo detectados en cada locus como se muestra en la Tabla 5.

TABLA 4

*Resultados del Cribado de Loci de Repetición de Mononucleótidos*

Tipo de MSI	BAT-25	BAT-26	MONO-3	MONO-11	MONO-15	MONO-19
MSI-H	100%	100%	100%	100%	100%	100%
MSI-L o MSS	0%	0%	0%	0%	0%	0%

TABLA 5

*Nivel de Polimorfismo de Loci de Repetición de Mononucleótidos*

	BAT-25	BAT-26	MONO-11	MONO-15
% Homocigosidad	95% (82/86)	95% (89/94)	89% (76/85)	99% (87/88)
% Monomorfo	95%	95%	89%	99%

## Ejemplo 3

*Estudios de población*

60 Un estudio de la población se realizó en 93 muestras de individuos afro-americanos fueron genotipadas utilizando loci de microsatélites preferidos seleccionados como candidatos para el multiplexado en los estudios en los ejemplos 1 y 2 anteriores. Ver la Tabla 6, a continuación, y la tabla 3, más arriba, para las condiciones de amplificación utilizadas. Véase la tabla 7, a continuación, para una lista de los loci amplificados y analizados en este estudio. Además, una muestra de ADN combinado de diversidad humana y ADNs CEPH de control 1331-1 y 1331-2 (Coriell Cell Repository, Camden, Nueva Jersey) fueron incluidos en la población de selección. Se utilizaron muestras afro-americanas debido a que contienen la mayor diversidad genética en todos los grupos raciales.

## ES 2 338 765 T3

Para facilitar el examen de 96 muestras con 22 marcadores de microsatélites diferentes, los marcadores seleccionados fueron multiplexados en pequeños grupos de tres. Se utilizaron conjuntos de cebadores multiplexados para amplificar ADN de las muestras individuales usando las condiciones descritas a continuación.

5

TABLA 6

*25 µl de reacción de PCR*

10

<i>Componentes de PCR de la Mezcla maestra</i>	<i>Volumen por muestra</i>
Agua Libre de Nucleasa	17,30µl
Tampón GoldST*R 10X (Promega)	2,50µl
Mezcla de cebadores 10X Triple (1 a 10µM cada uno)	2,50µl
Polimerasa de ADN AmpliTaq Gold (5 Unidades/µl) (Perkin Elmer)	0,20µl
Plantilla de ADN (0,4 ng/microlitro)	2,50µl
Volumen total de reacción	25,00µl

15

20

25

30

Los resultados del estudio de población se resumen en la Tabla 7. Se identificó el tamaño del alelo más pequeño y más grande para cada locus para determinar el rango de tamaño de alelos. Para calcular el porcentaje de tartamudeo, la altura del pico de la banda de tartamudeo fue dividida por la altura de los picos generados por el alelo verdadero, a continuación, multiplicado por 100. Los valores mínimo y máximo de tartamudeo se calcularon para cada locus, así como el porcentaje de tartamudeo promedio combinado de 20 muestras al azar.

35

TABLA 7

*Resumen de los resultados del estudio de población*

40

Locus	GenBank ID #	Rango de tamaños de alelos		% Tartamudeo Promedio
		GenBank	Estudio Pob.	
BAT-25	U63834	18 pb	42 pb	ND
BAT-26	U41210	18 pb	12 pb	ND
MONO-11	AC007684	ND	14 pb	ND
MONO-15	AC007684	ND	6 pb	ND
D1S547	G07828	46 pb	26 pb	4,9
D1S518	G07854	48 pb	ND	ND
D1S1677	G09926	40 pb	35 pb	9,7
D2S1790	G08190	68 pb	44 pb	7,8
D3S2432	G08240	67 pb	40 pb	8,0
D5S818	G08446	36 pb	ND	ND

65

ES 2 338 765 T3

Locus	GenBank ID #	Rango de tamaños de alelos		% Tartamudeo Promedio
		GenBank	Estudio Pob.	
D5S2849	G15752	40 pb	37 pb	5,5
D6S1053	G08556 -	48 pb	36 pb	6,9
D7S1808	G08643	58 pb	44 pb	7,6
D7S3046	G10353	48 pb	71 pb	12,9
D7S3070	G27340	44 pb	44 pb	10,3
D8S1179	G08710	44bp	ND	ND
D9S2169	G08748	12 pb	ND	ND
D10S677	G12433	28 pb	40 pb	5,5
D10S1426	G08812	28 pb	ND	ND
D10S2470	G10285	48 pb	29 pb	5,9
D12S391	G08921	52 pb	48 pb	7,6
D17S1294	G07967	44 pb	28 pb	7,2
D17S1299	G07952	40bp	ND	ND
D18S51	L18333	76bp	ND	ND
FGA	M64982	120bp	ND	ND

Ejemplo 4

*Diseño de Multiplexado de MSI*

Para desarrollar un sistema de ensayo de multiplexado de MSI que sea muy sensible a MSI, con un tartamudeo mínimo, y una incidencia mínima de LOH, los criterios enumerados en el tabla 8, a continuación, se utilizaron para identificar loci de cribado en los ejemplos anteriores como posibles candidatos para su uso en el análisis de MSI:

## ES 2 338 765 T3

TABLA 8

*Especificaciones de loci de MSI para uso en Multiplexado*

5

10

15

20

25

30

35

40

Especificaciones de Monoplexado	
Tetranucleótidos	> 70% MSI en muestras de MSI-H
	< 8% MSI con muestras de MSI-L y MSS
	LOH <14% en muestras de MSI-H
	Promedio % tartamudeo <13%
Mononucleótidos	100% MSI en muestras de MSI-H
	0% MSI con muestras de MSI-L y MSS
Especificaciones de Multiplexado	9 loci; 3 mono- y 6 tetranucleótidos
	Todos los amplificaciones <250bp
	Amplificación robusta de ADN de muestras de PET
	Amplificación robusta de 1 a 2 ng de ADN
	Alturas de picos equilibrados entre todos los loci en multiplexado
	Sensibilidad > 99,9%
	Especificidad > 99,9%

45

Los loci que figuran en la tabla 9, a continuación, fueron identificados como lugares geométricos que cumplen las especificaciones que figuran en el tabla 8, anterior.

50

TABLA 9

*Loci de microsatélites preferidos para multiplexado*

55

60

65

Locus	Tipo de repetición	No. adhesión GenBank	SEQ. ID. cebador	% MSI (MSI-H)	% LOH (MSI-H)	% MSI (SMS o MSI-L)
BAT-25	Mono	U63834	1,2	100%	0%	0%
BAT-26	Mono	U41210	3,4	100%	0%	0%
MONO-	Mono	AC007684	5,6	100%	0%	0%

ES 2 338 765 T3

Locus	Tipo de repetición	No. adhesión GenBank	SEQ. ID. cebador	% MSI (MSI-H)	% LOH (MSI-H)	% MSI (SMS o MSI-L)
11						
MONO-15	Mono	AC007684	7, 8	100%	0%	0%
D1S518	Tetra	G07854	9, 10	83%	0%	0%
D1S547	Tetra	G07828	11,12	78%	3%	0%
D1S1677	Tetra	G09926	13,14	80%	0%	3%
D2S1790	Tetra	G08190	15,16	82%	3%	3%
D3S2432	Tetra	G08240	17,18	83%	3%	3%
D5S818	Tetra	G08446	19,20	72%	14%	3%
D5S2849	Tetra	G15752	21,22	76%	7%	0%
D6S1053	Tetra	G08556	23,24	76%	0%	0%
D7S51808	Tetra	G08643	25,26	90%	0%	0%
D7S3046	Tetra	G10353	27,28	93%	0%	0%
D7S3070	Tetra	G27340	29,30	86%	3%	3%
D8S1179	Tetra	G08710	31,32	75%	7%	7%
D9S2169	Tetra	G08748	33,34	72%	3%	0%
D10S1426	Tetra	G08812	35,36	86%	3%	0%
D10S2470	Tetra	G10285	37,38	83%	3%	0%
D12S391	Tetra	G08921	39,40	79%	3%	0%
D17S1294	Tetra	G07967	41,42	86%	3%	0%
D17S1299	Tetra	G07952	43,44	79%	3%	0%
D18S51	Tetra	L18333	45,46	75%	7%	0%
FGA	Tetra	M64982	47,48	82%	7%	7%
* Muestras de MSI-H: N = 29 y muestras de MSI-L/S N = 30.						

## Ejemplo 5

*Análisis de desajuste de reparación de genes*

5 Para determinar la causa subyacente de MSI en muestras de tumores MSI-H utilizadas en el desarrollo del ensayo de multiplexado de MSI, fueron examinados los niveles de expresión de proteínas de los genes MLH1 y MSH2. El análisis inmunohistoquímico de tejidos incrustados en parafina de ocho muestras de MSI-H se llevó a cabo tal como se describe en Thibodeau *et al.* (Cancer Research 58, 1713-1718). La falta de expresión de proteínas en los genes MLH1 y MSH2 se espera en muestras de tumores con niveles altos de MSI y es una indicación de desajuste disfuncional del sistema de reparación.

10 Los resultados de los ensayos inmunohistoquímicos en las muestras tumorales de MSI-H se muestran en la tabla 10. Debe indicarse que una "ND" en una columna de expresión de proteínas en el tabla 10 se indica que no se detectó nada.

15

TABLA 10

20

*Expresión de proteínas de MSH1 y MSH2 en muestras cáncer de MSI-H*

25

Tumor de muestra	Fuente	Fenotipo MSI	Expresión de proteínas	
			HMLH1	HMSH2
C172	CHTN	MSI-H	--	+
C404	CHTN	MSI-H	--	+
C507	CHTN	MSI-H	--	+
C546	CHTN	MSI-H	--	+
C624	CHTN	MSI-H	ND	ND
C710	CHTN	MSI-H	--	+
C1166	CHTN	MSI-H	--	+
C5412	CHTN	MSI-H	--	+
S15945	CHTN	MSI-H	+	+
A-1	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
A-5	Mayo Clinic	MSI-H	--	+

55

60

65

ES 2 338 765 T3

	Tumor de muestra	Fuente	Fenotipo MSI	Expresión de proteínas	
				HMLH1	HMSH2
5	A-7	Mayo Clinic	MSI-H	+	--
10	A-15	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
	A-19	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
15	A-29	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
	A-49	Mayo Clinic	MSI-H	+	--
20	A-50	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
	A-73	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
25	A-102	Mayo Clinic	MSI-H	+	--
	B-2	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
30	B-52	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
	B-61	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
35	B-75	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
	B-76	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
40	B-93	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
	B-107	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
45	B-155	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
	B-164	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
50	B-166	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
	B-173	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
55	B-199	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
	B-209	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
60	B-210	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
	B-268	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
	B-299	Mayo Clinic	MSI-H	--	+

65

Tumor de muestra	Fuente	Fenotipo MSI	Expresión de proteínas	
			HMLH1	HMSH2
B-334	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
B-379	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
B-402	Mayo Clinic	MSI-H	--	+
B-564	Mayo Clinic	MSI-H	--	+

## Ejemplo 6

20 *Desarrollo y Validación del ensayo de multiplexado de MSI*

Una vez que la mejor localización fue seleccionada para su uso en el diseño de los multiplexados que se analizaron de acuerdo con los procedimientos de la presente invención, se tuvieron que superar los problemas relacionados con PCR de multiplexado y la incompatibilidad entre loci. Esto requirió un diseño de cebadores cuidadoso y un extenso ensayo y error para encontrar loci que son capaces de amplificación simultánea utilizando un único conjunto de condiciones de PCR. Los problemas encontrados fueron: (1) interacciones cebador-cebador que se produjeron cuando gran número de oligos fueron combinados en una sola reacción de PCR, (2) limitaciones de diseño de cebadores debidas a restricciones de secuencia en un locus particular (por ejemplo, el tamaño mínimo de amplificación permitido por secuenciado de ADN, % GC sub-óptimo de cebadores, dificultad para equilibrar Tm para todos los cebadores bajo condiciones uniformes de PCR, dificultad en la búsqueda de cebadores con perfiles térmicos deseables para reducir al mínimo la amplificación no específica, formación de horquillas y auto dimerización de cebadores, homología a otras secuencias de repetición en genoma humano), y (3) diseño de multiplexado que permite la separación de los 9 loci dentro del rango de alcance limitado de 250 pb.

Basándose en la extensiva evaluación de cerca de 300 marcadores de microsatélites descritos en los Ejemplos 1 a 5, nueve loci fueron seleccionados para el ensayo preferido de multiplexado de MSI (Tabla 11). Tres loci son repeticiones monoplexadas (BAT-25, BAT-26 y MONO-15) y seis repeticiones de tetranucleótidos (D1S518, D3S2432, D7S3046, D10S1426, D7S3070, D7S1808). Estos loci resultaron ser un excelente conjunto de marcadores para la identificación de MSI en muestras de tumores. Los resultados del análisis de MSI en 29 muestras de cáncer de colon MSI-H y 30 MSI-L o MSS usando estos nueve locus multiplexados se resumen en la Figura 8.

Un ejemplo típico de los resultados producidos por el uso de los nueve locus MSI multiplexados descritos anteriormente se muestra en la Figura 9. La imagen fue generada por la ampliación simultánea de los nueve loci de microsatélites seleccionados, seguida por separación de los productos de PCR en un ABI 310 CE. La separación de los nueve loci de microsatélites en un capilar único (o carril de gel) se logró mediante el diseño de los multiplexados de manera que los loci no coinciden en el tamaño o mediante el uso de diferentes tintes fluorescentes. Los rangos de tamaño de los loci múltiples fueron establecidos por el genotipo de 93 muestras de individuos afro-americanos utilizando MSI multiplexado descrito siguiendo el protocolo descrito a continuación. Además, una muestra de ADN de diversidad humana combinada y ADN de control de CEPH 1331-1 y 1331-2 (Coriell Cell Repository) se incluyeron en la población de selección. Se utilizaron muestras afro-americanas debido a que contienen la mayor cantidad de diversidad genética en todos los grupos raciales.

## ES 2 338 765 T3

TABLA 11

*Ensayo de Loci y Cebadores de Multiplexado de MSI*

Locus	GenBank ID No.	Rep. en Tipo	Tinte	Rango de tamaño	Cebador 1 (SEQ. ID.)	Cebador 2 (SEQ. ID.)
BAT-25	U63834	Mono	TMR	118-127	1	60
D10S1426	G08812	Tetra	TMR	152-173	57	58
D3S2432	G08240	Tetra	TMR	198-234	17	59
BAT-26	U41210	Mono	FL	103-116	61	62
D7S3046	G10353	Tetra	FL	122-163	55	56
D7S3070	G27340	Tetra	FL	186-249	53	54
MONO-15	AC007684	Mono	JOE	115-117	7	8
DIS518	G07854	Tetra	JOE	136-178	49	50
D7S1808	G08643	Tetra	JOE	190-218	51	52

*Protocolo para ensayo de multiplexado de MSI.* Las plantillas de ADN de tejidos normales y tumorales obtenidas de un mismo individuo se purificaron utilizando el equipo QIAamp Blood and Tissue (QIAGEN, Santa Clarita, CA) siguiendo el protocolo de fabricación. Dos nanogramos de plantilla de ADN en un volumen de 25  $\mu$ l de reacción fueron amplificados con PCR utilizando el protocolo detallado en la Tabla 12, a continuación, utilizando el perfil de ciclo descrito en la tabla 3, anterior.

TABLA 12

*Mezcla de amplificación para ensayo de multiplexado de MSI*

<i>Componentes de la Mezcla Maestra de PCR</i>	<i>Volumen por muestra</i>
Agua Libre de Nucleasa	17,00 $\mu$ l
Tampón GoldST*R 10X (Promega)	2,50 $\mu$ l
Cebador Mezcla Pares (10 $\mu$ M)	2,50 $\mu$ l
polimerasa de ADN AmpliTaq Gold (Perkin Elmer)	0,50 $\mu$ l
Plantilla de ADN (0,8ng/ $\mu$ l)	2,50 $\mu$ l
Volumen total de reacción	25,00 $\mu$ l

## ES 2 338 765 T3

Un microlitro de producto de PCR se combinó con 1  $\mu$ l of Internal Lane Standard (Promega Corporation, Madison, WI) y 24  $\mu$ l de formamida desionizada. Las muestras fueron desnaturalizadas por calentamiento a 95°C durante 3 minutos y se refrigeraron con hielo durante 3 minutos. La separación y detección de los fragmentos amplificados se realizó en un ABI PRISM 310 Genetic Analyzer siguiendo el protocolo estándar recomendado en el Manual del Usuario con los siguientes valores:

Módulo de ejecución:	GS STR POP4 (filtro serie A)
Tiempo de inyección:	4 segundos
Voltaje de inyección:	15 kV
Tensión de ejecución:	15 kV
Temperatura de ejecución:	60°C
Tiempo de ejecución:	24 minutos

La identificación de los alelo tamaños de amplificación de alelos normales y tumorales fue realizado mediante el examen del electroferograma apropiado del ABI PRISM 310 Genetic Analyzer y determinando los picos predominantes para cada locus. Uno o dos picos o alelos presentes para cada locus en las muestras normales, dependiendo de si la persona era homocigota o heterocigota para un marcador particular. Los patrones de alelos de los pares de genotipos normales y tumorales fueron comparados y se calificaron como MSI positivo si uno o más alelos diferentes están presentes en las muestras tumorales de ADN que no fueron encontrados en una muestra normal de la misma persona. Ejemplos típicos de los resultados obtenidos usando multiplexado diseñado para el análisis de MSI se muestran en las figuras 10 y 11 para cáncer de colon y la Figura 12 para cáncer de estómago.

### Ejemplo 7

#### *Amplificación de ADN de muestras de PET utilizando multiplexado de MSI*

Los loci de microsatélites del multiplexado identificados en el ejemplo 6, anteriormente, fueron evaluados para su capacidad para amplificar el ADN de muestras incrustadas en parafina y fijadas con formalina. El ADN fue extraído de tres secciones de 10 micrones cortadas de los bloques de PET utilizando el equipo QIAamp Tissue (Qiagen, Santa Clarita, CA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones. Cien microlitros de tampón QIAGEN AE precalentado a 70°C se añadieron a la columna, se incubaron durante 5 minutos, se centrifugaron, a continuación, se volvieron a aplicar a la columna para una segunda elución. Dos microlitros (de 100  $\mu$ l) de solución de ADN purificado fueron utilizados como plantilla para las reacciones de PCR. El juego de cebadores multiplexados de nueve locus se descrito en el ejemplo 6 fue utilizado para amplificar el ADN de muestras de PET. Los resultados indican que el multiplexado de MSI es capaz de amplificar el ADN de muestras de PET difíciles y comúnmente utilizadas (Figura 13).

### Ejemplo 8

#### *Segunda Configuración del sistema de multiplexado de MSI*

Una segunda serie de nueve loci se identificaron para su análisis en un segundo ensayo de multiplexado de MSI, de ocho del conjunto de loci más conocidos identificados en el ejemplo 4, anteriormente, para determinar el MSI en muestras de tumores de colon, y desde un locus de repetición de mononucleótidos (BAT-40). El diseño de los loci de multiplexado fue tal que los loci no se solapan en tamaño en un único capilar o carril de gel o puede etiquetarse usando tintes diferentes cuando se separan y se produzca la superposición. El uso de determinadas condiciones experimentales empíricamente óptimas y análisis de microsatélites de multiplexado se realizó en varios cientos de individuos sanos.

El conjunto de nueve loci seleccionados para el ensayo de MSI multiplexado y datos relevantes de identificación para cada locus se muestran en la Tabla 13, a continuación.

## ES 2 338 765 T3

TABLA 13

*Loci y cebadores del ensayo multiplexado de MSI*

Locus	GenBank ID No.	Tipo de repetición	Tinte	Rango de tamaño	Cebador 1 (SEQ. ID.)	Cebador 2 (SEQ. ID.)
BAT-25	U63834	Mono	TMR	118-127	1	60
D10S1426	G08812	Tetra	TMR	152-173	57	58
D3S2432	G08240	Tetra	TMR	198-234	63	59
BAT-26	U41210	Mono	FL	103-116	61	62
D7S3046	G10353	Tetra	FL	122-163	55	64
D7S3070	G27340	Tetra	FL	186-249	53	54
BAT-40	M38180	Mono	JOE	81-105	65	66
MONO-15	AC007684	Mono	JOE	145-155	67	68
D7S1808	G08643	Tetra	JOE	190-218	51	52

Cuatro de los loci en el segundo multiplexado de MSI son repeticiones de mononucleótidos (BAT-25, BAT-26, BAT-40 y MONO-15) y cinco son repeticiones de tetranucleótidos (D3S2432, D7S1808, D7S3046, D7S3070, D10S1426). La tabla 13 muestra pares de cebadores usados para amplificar cada locus en el segundo multiplexado de MSI, y rango de tamaño aproximado de los fragmentos producidos en la amplificación de cada locus con cada par de cebadores. Las secuencias de cebadores identificadas en el tabla 13 fueron seleccionadas como especialmente adecuadas para la amplificación de cada locus en el segundo multiplexado de MSI.

Los resultados del análisis de MSI en 36 muestras de cáncer de colon MSI-H y 30 MSS usando el multiplexado de nueve loci y los pares de cebadores descritos en la Tabla 13 se muestran en la Tabla 14, a continuación, y se ilustran en la Figura 14. Figura 14 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de MSI medido en cada locus del multiplexado de cada uno de los dos tipos de muestras estudiadas (es decir, MSI-H y MSS). Un locus adicional del multiplexado identificado en el ejemplo 6, es decir, D1S518, también fue incluido en este ensayo.

(Tabla pasa a página siguiente)

## ES 2 338 765 T3

TABLA 14

*Resultados del ensayo de multiplexado de MSI*

5

Locus	% MSI-H	% MSS
D1S518	75	3
BAT-25	100	0
D10S1426	86	7
D3S2432	86	3
BAT-40	100	0
MONO-15	100	0
D7S1808	94	0
BAT-26	100	0
D7S3070	86	3
D7S3046	76	7

10

15

20

25

30

Los resultados del ensayo, que se resumen en la Tabla 14 y se ilustran en la Figura 14, mostraron que la amplificación de BAT-40 resultó en una discriminación más clara entre las muestras de MSI-H y MSS que D1S518. Los nueve loci amplificados mediante usando el segundo sistema de multiplexado de MSI se detectaron con una eficiencia muy alta.

### Ejemplo 9

40

#### *Análisis del Sistema de multiplexado de MSI*

Noventa y tres muestras de personas afro-americanas, una muestra combinada de ADN de diversidad humana y ADN de control de líneas celulares 1331-1 y 1331-2 (Coriell Cell Repository, Camden NJ) fueron examinadas utilizando el sistema de multiplexado de nueve loci descrito en el Ejemplo 8. La amplificación simultánea de los nueve loci de microsatélites seleccionados seguida de la separación de los productos en un ABI 310 CE, tal como se ilustra a continuación, produjo todos los productos esperados.

*Protocolo para el ensayo de multiplexado de MSI.* Dos nanogramos de la plantilla normal de ADN fueron purificados mediante el equipo QIAamp Blood and Tissue (QIAGEN, Santa Clarita, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN fue amplificado por PCR en un volumen de 25  $\mu$ l de reacción utilizando el protocolo que se detalla en el tabla 15 y en el Tabla 16, a continuación.

55

60

65

## ES 2 338 765 T3

TABLA 15

*Mezcla de amplificación para el ensayo de multiplexado de MSI*

<i>Componentes de Mezcla maestra de PCR</i>	<i>Volumen por muestra</i>
Agua Libre de Nucleasa	17,00µl
Tampón GoldST*R 10X (Promega)	2,50µl
Mezcla de pares de cebadores (10µM)	2,50µl
Polimerasa de ADN AmpliTaq Gold (Perkin Elmer)	0,50µl
Plantilla de ADN (0,8ng/µl)	2,50µl
Volumen total de reacción	25,00µl

TABLA 16

*Perfil de Ciclo para ensayo de multiplexado de MSI*

1 ciclo	95°C durante 11 minutos
1 ciclo	96°C durante 1 minuto
10 ciclos	94°C durante 30 segundos
	rampa de 68 segundos a 60°C, mantenida durante 30 segundos
	rampa de 50 segundos a 70°C, mantenida durante 90 segundos
20 ciclos	94°C durante 30 segundos
	rampa de 60 segundos a 60°C, mantenida durante 30 segundos
	rampa de 50 segundos a 70°C, mantenida durante 90 segundos
1 ciclo	60°C durante 30 minutos
1 ciclo	Remojado a 4°C

## ES 2 338 765 T3

Un microlitro de producto de PCR se combinó con 1  $\mu$ l de Internal Lane Standard (DG2611, Promega Corporation, Madison, WI) y 24  $\mu$ l de formamida desionizada. Las muestras fueron desnaturalizadas por calentamiento a 95°C durante 3 minutos y se refrigeraron con hielo durante 3 minutos. La separación y detección de los fragmentos amplificados se realizó en un ABI PRISM 310 Genetic Analyzer siguiendo el protocolo estándar recomendado en el Manual del Usuario con los siguientes valores:

10	Módulo de ejecución:	GS STR POP4 (filtro de serie A)
	Tiempo de inyección:	4 segundos
	Voltaje de inyección:	15 kV
15	Tensión de ejecución:	15 kV
	Temperatura de ejecución:	60°C
20	Tiempo de ejecución:	24 minutos

La identificación del tamaño normal de amplificación de alelos se llevó a cabo mediante el examen del electroferograma adecuado del ABI PRISM 310 Genetic Analyzer y la determinación de los picos predominantes en cada locus. Estos resultados se muestran en la Figura 15. Uno o dos picos o alelos estaban presentes en cada locus en muestras normales, dependiendo de si la persona era homocigoto o heterocigoto para un marcador particular.

### 30 Ejemplo 10

#### *Análisis de Sistemas de Multiplexado de MSI en muestras de pacientes*

Los patrones de alelos o genotipos para parejas de los tejidos normales y tumorales de un mismo individuo fueron examinados utilizando los loci de multiplexado que se describen en el Ejemplo 8, anterior. La amplificación simultánea de los nueve loci de microsatélites seleccionados seguida de la separación de los productos en un ABI 310 CE mostró todos los productos esperados.

El protocolo para el ensayo de multiplexado de MSI y el perfil de ciclo de las muestras del paciente se llevaron a cabo exactamente como en el ejemplo 9, anterior. La identificación de los tamaños de amplificación de los alelos normales y tumorales fue realizada en el electroferograma del ABI PRISM 310 Genetic Analyzer y la determinación de los picos predominantes en cada locus.

Los resultados típicos de los ejemplos de tejidos emparejados se muestran en la Figura 16. Uno o dos alelos estaban presentes en cada locus en las muestras normales, dependiendo de si la persona era homocigoto o heterocigoto para un marcador particular. Los patrones de alelos de los pares de genotipos normales y tumorales fueron comparados y se calificó como MSI positivo si uno o más alelos diferentes están presentes en las muestras tumorales de ADN que no fueron encontrados en una muestra normal de la misma persona.

Aunque la presente invención ha sido descrita y ejemplificada con cierta especificidad, los expertos en la materia apreciarán diversas modificaciones, incluyendo variaciones, adiciones y omisiones que pueden ser realizadas en lo que se ha descrito. En consecuencia, se pretende que estas modificaciones también estén cubiertas por la presente invención y que el alcance de la presente invención se limite únicamente por la interpretación más amplia que legalmente se puede conceder según las reivindicaciones adjuntas.

### Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

### Documentos de patente citados en la descripción

- 65 • US 84136601 A [0001]
- US 66302000 A [0001]

- US 4683195 A [0030]

- US 4683202 A [0030]

5 **Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción**

- **Aaltonen et al.** *Science*, 1993, vol. 260, 812-815 [0005]

- **Thibodeau et al.** *Science*, 1993, vol. 260, 816-819 [0005]

10

- **Peltomaki et al.** *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 5853-5855 [0005]

- **Ionov et al.** *Nature*, 1993, vol. 363, 558-561 [0005] [0006]

15

- **Fishel et al.** *Cell*, 1993, vol. 75, 1027-38 [0005] [0007]

- **Leach et al.** *Cell*, 1993, vol. 75, 215-25 [0005] [0007]

- **Bronner et al.** *Nature*, 1994, vol. 368, 258-61 [0005] [0007]

20

- **Nicolaides et al.** *Nature*, 1994, vol. 371, 75-80 [0005] [0007]

- **Miyaki et al.** *Nat Genetics*, 1997, vol. 17, 271-2 [0005] [0007]

25

- **Liu et al.** *Nature Med*, 1996, vol. 2, 169-174 [0006]

- **Aaltonen et al.** *Science*, 1993, vol. 260, 812-816 [0006]

- **Lothe et al.** *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 5849-5852 [0006]

30

- **Han et al.** *Cancer Res*, 1993, vol. 53, 5087-5089 [0006]

- **Peltomaki et al.** *Cancer Res*, 1993, vol. 53, 5853-5855 [0006]

35

- **Mironov et al.** *Cancer Res*, 1994, vol. 54, 41-44 [0006]

- **Rhyu et al.** *Oncogene*, 1994, vol. 9, 29-32 [0006]

- **Chong et al.** *Cancer Res*, 1994, vol. 54, 4595-4597 [0006]

40

- **Gao et al.** *Oncogene*, 1994, vol. 9, 2999-3003 [0006]

- **Risinger et al.** *Cancer Res*, 1993, vol. 53, 5100-5103 [0006]

45

- **Patel et al.** *Oncogene*, 1994, vol. 9, 3695-3700 [0006]

- **Leach et al.** *Cell*, 1993, vol. 75, 1215-1225 [0007]

- **Papadopoulos et al.** *Science*, 1994, vol. 263, 1625-1629 [0007]

50

- **Kolodner et al.** *Cancer Research*, 1999, vol. 59, 5068-5074 [0007] [0043]

- **Peltomaki et al.** *Gastroenterology*, 1997, vol. 113, 1146-1158 [0007]

55

- **Liu et al.** *Nat Med*, 1996, vol. 2, 169-174 [0007]

- **Sia et al.** *Molecular and Cellular Biology*, 1997, vol. 17, 2851-2858 [0008]

- **Planck et al.** *Genes, Chromosomes & Cancer*, 2000, vol. 29, 33-39 [0008]

60

- **Yamamoto et al.** *Cancer Research*, 1998, vol. 58, 997-1003 [0008]

- **Grady et al.** *Cancer Research*, 1999, vol. 59, 320-324 [0008]

65

- **Markowitz et al.** *Science*, 1995, vol. 268, 1336-1338 [0008]

- **Parsons et al.** *Cancer Research*, 1995, vol. 55, 5548-5550 [0008]

## ES 2 338 765 T3

- **Bertario et al.** *International J Cancer*, 1999, vol. 80, 83-7 [0009]
- **Terdiman et al.** *The American Journal of Gastroenterology*, 1999, vol. 94, 23544-23560 [0010]
- 5 • **Leon et al.** *Cancer Res*, 1977, vol. 37, 646-650 [0011]
- **Stroun et al.** *Oncology*, 1989, vol. 46, 318-322 [0011]
- **Hibi et al.** *Cancer Research*, 1998, vol. 58, 1405-1407 [0011]
- 10 • **Chen et al.** *Clinical Cancer Research*, 1999, vol. 5, 2297-2303 [0011]
- **Kopreski et al.** *Clinical Cancer Research*, 1999, vol. 5, 1961-1965 [0011]
- 15 • **Fujiwara et al.** *Cancer Research*, 1999, vol. 59, 1567-1571 [0011]
- **Chen et al.** *Nature Medicine*, 1996, vol. 2, 1033-1034 [0011]
- **Goessl et al.** *Cancer Research*, 1998, vol. 58, 4728-4732 [0011]
- 20 • **Miozzo et al.** *Cancer Research*, 1996, vol. 56, 2285-2288 [0011]
- **Vasioukhin et al.** *Br. J Haematol*, 1994, vol. 86, 774-779 [0012]
- 25 • **Sorenson et al.** *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 1994, vol. 3, 67-71 [0012]
- **Sorenson et al.** *Clinical Cancer Research*, 2000, vol. 6, 2129-2137 [0012]
- **Anker et al.** *Gastroenterology*, 1997, vol. 112, 1114-1120 [0012]
- 30 • **Nawroz et al.** *Nature Med*, 1996, vol. 2, 1035-1037[0012]
- **Chen et al.** *Nature Med*, 1996, vol. 2, 1033-1035 [0012]
- 35 • **Hibi, K. et al.** *Cancer Research*, 1998, vol. 58, 1405-1407 [0012]
- **Ghoussein et al.** *Clinical Cancer Research*, 1999, vol. 5, 1950-1960 [0013]
- **Boland.** *Cancer Research*, 1998, vol. 58, 5248-5257 [0015] [0030] [0042]
- 40 • **Gonzalez-Zulueta et al.** *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 28-30 [0015]
- **Mao et al.** *PNAS*, 1996, vol. 91, 9871-9875 [0015]
- 45 • **Bacher; Schumm.** *Profiles in DNA*, 1998, vol. 2, 3-6 [0018]
- **Perucho.** *Cancer Research*, 1999, vol. 59, 249-256 [0018]
- **Micka et al.** *Journal of Forensic Sciences*, 1999, vol. 44, 1-15 [0018]
- 50 • **Schumm, James W. et al.** *Proceedings: American Academy of Forensic Sciences*, 14 February 1998, vol. B88, 53 [0019]
- 55 • **Gibson, Sandra D. et al.** *PROCEEDING: AMERICAN ACADEMY OF FORENSIC SCIENCES*, vol. B89, 53 [0019]
- **Lazaruk, Katherine et al.** *PROCEEDING: AMERICAN ACADEMY OF FORENSIC SCIENCES*, vol. B83, 51 [0019]
- 60 • **Sparkes, R. et al.** *Int J Legal Med*, 1996, vol. 109, 186-194 [0019]
- **Saiki, R. K. et al.** *Science*, 1985, vol. 230, 1350-1354 [0030]
- **Walker, G. T. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 1992, vol. 89, 392-396 [0030]
- 65 • **Wu et al.** *Am J Hum Genetics*, 1999, vol. 65, 1291-1298 [0030] [0043]
- **Frazer et al.** *Oncology Research*, 1999, vol. 6, 497-505 [0030]

## ES 2 338 765 T3

- **Hoang et al.** *Cancer Research*, 1997, vol. 57, 300-303 [0031] [0035]
- **Zhou et al.** *Genes, Chromosomes & Cancer*, 1998, vol. 21, 101-107 [0035]
- 5 • **Boland et al.** *Cancer Research*, 1998, vol. 58, 5248-5257 [0035]
- **Dietmaier et al.** *Cancer Research*, 1997, vol. 57, 4749-4756 [0035]
- 10 • **Thibodeau et al.** *Science*, 1993, vol. 260, 816-8 [0043]
- **Wijnen et al.** *Nature Genetics*, 1999, vol. 23, 142-144 [0043]
- **Bacher; Schumm.** *Profiles in DNA*, 1998, vol. 2 (2), 3-6 [0052]
- 15 • **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. *Cold Springs Harbor Press*, 1989 [0061]
- **Altschul et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 402-410 [0068]
- 20 • **Thibodeau et al.** *Cancer Research*, vol. 58, 1713-1718 [0074]

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 338 765 T3

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de análisis de loci de microsatélites, que comprende las etapas de:

5 a) proporcionar cebadores para la co-amplificación de un conjunto de al menos nueve loci de microsatélites de ADN genómico humano, que comprende BAT-25, BAT-26, MONO-15, BAT-40, D3S2432, D7S3046, D7S3070, D7S1808 y D10S1426;

10 b) co-amplificar el conjunto de loci de al menos una muestra de ADN genómico de una reacción de amplificación de multiplexado, utilizando los cebadores, produciendo así fragmentos de ADN amplificados; y

c) determinar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados.

15 2. Procedimiento de detección de inestabilidad de microsatélites en ADN genómico, que comprende las etapas de:

20 a) proporcionar cebadores para la co-amplificación de un conjunto de al menos nueve loci de microsatélites de ADN genómico humano, que comprende BAT-25, BAT-26, MONO-15, BAT-40, D3S2432, D7S3046, D7S3070, D7S1808, y D10S1426;

25 b) co-amplificar el conjunto de loci de una primera muestra de ADN genómico procedente de material biológico normal no canceroso de una persona y de una segunda muestra de ADN genómico procedente de un segundo material biológico de la persona, en reacciones de amplificación de multiplexado separadas, utilizando al menos un cebador de oligonucleótido para cada uno de los loci de microsatélites, produciendo así unos primeros fragmentos de ADN amplificados a partir de la primera muestra y unos segundos fragmentos de ADN amplificados a partir de la segunda muestra; y

30 c) comparar el tamaño de los primeros fragmentos de ADN amplificado con el tamaño de los segundos fragmentos de ADN amplificados para detectar la inestabilidad en cualquiera de los loci del segundo ADN genómico.

35 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que al menos uno de los cebadores proporcionados en la etapa (a) tiene una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de secuencias de cebadores identificadas por: SEQ ID NO: 1 a 68.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el conjunto de loci se co-amplifica utilizando al menos un cebador para cada locus seleccionado del grupo que consiste en:

40 SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 60, cuando el locus es BAT-25,

SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62, cuando el locus es BAT-26,

SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66, cuando el locus es BAT-40,

45 SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68, cuando el locus es MONO-15,

SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 59, cuando el locus es D3S2432,

50 SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52, cuando el locus es D7S 1808,

SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54, cuando el locus es D7S3070,

SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 64, cuando el locus es D7S3046, y

55 SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, cuando el locus es D10S1426.

5. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el conjunto de loci se co-amplifica en la etapa (b) utilizando al menos un cebador de oligonucleótido para cada locus que se marca de manera fluorescente.

60 6. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el al menos una muestra de ADN genómico comprende una primera muestra de ADN genómico procedente de material biológico normal no canceroso de una persona y una segunda muestra de ADN genómico procedente de un tumor de la persona, comprendiendo también el procedimiento:

65 detectar la inestabilidad de microsatélites mediante la comparación del tamaño de los fragmentos de ADN amplificados producidos a partir de la co-amplificación de la primera muestra de ADN genómico en el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados producidos a partir de co-amplificación de la segunda muestra de ADN genómico.

## ES 2 338 765 T3

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que los resultados de la inestabilidad de microsatélites se utilizan en el pronóstico del tumor.
8. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que los resultados de la inestabilidad de microsatélites se utilizan en el diagnóstico de un tumor de predisposición familiar.
9. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que los resultados de la inestabilidad de microsatélites se utilizan para detectar tumores cancerosos del sistema gastrointestinal y del endometrio.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que los tumores cancerosos son tumores de un cáncer colorrectal.
11. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la segunda muestra de material biológico se selecciona del grupo formado por: tejido tumoral, células diseminadas, heces, células sanguíneas, plasma sanguíneo, suero, ganglios linfáticos, orina y otros fluidos corporales.
12. Equipo para el análisis de loci de microsatélites de ADN genómico humano, que comprende:  
cebadores de oligonucleótido para la co-amplificación de un conjunto de al menos nueve loci de microsatélites de ADN genómico humano, comprendiendo el conjunto BAT-25, BAT-26, MONO-15, BAT-40, D3S2432, D7S3046, D7S3070, D7S1808, y D10S1426.
13. Equipo según la reivindicación 12, en el que al menos uno de los cebadores de oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en:  
SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 60, cuando el locus es BAT-25,  
SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62, cuando el locus es BAT-26,  
SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66, cuando el locus es BAT-40,  
SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68, cuando el locus es MONO-15,  
SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 59, cuando el locus es D3S2432,  
SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52, cuando el locus es D7S1808,  
SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54, cuando el locus es D7S3070,  
SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 64, cuando el locus es D7S3046, y  
SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, cuando el locus es D10S1426.
14. Equipo según la reivindicación 12, en el que al menos un cebador de oligonucleótido para cada uno de los al menos nueve loci de microsatélites en el conjunto se marca de manera fluorescente.
15. Equipo según la reivindicación 12, en el que el equipo comprende además una polimerasa termoestable.
16. Equipo según la reivindicación 12, en el que el equipo comprende además un primer ADN de control aislado de material biológico normal no canceroso, y el segundo ADN de control de material biológico carece de genes de reparación de errores de emparejamiento.
17. Equipo según la reivindicación 12, en el que la inestabilidad en el conjunto de loci de microsatélites co-amplificados por los cebadores se puede utilizar en el diagnóstico de tumor de pronóstico.
18. Equipo según la reivindicación 12, en el que la inestabilidad en el conjunto de loci de microsatélites co-amplificados por los cebadores se puede utilizar en el diagnóstico de un tumor de predisposición familiar.
19. Equipo según la reivindicación 12, en el que la inestabilidad en el conjunto de loci de microsatélites co-amplificados por los cebadores es una indicación de tumores del sistema gastrointestinal o del endometrio.
20. Equipo según la reivindicación 12, en el que la inestabilidad de microsatélites es un indicio de cáncer colorrectal.

FIG. 1

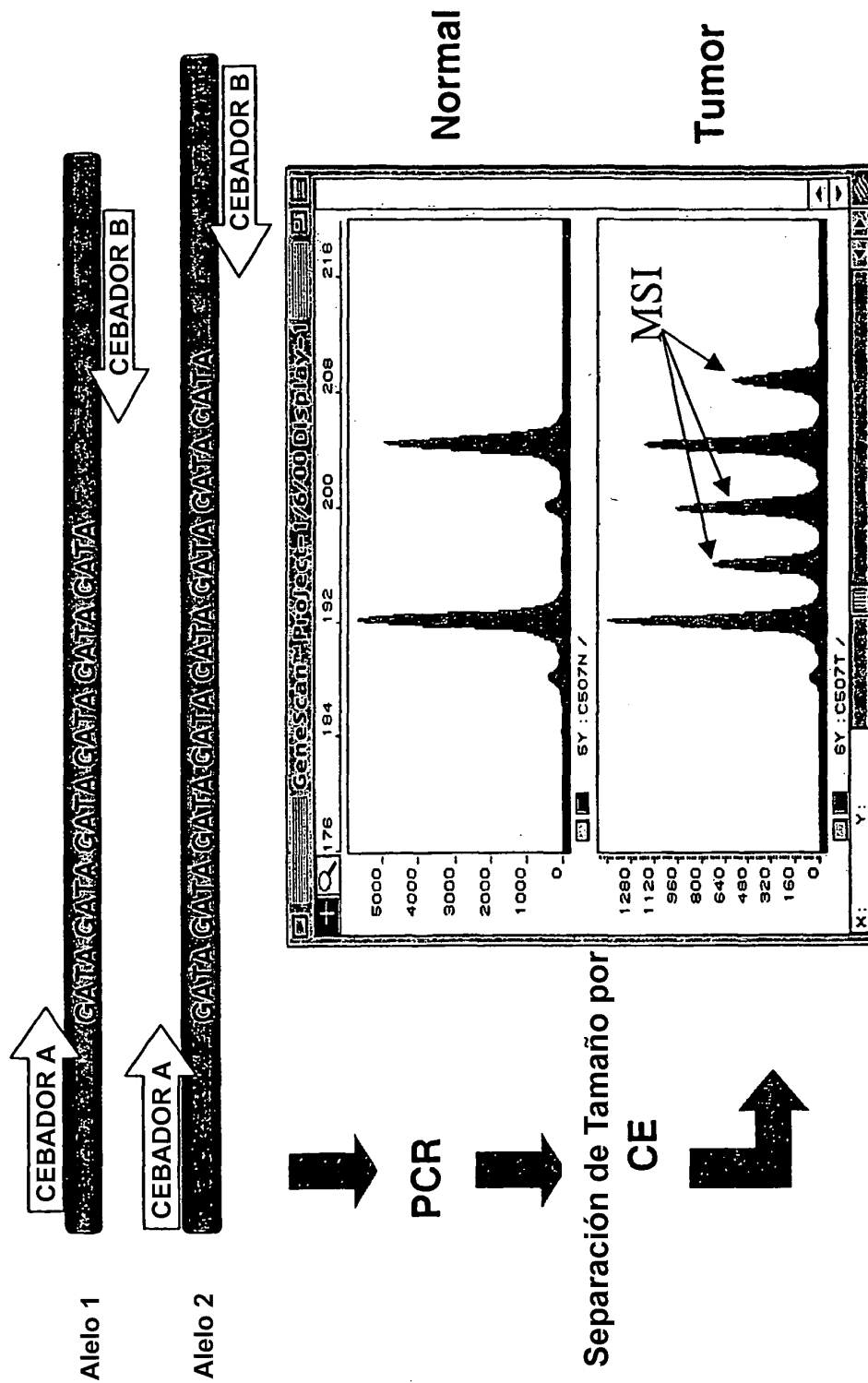
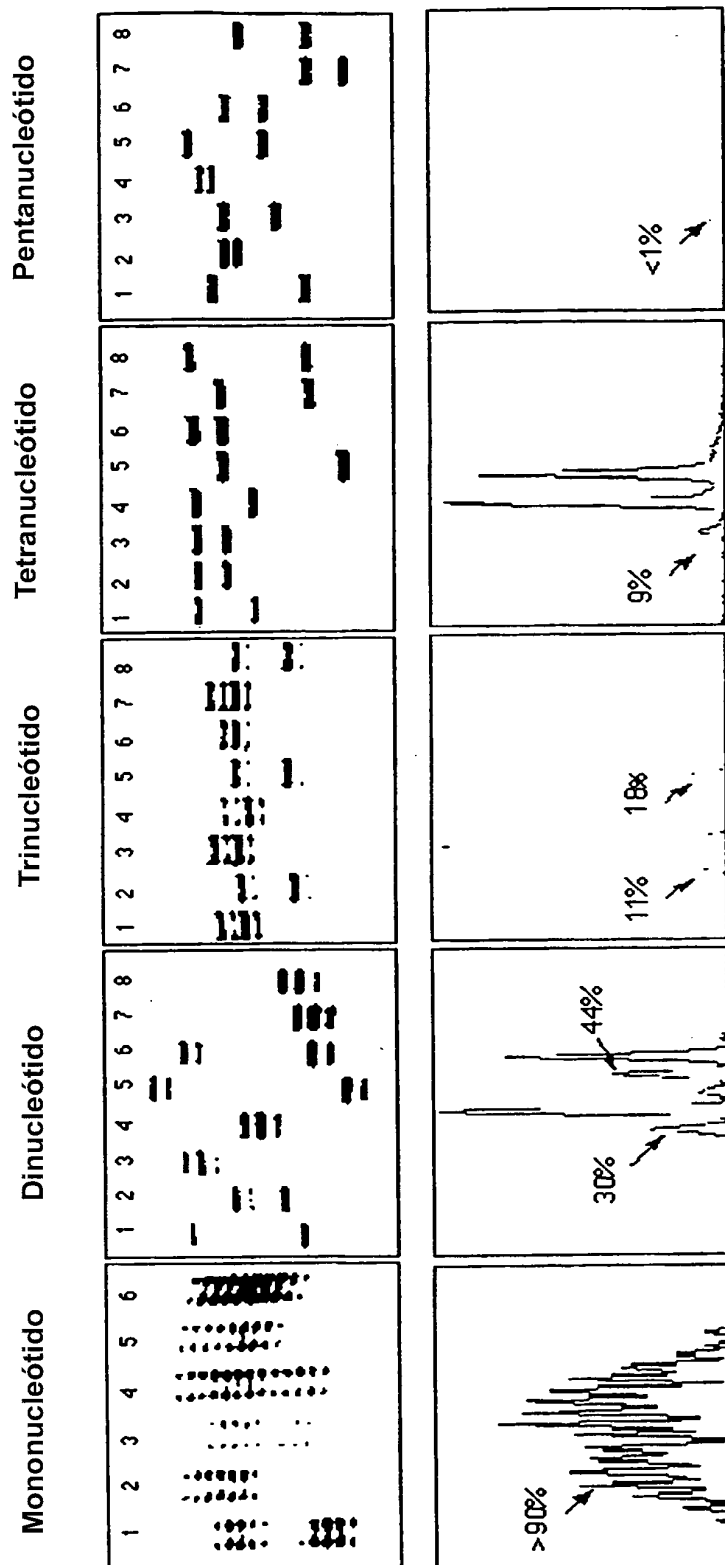


FIG. 2



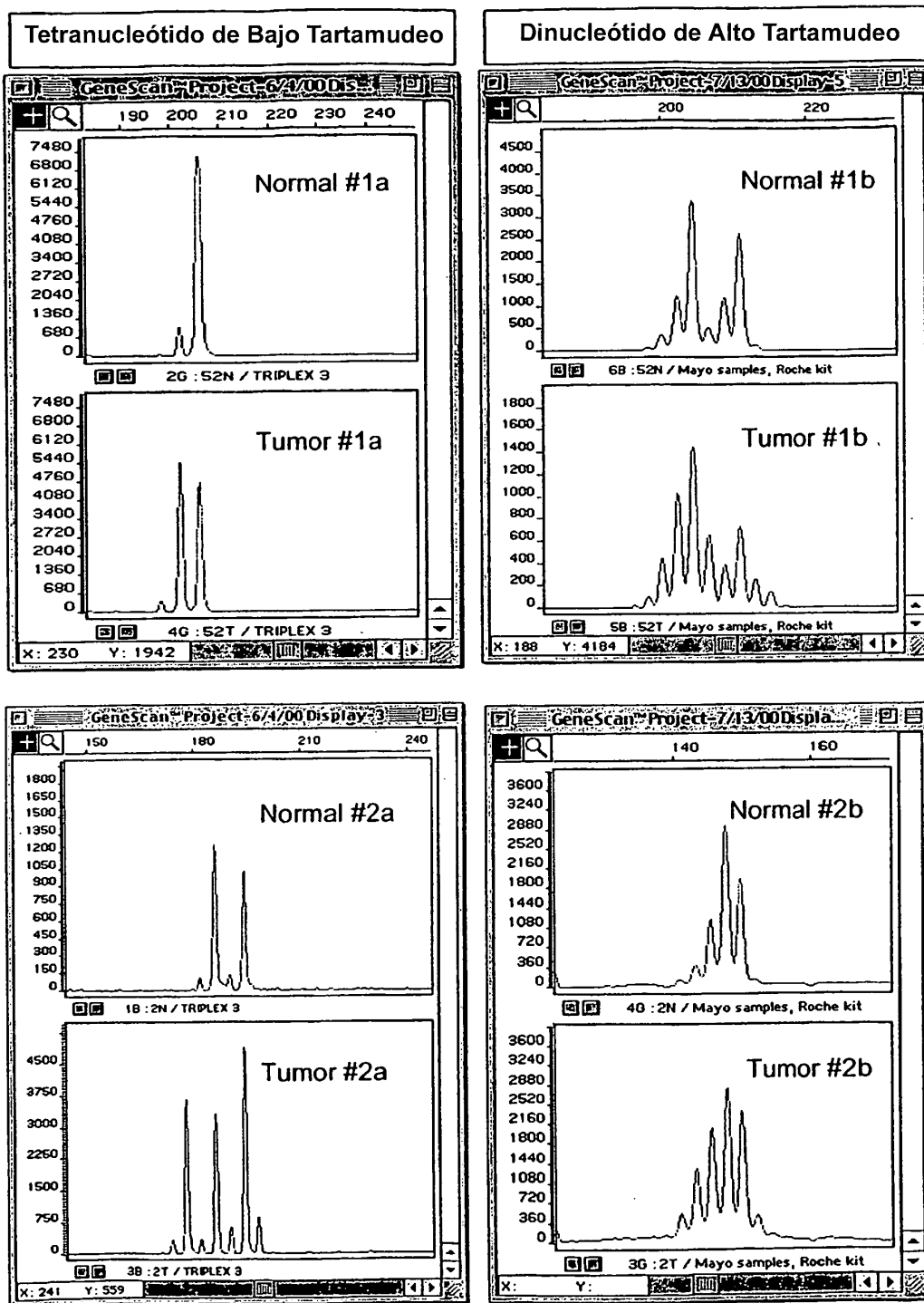


FIG. 3

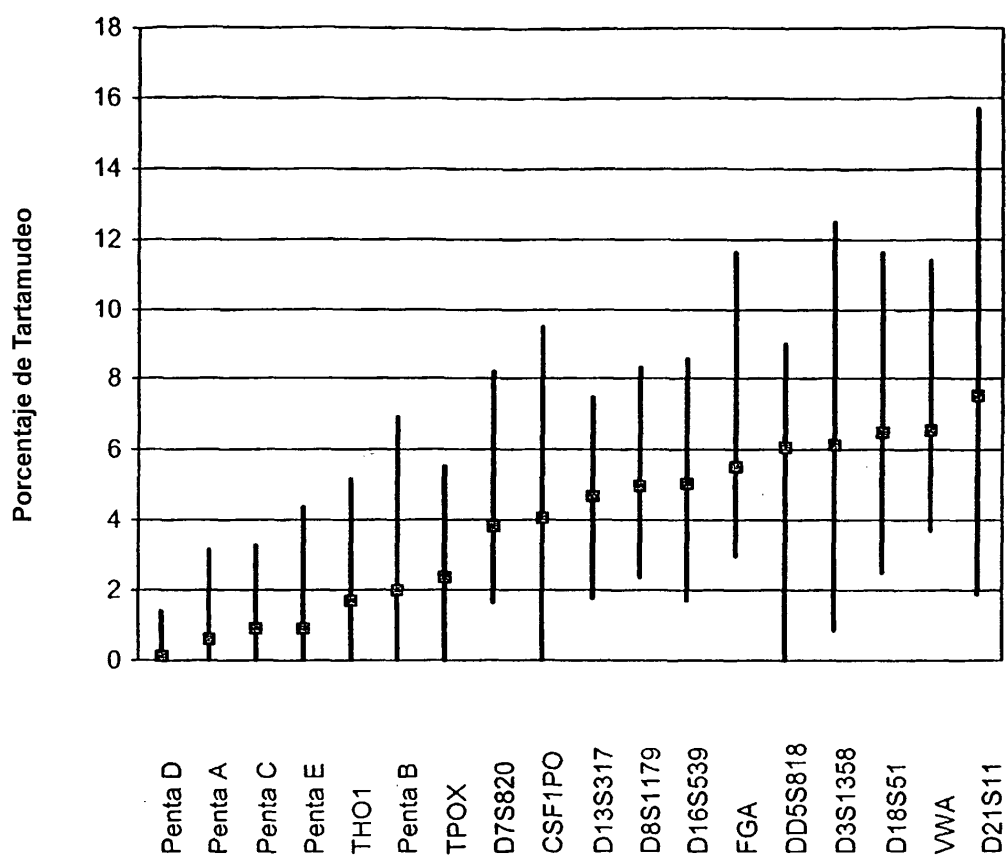


FIG. 4

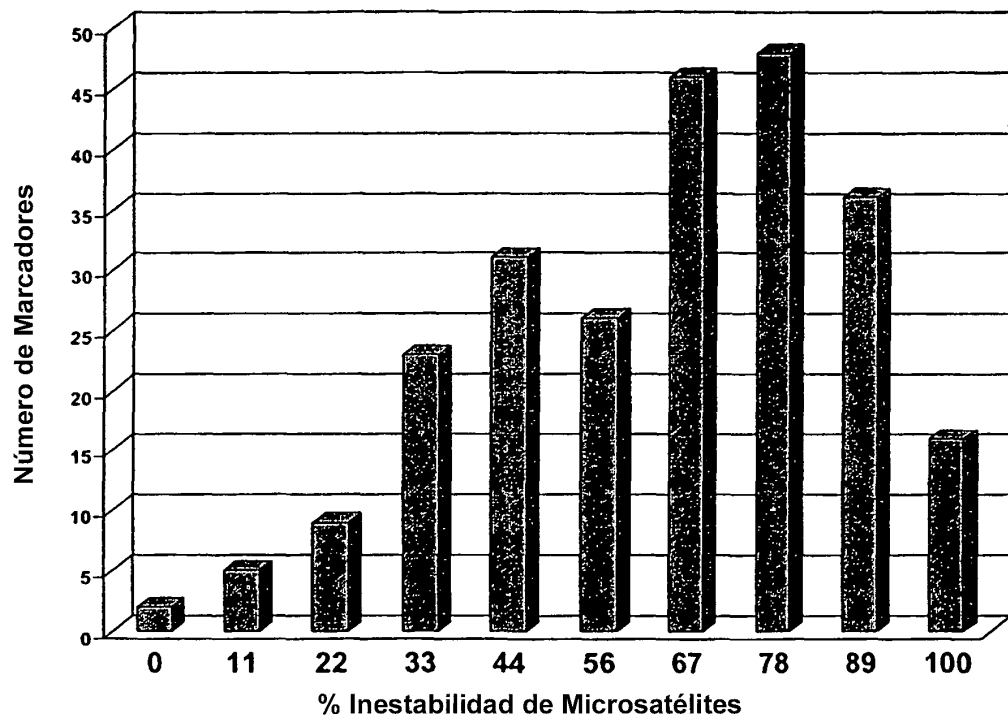


FIG. 5

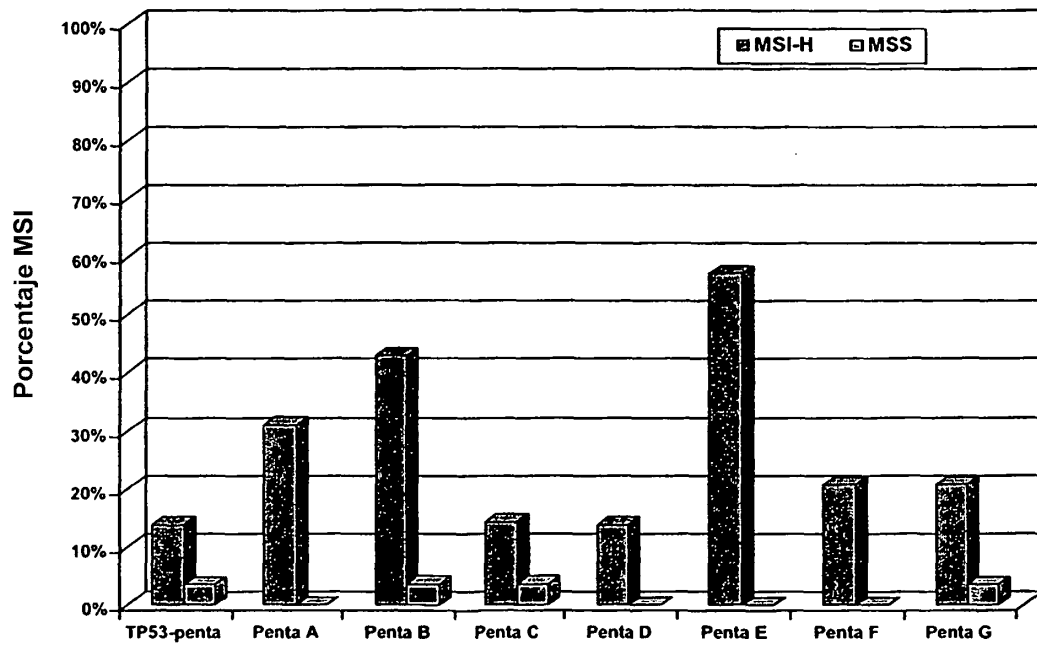


FIG. 6

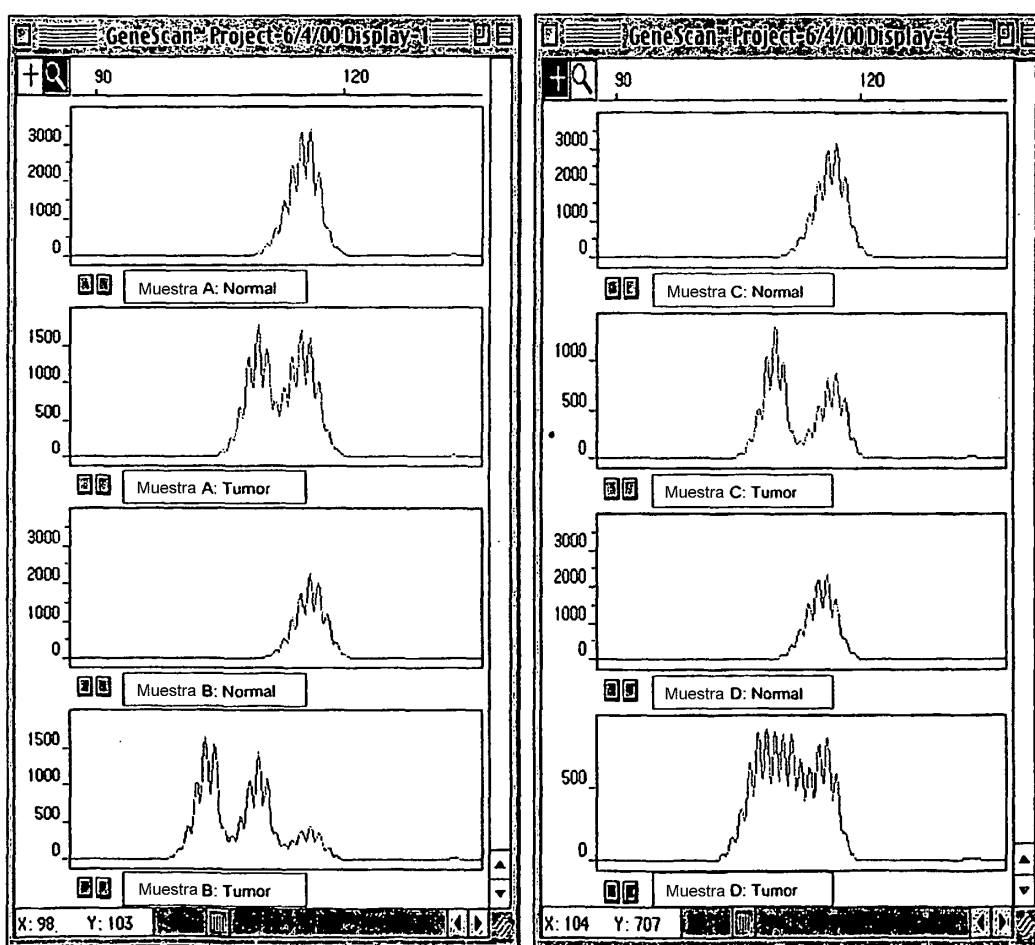


FIG. 7

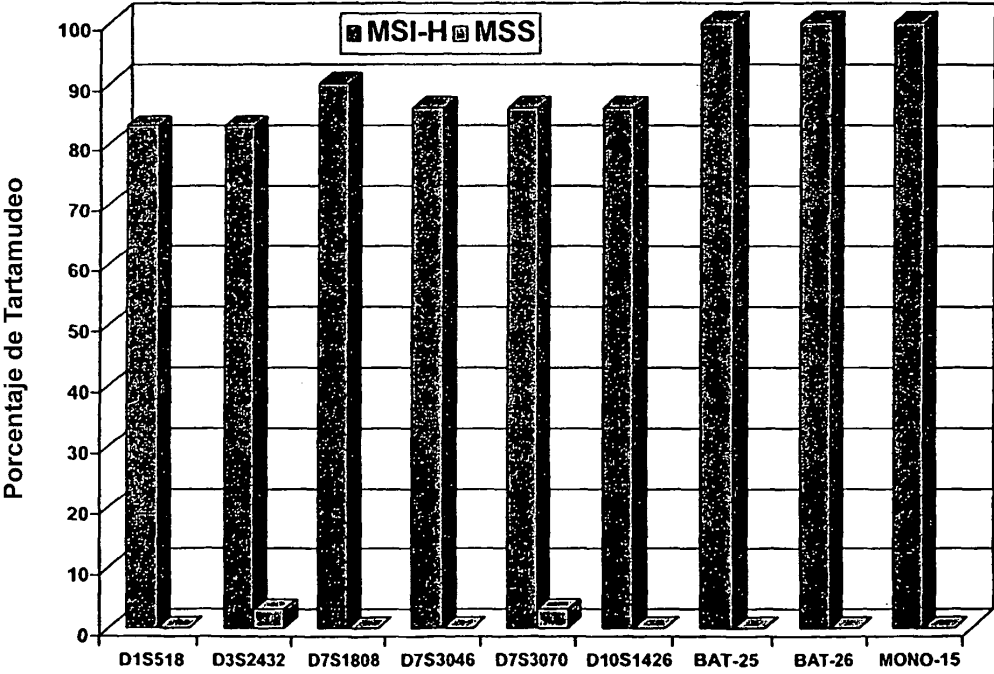


FIG. 8

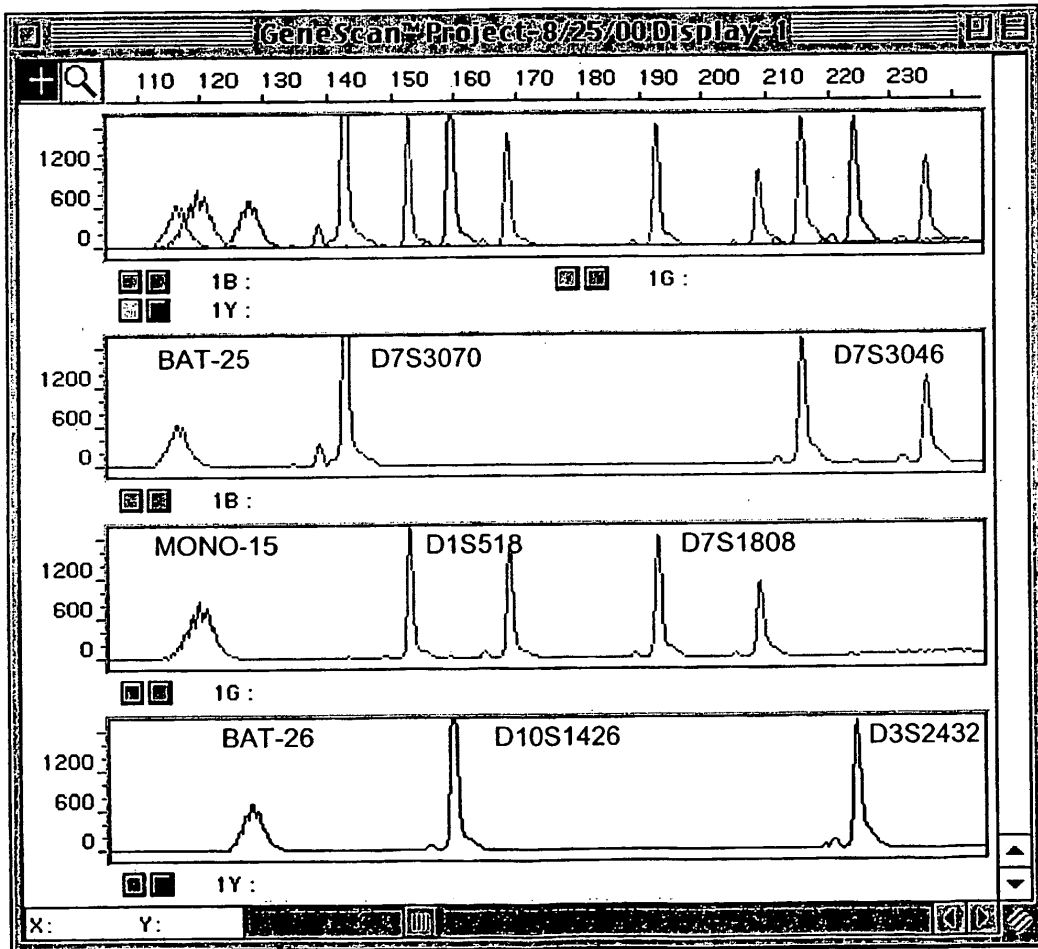


FIG. 9

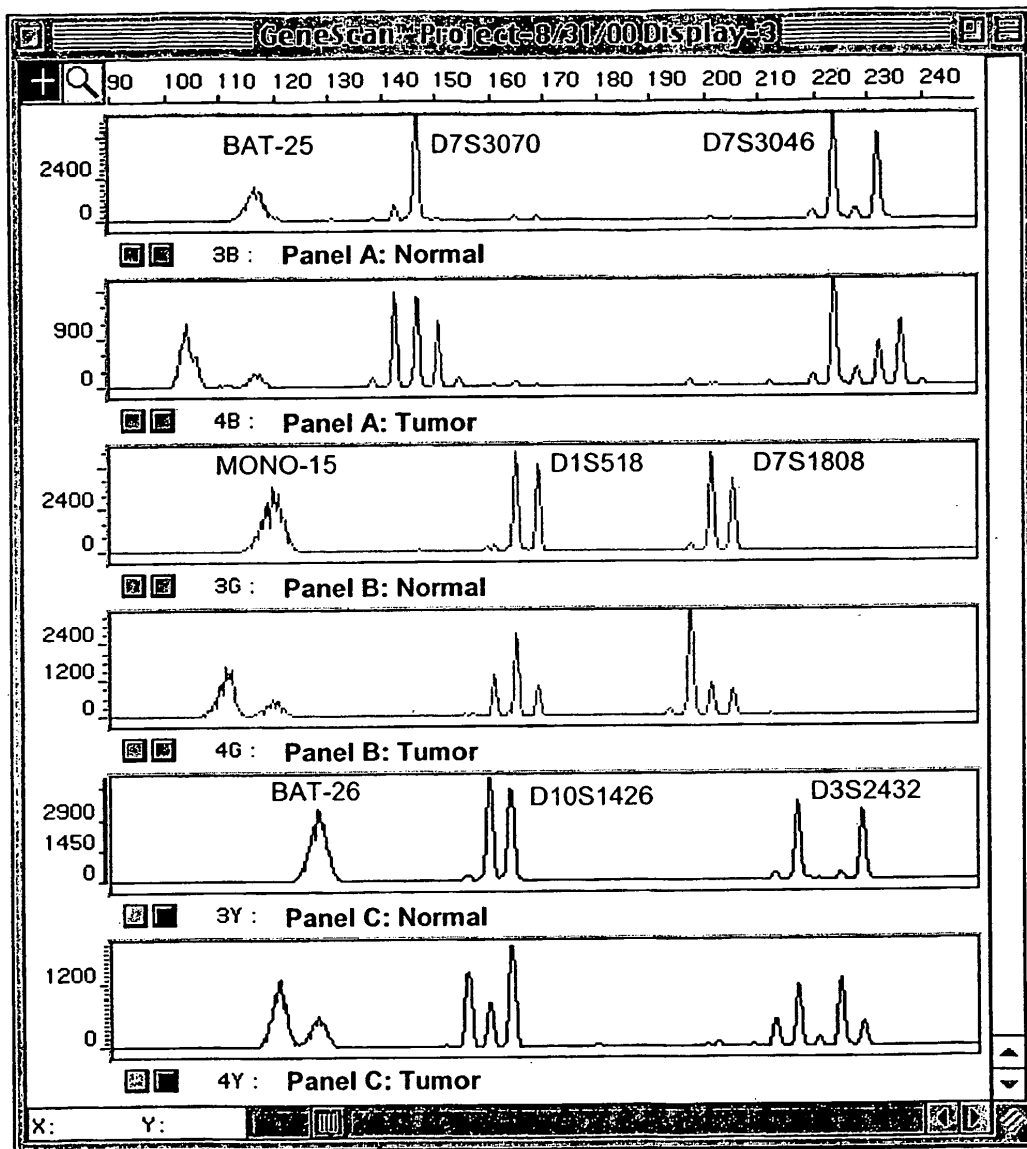


FIG. 10

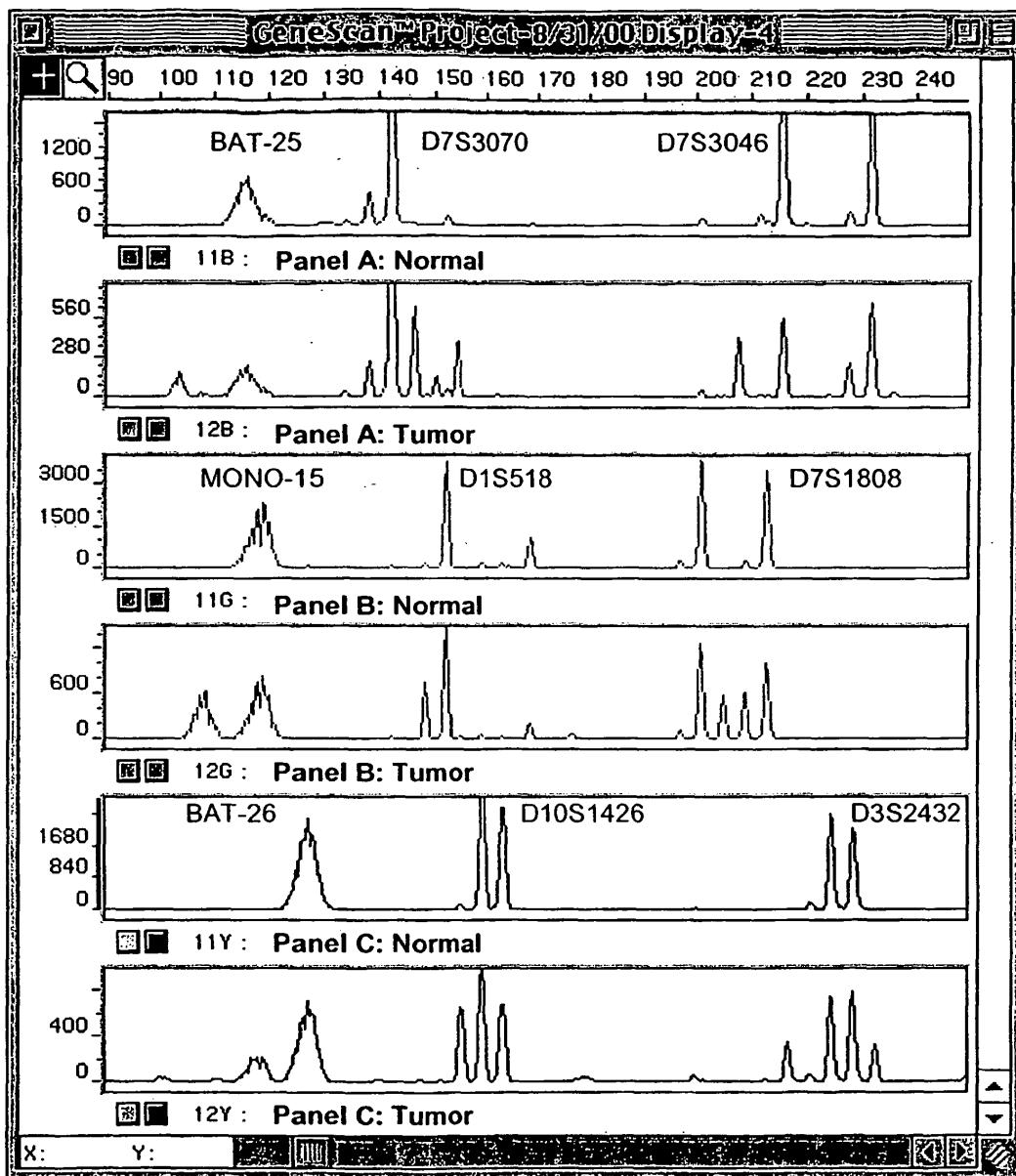


FIG. 11

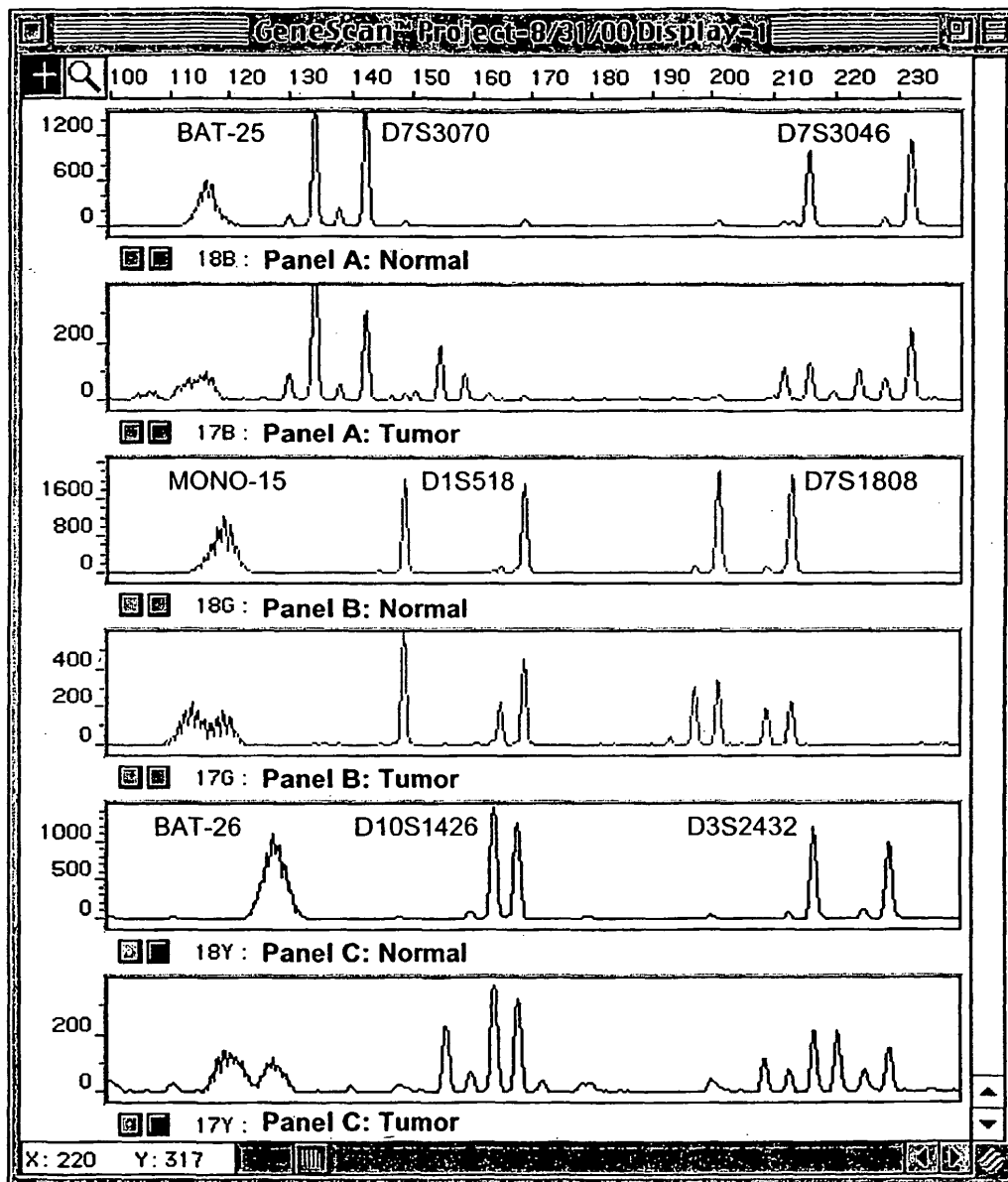


FIG. 12

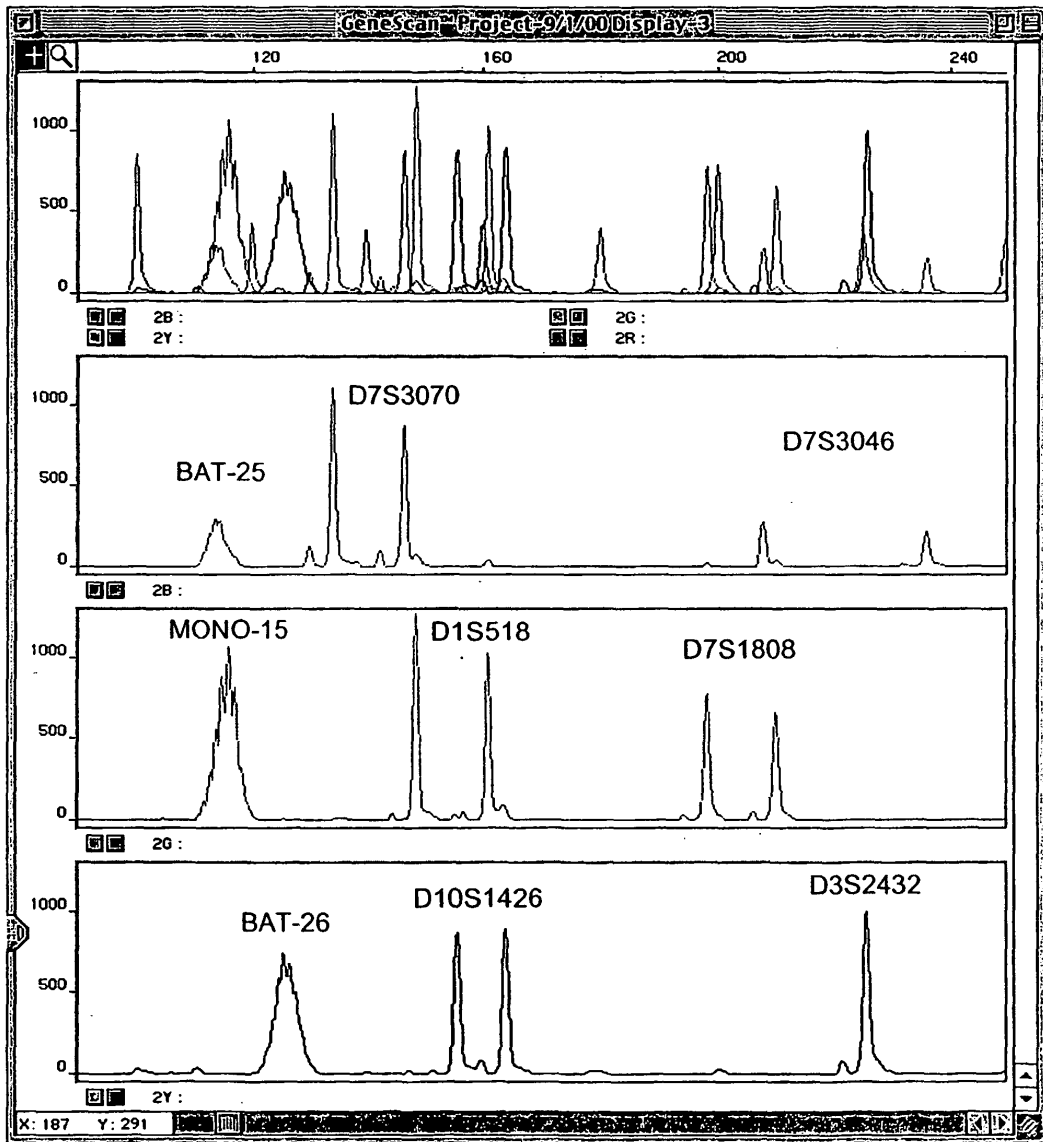
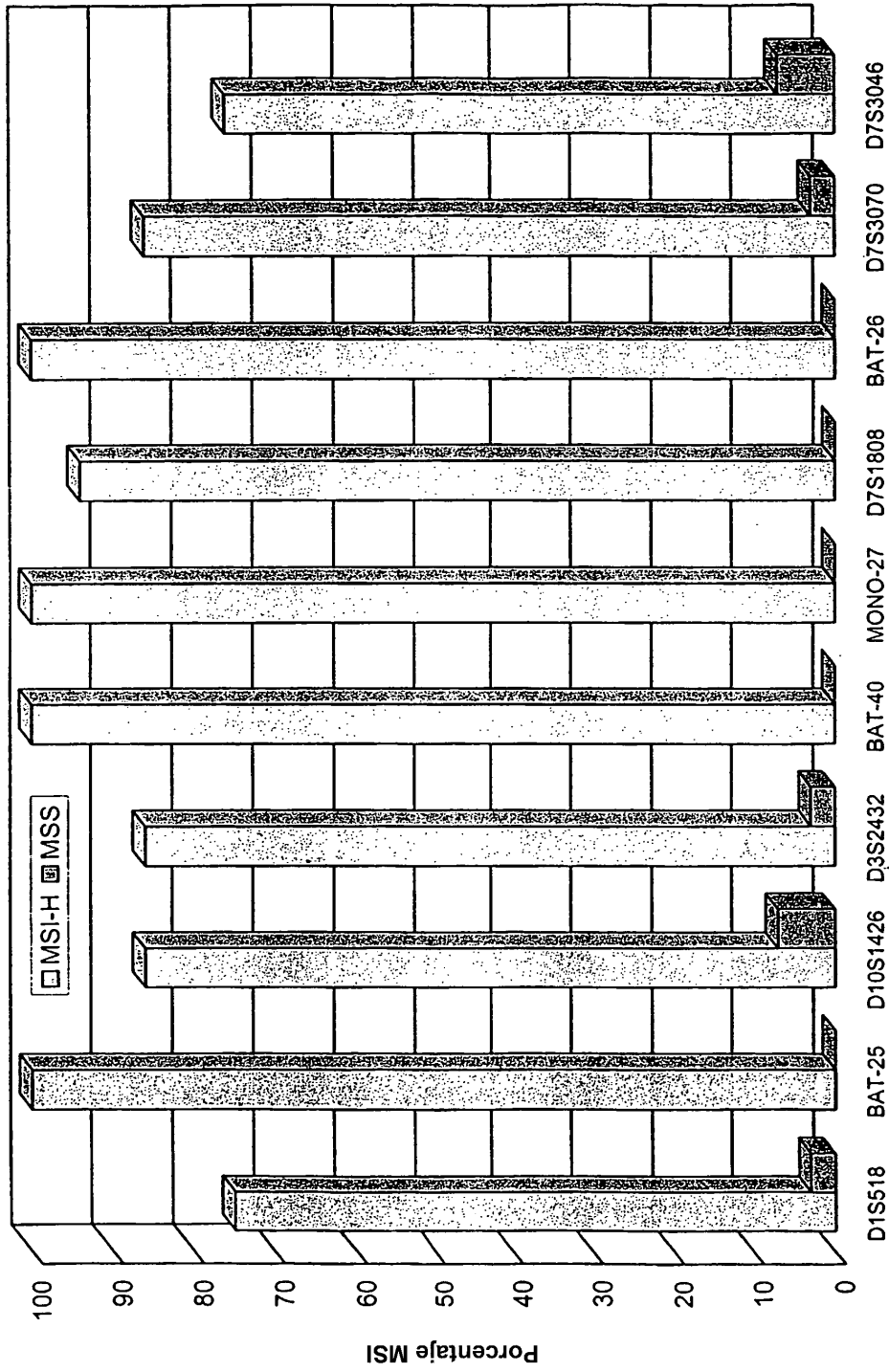


FIG. 13

FIG. 14



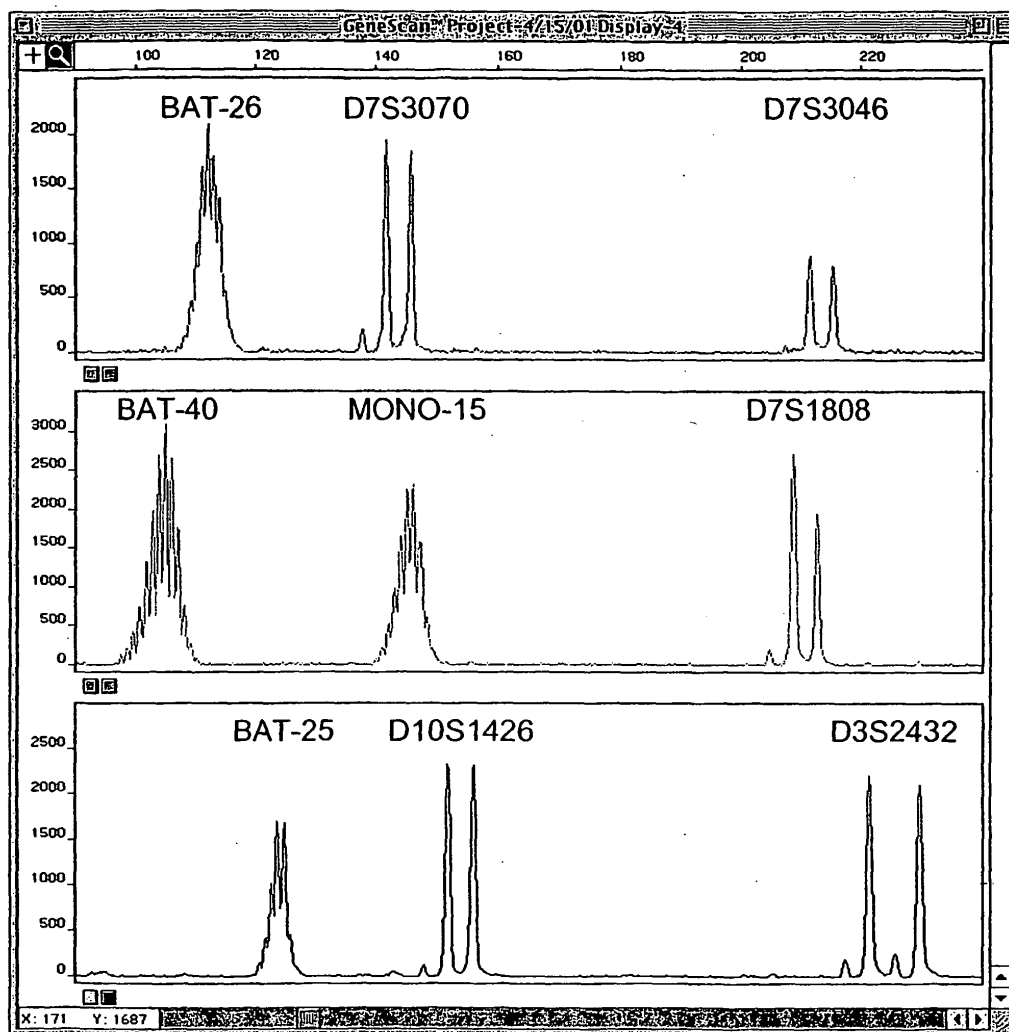


FIG. 15

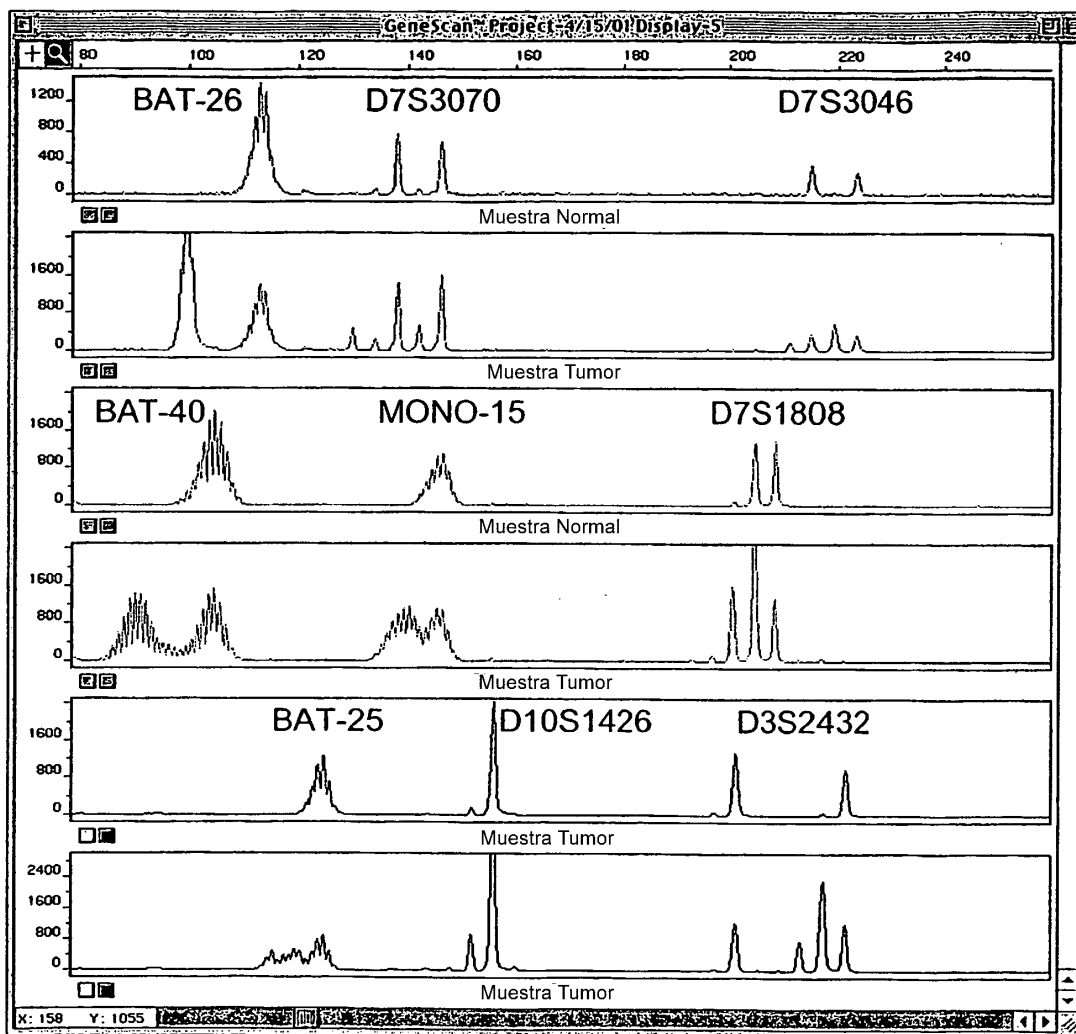


FIG. 16

# ES 2 338 765 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> PROMEGA CORPORATION
- 5 <120> DETECCIÓN DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES Y SU USO EN EL DIAGNÓSTICO DE TUMORES
- <130> 016026-9267
- <140> Desconocido
- 10 <141> 2002-04-24
- <150> 09/841,366
- <151> 2001-04-24
- <160> 68
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 20
- 20 <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <223> Cebador BAT-25
- 25 <400> 1
- gaatgtaagt tcgctccaa 20
- 30 <210> 2
- <211> 21
- <212> ADN
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <223> Cebador BAT-25
- 40 <400> 2
- aactatggct tctgcattt c 21
- 45 <210> 3
- <211> 21
- <212> ADN
- 50 <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <223> Cebador BAT-26
- 55 <400> 3
- c tgacttcagc tgactactt 21
- 60 <210> 4
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- 65 <220>
- <223> Cebador BAT-26

## ES 2 338 765 T3

	<400> 4	
	aaccattcaa cattttaac cc	22
5	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<223> Cebador MONO-11	
15	<400> 5	
	gagctgtgat tgcactacac	20
20	<210> 6	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<220>	
	<223> Cebador MONO-11	
30	<400> 6	
	actactgtcc ggcataaatt tact	24
35	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<220>	
	<223> Cebador MONO-15	
	<400> 7	
45	tcagatttat ttgggcttc actc	24
	<210> 8	
50	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
55	<223> Cebador MONO-15	
	<400> 8	
60	gcagtgag ggcggagctt	18
	<210> 9	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

## ES 2 338 765 T3

<220>  
<223> Cebador D1S518

5 <400> 9  
tgcagatctt gggacttctc 20

10 <210> 10  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

15 <220>  
<223> Cebador D1S518

20 <400> 10  
aaaaagagtg tgggcaactg 20

25 <210> 11  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

30 <220>  
<223> Cebador D1S547

35 <400> 11  
ctgaagtggg aggattgctt 20

40 <210> 12  
<211> 20  
<212> AND  
<213> *Homo sapiens*

45 <220>  
<223> Cebador D1S547

50 <400> 12  
aattcagggg agttccagag 20

55 <210> 13  
<211> 20  
<212> AND  
<213> *Homo sapiens*

60 <220>  
<223> Cebador D1S1677

65 <400> 13  
agtcagcttg attgaccag 20

<210> 14  
<211> 21

## ES 2 338 765 T3

	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
5	<223> D1S1677 primer	
	<400> 14	
10	cttagtgtga caggaaggac g	21
	<210> 15	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
20	<223> Cebador D2S1790	
	<400> 15	
25	acatgctgat ctcagcgttc	20
	<210> 16	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<223> Cebador D2S1790	
35	<400> 16	
40	ggccaaagca gagttttatt	20
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<223> Cebador D3S2432	
50	<400> 17	
55	ggcaggcagg tagatagaca	20
	<210> 18	
	<211> 23	
	<212> ADN	
60	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<223> Cebador D3S2432	
65	<400> 18	
	acactaaaca agcatagtca ggc	23

## ES 2 338 765 T3

	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> AND	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<223> Cebador D5S818	
10	<400> 19	
	cctctttggt gggtgatttt	20
15	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<223> Cebador D5S818	
25	<400> 20	
	catagccaca tgattccaat	20
30	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<220>	
	<223> Cebador DSS2849	
40	<400> 21	
	ccaatgctta cctggaagaa	20
45	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<220>	
	<223> Cebador DSS2849	
55	<400> 22	
	ttgagcccag aaagtttgag	20
60	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<220>	
	<223> Cebador D6S1053	

## ES 2 338 765 T3

	<400> 23	
	tatttcaaag gcagcaaagc	20
5	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<223> Cebador D6S1053	
15	<400> 24	
	agcctattgt gcttgacagc	20
20	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<220>	
	<223> Cebador D7S1808	
30	<400> 25	
	aaatggggag cagaacaac	20
35	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<220>	
	<223> Cebador D7S1808	
	<400> 26	
45	ccaataaga ctcaggacgc	20
	<210> 27	
50	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
55	<223> Cebador D7S3046	
	<400> 27	
60	acatacggat gaatggatgg	20
	<210> 28	
	<211> 23	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

# ES 2 338 765 T3

<220>  
<223> Cebador D7S3046

5 <400> 28  
tataacctct ctcctatct ccc 23

10 <210> 29  
<211> 20  
<212> AND  
<213> *Homo sapiens*

15 <220>  
<223> Cebador D7S3070

20 <400> 29  
cccccatgag ttattcctct 20

25 <210> 30  
<211> 20  
<212> AND  
<213> *Homo sapiens*

30 <220>  
<223> Cebador D7S3070

35 <400> 30  
ggaagccaaa tgtgaattg 20

40 <210> 31  
<211> 25  
<212> AND  
<213> *Homo sapiens*

45 <220>  
<223> Cebador D8S1179

50 <400> 31  
attcg tcatgtgtac ttttgtatt 25

55 <210> 32  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

60 <220>  
<223> Cebador D8S1179

65 <400> 32  
ttca attagttcat cgtagctata 25

<210> 33  
<211> 20

## ES 2 338 765 T3

	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
	<i>&lt;220&gt;</i>	
5	<i>&lt;223&gt; Cebador D9S2169</i>	
	<i>&lt;400&gt; 33</i>	
10	ttccaaaag ttgcatcta	20
	<i>&lt;210&gt; 34</i>	
	<i>&lt;211&gt; 20</i>	
15	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
	<i>&lt;220&gt;</i>	
20	<i>&lt;223&gt; Cebador D9S2169</i>	
	<i>&lt;400&gt; 34</i>	
25	gttatgcaag agcccaaat	20
	<i>&lt;210&gt; 35</i>	
	<i>&lt;211&gt; 20</i>	
30	<i>&lt;212&gt; AND</i>	
	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
	<i>&lt;220&gt;</i>	
	<i>&lt;223&gt; Cebador D10S1426</i>	
35	<i>&lt;400&gt; 35</i>	
40	catcctcttt ttggtggtg	20
	<i>&lt;210&gt; 36</i>	
	<i>&lt;211&gt; 20</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
45	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
	<i>&lt;220&gt;</i>	
	<i>&lt;223&gt; Cebador D10S1426</i>	
50	<i>&lt;400&gt; 36</i>	
55	ctcttaactg attggccga	20
	<i>&lt;210&gt; 37</i>	
	<i>&lt;211&gt; 20</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
60	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
	<i>&lt;220&gt;</i>	
	<i>&lt;223&gt; Cebador D1082470</i>	
65	<i>&lt;400&gt; 37</i>	
	cctcaagctt cctcctagct	20

## ES 2 338 765 T3

	<210> 38	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<223> Cebador D1082470	
10	<400> 38	
	ttcctgtggt caggacagat	20
15	<210> 39	
	<211> 20	
	<212> AND	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<223> Cebador D12S391	
25	<400> 39	
	atggatgcat aacaggatca	20
30	<210> 40	
	<211> 20	
	<212> AND	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<220>	
	<223> Cebador D12S391	
40	<400> 40	
	tggctttag acctggactg	20
45	<210> 41	
	<211> 20	
	<212> AND	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<220>	
	<223> Cebador D17S1294	
55	<400> 41	
	tggcatgcaa ttgtagtctc	20
60	<210> 42	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<220>	
	<223> Cebador D17S1294	

## ES 2 338 765 T3

	<code>&lt;400&gt; 42</code>			
		<code>actaagttga ttcttcctt gaacg</code>		25
5	<code>&lt;210&gt; 43</code>			
	<code>&lt;211&gt; 20</code>			
	<code>&lt;212&gt; ADN</code>			
10	<code>&lt;213&gt; <i>Homo sapiens</i></code>			
	<code>&lt;220&gt;</code>			
	<code>&lt;223&gt; Cebador D17S1299</code>			
15	<code>&lt;400&gt; 43</code>			
		<code>tagcacttga gcacacatgg</code>		20
20	<code>&lt;210&gt; 44</code>			
	<code>&lt;211&gt; 20</code>			
	<code>&lt;212&gt; ADN</code>			
	<code>&lt;213&gt; <i>Homo sapiens</i></code>			
25	<code>&lt;220&gt;</code>			
	<code>&lt;223&gt; Cebador D17S1299</code>			
30	<code>&lt;400&gt; 44</code>			
		<code>gtgcattatg gggaccatta</code>		20
35	<code>&lt;210&gt; 45</code>			
	<code>&lt;211&gt; 20</code>			
	<code>&lt;212&gt; AND</code>			
	<code>&lt;213&gt; <i>Homo sapiens</i></code>			
40	<code>&lt;220&gt;</code>			
	<code>&lt;223&gt; Cebador D18S51</code>			
45	<code>&lt;400&gt; 45</code>			
		<code>catgccactg gagccatgtt</code>		20
50	<code>&lt;210&gt; 46</code>			
	<code>&lt;211&gt; 20</code>			
	<code>&lt;212&gt; ADN</code>			
	<code>&lt;213&gt; <i>Homo sapiens</i></code>			
55	<code>&lt;220&gt;</code>			
	<code>&lt;223&gt; Cebador D18S51</code>			
60	<code>&lt;400&gt; 46</code>			
		<code>caaaccggac taccagcaac</code>		20
65	<code>&lt;210&gt; 47</code>			
	<code>&lt;211&gt; 21</code>			
	<code>&lt;212&gt; ADN</code>			
	<code>&lt;213&gt; <i>Homo sapiens</i></code>			

## ES 2 338 765 T3

<220>  
 <223> Cebador FGA

5 <400> 47  
     tgaactcaca ccataggtt g 21

10 <210> 48  
     <211> 20  
     <212> ADN  
     <213> *Homo sapiens*

15 <220>  
     <223> Cebador FGA

    <400> 48

20  
     cttctcagat cctctgacac 20

    <210> 49

25 <211> 25  
     <212> ADN  
     <213> *Homo sapiens*

30 <220>  
     <223> Cebador D1S518

    <400> 49

35  
     ttata tgtataaaa gtcaattcct 25

    <210> 50

40 <211> 24  
     <212> AND  
     <213> *Homo sapiens*

    <220>

45 <223> Cebador D1S518

    <400> 50

50  
     attggcaact gcattagagt tctc 24

    <210> 51

    <211> 24

55 <212> ADN  
     <213> *Homo sapiens*

    <220>

60 <223> Cebador D7S1808

    <400> 51

    ggaggaaaag gaat tcttaaacgt 24

65  
     <210> 52  
     <211> 24

## ES 2 338 765 T3

	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
	<i>&lt;220&gt;</i>	
5	<i>&lt;223&gt; Cebador D7S1808</i>	
	<i>&lt;400&gt; 52</i>	
10	attggccttg tacto atgtgttgt	24
	<i>&lt;210&gt; 53</i>	
	<i>&lt;211&gt; 20</i>	
15	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
	<i>&lt;220&gt;</i>	
20	<i>&lt;223&gt; Cebador D7S3070</i>	
	<i>&lt;400&gt; 53</i>	
25	gccccatga catttctct	20
	<i>&lt;210&gt; 54</i>	
	<i>&lt;211&gt; 26</i>	
30	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
	<i>&lt;220&gt;</i>	
	<i>&lt;223&gt; Cebador D7S3070</i>	
35	<i>&lt;400&gt; 54</i>	
40	tgaaaagggtg attgacagc cagatg	26
	<i>&lt;210&gt; 55</i>	
	<i>&lt;211&gt; 21</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
45	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
	<i>&lt;220&gt;</i>	
	<i>&lt;223&gt; Cebador D7S3046</i>	
50	<i>&lt;400&gt; 55</i>	
55	gaggagacag ccagggatat a	21
	<i>&lt;210&gt; 56</i>	
	<i>&lt;211&gt; 27</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
60	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
	<i>&lt;220&gt;</i>	
	<i>&lt;223&gt; Cebador D7S3046</i>	
65	<i>&lt;400&gt; 56</i>	
	cctatct aacctctctc atttctctat	27

## ES 2 338 765 T3

	<210> 57	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<223> Cebador D10S1426	
10	<400> 57	
	cccttggtg gtgtcatcct	20
15	<210> 58	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<223> Cebador D10S1426	
25	<400> 58	
	attgccgatc ctgaagcaat agc	23
30	<210> 59	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<220>	
	<223> Cebador D3S2432	
40	<400> 59	
	gtca attgttgca tgtgaaacag	24
45	<210> 60	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<220>	
	<223> Cebador BAT-25	
55	<400> 60	
	ctct ttaactatgg attctgcatt	24
60	<210> 61	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<220>	
	<223> Cebador BAT-26	

## ES 2 338 765 T3

<p>&lt;400&gt; 61</p> <p style="padding-left: 40px;">cagt tgacttcagc tgactacttt</p> <p>5</p> <p>&lt;210&gt; 62</p> <p>&lt;211&gt; 24</p> <p>&lt;212&gt; ADN</p> <p>10 &lt;213&gt; <i>Homo sapiens</i></p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;223&gt; Cebador BAT-26</p> <p>15 &lt;400&gt; 62</p> <p style="padding-left: 40px;">aaccaatcaa cattttaac cctt</p> <p>20 &lt;210&gt; 63</p> <p>&lt;211&gt; 20</p> <p>&lt;212&gt; ADN</p> <p>&lt;213&gt; <i>Homo sapiens</i></p> <p>25 &lt;220&gt;</p> <p>&lt;223&gt; Cebador D3S2432</p> <p>30 &lt;400&gt; 63</p> <p style="padding-left: 40px;">gaacaggtca gttgcatgt</p> <p>35 &lt;210&gt; 64</p> <p>&lt;211&gt; 27</p> <p>&lt;212&gt; ADN</p> <p>&lt;213&gt; <i>Homo sapiens</i></p> <p>40 &lt;220&gt;</p> <p>&lt;223&gt; Cebador D7S3046</p> <p>&lt;400&gt; 64</p> <p>45</p> <p style="padding-left: 40px;">cctatct tacctctctc atttctctat</p> <p>&lt;210&gt; 65</p> <p>50 &lt;211&gt; 20</p> <p>&lt;212&gt; ADN</p> <p>&lt;213&gt; <i>Homo sapiens</i></p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>55 &lt;223&gt; Cebador BAT-40</p> <p>&lt;400&gt; 65</p> <p>60</p> <p style="padding-left: 40px;">ttttgtcct acaaccctgc</p> <p>&lt;210&gt; 66</p> <p>&lt;211&gt; 20</p> <p>65 &lt;212&gt; ADN</p> <p>&lt;213&gt; <i>Homo sapiens</i></p>	<p>24</p> <p>24</p> <p>20</p> <p>20</p> <p>27</p> <p>20</p>
--	---

## ES 2 338 765 T3

<220>  
<223> Cebador BAT-40

5 <400> 66  
ctagagcaag accaccctg 20

10 <210> 67  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

15 <220>  
<223> Cebador MONO-15

20 <400> 67  
ctatgaattg tgtgaaccac caga 24

25 <210> 68  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

30 <220>  
<223> Cebador MONO-15

35 <400> 68  
gcttgcaatg gtt agcagagatc 23

40

45

50

55

60

65