



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 559**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04715277 .2**

96 Fecha de presentación : **27.02.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1601792**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.12.2005**

54 Título: **Procedimiento para la identificación de tumores colorectales.**

30 Prioridad: **07.03.2003 IT MI03A0434**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.03.2011

73 Titular/es: **Istituto Oncologico Romagnolo
Cooperativa Sociale a r.l.
Corso Mazzini, 65
47100 Forli, IT**

72 Inventor/es: **Calistri, Daniele y
Rengucci, Claudia**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 355 559 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

Esta presente invención se refiere en general al diagnóstico de tumores en pacientes humanos y animales. De forma específica proporciona un procedimiento y kit para el diagnóstico precoz de carcinoma colorrectal y determinación de lesiones pre-cancerosas del colon y recto. El procedimiento de la invención se basa en la cuantificación de ADN extraído de cepas y amplificado con técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En los últimos años se ha acumulado una gran cantidad de información sobre las alteraciones moleculares que tienen lugar durante el desarrollo de tumores, tal como mutaciones de genes o redistribuciones genómicas, vislumbrando la posibilidad de detectar alteraciones tumorales en fluidos biológicos y en consecuencia indicando el uso de estos marcadores como un enfoque de diagnóstico no invasivo válido.

Un tumor que se ha investigado ampliamente con este enfoque es el cáncer colorrectal, que es una de las formas más comunes de cáncer en todo el mundo, con un resultado clínico que varía considerablemente de acuerdo con el tipo de lesión y fase de enfermedad en el diagnóstico (1-3). Un diagnóstico precoz es fundamental para reducir la morbilidad y mortalidad ya que un gran porcentaje de pacientes diagnosticados en las fases previas de la enfermedad sobreviven a largo plazo (4). Además la posibilidad de detectar lesiones pre-cancerosas hace de este tumor una diana ideal para los programas de seguimiento. Sin embargo, si bien se encuentran disponibles diversos procedimientos de seguimiento, un alto porcentaje de individuos no participan en los programas de seguimiento de cáncer colorrectal. Hay muchas razones para esta baja implicación, tal como una falta de conocimiento de los beneficios de los procedimientos de seguimiento disponibles, especialmente colonoscopia, así como también los procedimientos no complacientes y problemáticos (5).

Se han investigado repetidamente mutaciones de genes en cepas, especialmente K-ras (6-12) y en una menor extensión p53 (13), gen APC (14, 15) e inestabilidad microsatelital (16). Los resultados han mostrado la presencia de estas alteraciones moleculares en cepas en sólo una fracción de pacientes, debido a la frecuencia relativamente baja de alteraciones de marcador único en cáncer colorrectal. Se han analizado múltiples mutaciones en paralelo a la misma muestra de cepa y este enfoque ha conducido a mejor sensibilidad de la prueba, pero es cara, lleva tiempo y no se puede aplicar fácilmente a programas de seguimiento (17-21).

Se ha considerado recientemente el potencial de diagnóstico de la amplificación de ADN de células exfoliadas en cepa. Evidencias preliminares (19-21) han mostrado que la evaluación semi-cuantitativa de amplificación de ADN (L-ADN) de algunos fragmentos de ADN mayores de 200 bp detecta más del 50% de cánceres colorectales con una especificidad muy alta.

La solicitud de EEUU nº 20020004206 divulga un ensayo genético para la identificación de una enfermedad tumoral de muestras que contienen células epiteliales exfoliadas. La solicitud de patente describe un ensayo que comprende una etapa de amplificación por PCR de fragmentos de Kras, APC y p53, seguido de determinación semi-cuantitativa del ADN amplificado basado en tinción con gel.

El documento US 5723298 divulga un procedimiento para el etiquetado y secuenciación de moléculas de ácido nucleico, de forma particular moléculas de ADN en las que se alarga un cebador etiquetado internamente, extendido parcialmente en una reacción de extensión del cebador ciclado, y un kit para la preparación de muestras para análisis de secuencia de ácido nucleico que comprende un cebador de ácido nucleico no etiquetado, un dNTP etiquetado, tres dNTPs no etiquetados, una polimerasa termoestable y un tampón de reacción de la polimerasa termoestable.

El documento WO 01/42502 divulga un procedimiento para la detección de enfermedad que comprende, entre otros, llevar a cabo una amplificación de PCR de ADN purificado en muestras de cepa en pacientes que presentan cáncer colorrectal. Los cebadores usados en dicho procedimiento de amplificación se diseñan para amplificar 5 ó 7 locus diferentes de ADN que permiten la amplificación del fragmento de ADN que presenta una longitud mayor de 200 bp. La cantidad de amplicones se compara luego con un valor de referencia. Se usa tinción con bromuro de etidio para la cuantificación de ADN amplificada.

El documento WO 02/092858 divulga procedimientos para el seguimiento de enfermedades. Uno de los procedimientos descritos en este documento comprende llevar a cabo un procedimiento de diagnóstico para detectar la presencia de una muestra biológica de ácidos nucleicos específicos de especie indicativos de cáncer o pre-cáncer. Dicho procedimiento comprende la amplificación de ácidos nucleicos en una muestra de cepa representativa que usa cebadores específicos de humanos y que detecta amplicones que presentan más de 200 bp mediante tinción con bromuro de etidio, seleccionándose los cebadores de PCR para detectar de forma específica genes que se sabe o se sospecha están asociados con cáncer colorrectal. En dicho procedimiento la amplificación por PCR se diseña para amplificar 7 locus diferentes con una longitud que presenta al menos 200 bp. El resultado de la amplificación se compara luego con un valor de referencia.

Rengucci y col., Clinical Cancer Research, 7: 590-593 (2001), divulga la detección de alteraciones genéticas, de forma particular p53 y mutaciones k-ras e inestabilidad microsatelital, para el seguimiento de tumores colorectales.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 La presente invención se basa en un enfoque nuevo, exacto y rápido para la detección de cáncer, que permite una mejor discriminación entre individuos afectados y no afectados.

De forma específica el objeto de la invención es un procedimiento para la cuantificación de ADN en muestras de cepa, útil para el diagnóstico previo de tumores y lesiones de pre-cancerosas del colon y recto, que comprende las siguientes etapas:

a) extracción de ADN de muestras de cepas:

10 b) amplificación PCR de 8 fragmentos de ADN diferentes que extiende diferentes regiones de genes p53 y APC, usando deoxinucleótido trifosfatos o cebadores etiquetados con moléculas fluorescentes,

en la que se amplifican fragmentos de p53 que corresponden a exones 5-8 usando los siguientes pares de cebadores:

- (i) ctcttctgcagtactcccctgc; gccccagctgctaccatcgcta;
- (ii) gattgctcttaggtctggcccctc; ggccactgacaaccacccttaacc;
- (iii) gcgttgctcctaggttgctctg; caagtggctcctgacctggagtc;
- (iv) acctgattccttactgcctctggc; gtctgcttcttacctcgcttagt;

y se amplifican fragmentos APC usando los siguientes pares de cebadores:

- (i) aactaccatccagcaacaga; taattggcataaggcatag;
- (ii) cagttgaactctggaaggca; tgacacaaagactggcttac;
- (iii) gatgtaatcagacgcacag; ggcaatcgaacgacttcaa;
- (iv) cagtgatcttccagatagcc; aaatggctcatcgaggctca

15

c) cuantificación de los fragmentos amplificados (amplicones);

d) cálculo de la cantidad total de diferentes amplicones;

e) comparación de los valores obtenidos en (d) con un valor de referencia, en el que el valor de referencia se determina en base a series de casos que comprenden sujetos sanos y pacientes afectados por tumor o lesiones colorrectales.

20

La extracción de ADN se puede llevar a cabo mediante técnicas convencionales usando kits comercialmente disponibles. Los fragmentos de ADN amplificados en la etapa (2) puede extenderse en una o más regiones genómicas que no se solapan, incluyendo secuencias de genes y no de codificación, procurando que la longitud del fragmento no supere 100 bp (pares de bases), preferiblemente entre 100 y 1000 bp, y más preferiblemente entre 100 y 500 bp. Los fragmentos se pueden amplificar por separado o simultáneamente; en este último caso los productos de amplificación se deberían distinguir uno del otro mediante etiquetado fluorescentes apropiado. Preferiblemente los oligonucleótidos de cebador o deoxinucleótido trifosfatos usados en la reacción de amplificación portan las siguientes moléculas fluorescentes (fluorocromos): HEX (Applied Biosystems), 6-FAM (Applied Biosystems) y TAMRA (Applied Biosystems), u otras moléculas tales como fluoresceína, rodamina, Cy3, Cy5, 5-FAM Ned, Vic y Pet. Los marcadores se unen químicamente con uno o más nucleótidos dentro o en los extremos de las secuencias del cebador, preferiblemente en el primer residuo de nucleótido, o con los deoxinucleótido trifosfatos presentes en la mezcla de reacción de PCR.

25

30

Se amplifican los siguientes fragmentos de genoma: exones 5 a 8 de p53 (Banco de genes nº X54156, nt. 13042-13253, 13308-13489, 13986-14124, 14404-14603); y regiones genómicas que codifican aminoácidos 862-954, 1035-1130, 1288-1402 y 1421-1515 de APC (exón 15 – Banco de genes AF 127506, M74088).

35

En una realización preferida adicional se cuantifican los productos de amplificación mediante secuenciadores/analizadores de ADN automáticos, preferiblemente usando el 3100 Avant Genetic Analyzer® (Applied Biosystems). Otras técnicas adecuadas para la amplificación del fragmento de acuerdo con la invención incluyen técnicas inmunoenzimáticas, PCR a tiempo real y técnicas de quimioluminiscencia.

La amplificación PCR se lleva a cabo preferiblemente en presencia de un control interno para la detección de

inhibidores de la Taq. Por ejemplo, se puede añadir un plásmido que contiene una secuencia, también no relacionada con humano, que se puede amplificar con el conjunto de cebadores usados en la amplificación del ADN diana, a la mezcla de reacción de PCR. Este control interno permite prevenir resultados negativos falsos debido a la presencia de inhibidores de la Taq.

5 Con el fin de determinar la cantidad de cada amplicón es necesario preparar una curva de calibración mediante amplificación de diluciones conocidas de ADN genómico o plásmidos que contienen las secuencias de nucleótido de los fragmentos de ADN diana, usando los mismos cebadores y las mismas condiciones de las muestras de ensayo. Por ejemplo, cuando se usa un secuenciador/analizador de fragmento automático los valores de AUC (área bajo la curva) obtenidos de la amplificación de cantidades conocidas de ADN se representan en una curva de calibración; las cantidades de ADN en las muestras de ensayo se interpolan luego en la misma curva.

10 La cantidad total de los productos de amplificación que corresponden a diferentes fragmentos (es decir, la suma de cantidades de amplicón simples), expresadas en unidades de peso, se compara luego con un valor de referencia o de "corte" determinado previamente en base a la serie de casos que comprende sujetos sanos y pacientes en los que se ha establecido la presencia de tumores o lesiones colorectales. Estos casos deben incluir un número suficiente de pacientes y controles para proporcionar un buen intervalo de confianza (IC 95%), preferiblemente al menos 50 pacientes y 50 voluntarios sanos.

15 La exactitud, sensibilidad y especificidad del procedimiento lo hacen particularmente útil en el diagnóstico precoz de tumores colorectales y en la evaluación del riesgo o probabilidad de desarrollo de tales tumores en personas con lesiones colorectales cancerosas. Son ventajas adicionales del procedimiento su simplicidad, rapidez y bajo coste.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a un kit adecuado para llevar a cabo el procedimiento descrito anteriormente. El kit contendrá los oligonucleótidos etiquetados descritos anteriormente, ADN polimerasa termoestable, soluciones y reactivos para el desarrollo de una reacción de PCR y para un ensayo de cuantificación (p.e. el procedimiento de inmunoenzima o fluorimétrico). El kit también puede contener también instrucciones sobre el correcto procedimiento de operación.

25 Figuras 1 a 3: ejemplos de análisis de ADN-LF

Figuras 1a y 1b: ADN extraído de muestras de cepa. Los niveles de amplificación de cada muestra – expresados en unidades de peso (nanogramos) – se determinan a partir de las curvas de calibración correspondientes (figura 2c). El ADN-LF (ADN de larga duración por fluorescencia) para cada muestra viene dada por la suma de las cantidades (ng) de tres grupos de amplicones: exones 5-8 de p53, fragmentos APC 1-2 y 3-4.

30 Figuras 2a y 2b: electroferogramas obtenidos por amplificación de cantidades de ADN conocidas. Los valores de AUC se encuentran normalizados (área/100*ng) y se representan frente a la cantidad de ADN (1, 2, 5, 10 y 20 ng).

Figura 3: curva ROC de análisis de ADN-LF de muestras de cepa en pacientes y donadores sanos.

Material y procedimientos

Purificación de ADN

35 Se descongelaron aproximadamente 4 g de cepa a temperatura ambiente. Se extrajo el ADN después de una homogenización de 15 minutos con 16 ml de tampón TE-9 a pH 9 (Tris-HCl 0,5 M, EDTA 20 mM y NaCl 10 mM) con ULTRA-Turrax T25 (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania). Después de la centrifugación a 5.000 g durante 15 minutos se transfirió el sobrenadante a un tubo que contiene 5 ml de acetato de amonio 7,5 M (M-Medical, Florencia, Italia) y 300 ml de etanol al 100% (Carlo Erba, Milán, Italia). Se recuperó el ADN mediante centrifugación a 5.000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se suspendieron muestras de cepa en 1,6 ml de tampón ASL y se extrajo el ADN usando el kit QIAamp DNA Stool (QUIAGEN, Hilden, Alemania).

Análisis de ADN-LF

45 Se llevaron a cabo amplificaciones de exones 5-8 de p53 y fragmentos 1-4 de exón APC 15 en 2 µl de ADN de cepa en un volumen total de 25 µl que contiene 0,4 µM de cada cebador, 200 µM de deoxinucleótidtrifosfatos, 1 x tampón de reacción con MgCl₂ 3,5 mM y 1 unidad de Taq polimerasa (QUIAGEN). Se sometió la mezcla de reacción a 32 ciclos: 60 s a 94° C y luego 60 s a 60° C para exones de p53, y a 58° C para fragmentos de APC, seguido de incubación a 72° C durante 60 s.

50 Los exones de p53 se amplificaron simultáneamente en una única mezcla de reacción y se amplificaron los 4 fragmentos de APC en dos mezclas diferentes (mezcla 1 – fragmentos 1 y 2; mezcla 2 – fragmentos 3 y 4). Para este fin los cebadores usados para análisis de ADN-L se etiquetaron en el extremo con fluorocromos suministrados por Applied Biosystems (Foster City, CA).

Amplificación 1: exones de 5 a 8 de gen p53 (Banco de genes nº X54156, nt. 13042-13253, 13308-13489, 13986-14124, 14404-14603). Amplificación 1 y 2: fragmentos que corresponden a aminoácidos 682-954 y 1035-1130 de exón 15 de gen de APC (Banco de genes AF127506, M74088). Amplificación 3 y 4: fragmentos que corresponden a aminoácidos 1288-1402 y 1421-1515 de exón 15 de gen de APC (Banco de genes AF127506, M74088).

Exones de P53	Nombre cebador	del	Etiquetado en 5'	Secuencia
5	5-F		6-FAM-	ctctcctgcagtactcccctgc
	5-R			gccccagctgctcaccatcgcta
6	6-F			gattgctcttaggtctggcccctc
	6-R	HEX		ggccactgacaaccacccttaacc
7	7-F		6-FAM	gcggtgtctccttaggttgctctg
	7-R			caagtggtcctgacctggagtc
8	8-F			acctgattccttactgcctctggc
	8-R	HEX		gtcctgcttgcttacctcgcttagt
Fragmento de APC	Nombre cebador	del	Etiquetado en 5'	Secuencia
1	1BF			aactaccatccagcaacaga
	1BR	HEX		taatttggcataaggcatag
2	2F		6-FAM	cagttgaactctggaaggca
	2R			tgacacaaagactggcttac
3	3F			gatgtaatcagacgacacag
	3R	HEX		ggcaatcgaacgactctcaa
4	4F		6-faze	cagtgatcttccagatagcc
	4R			aaatggctcatcgaggctca

5 Se llevó a cabo la electroforesis usando un 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) equipado con GenScan Analysis 3.7.

10 Se llevó a cabo ADN-LF analizando la intensidad de fluorescencia de cada producto de PCR específico de la muestra (figura 1ab). La cuantificación de cada muestra se calculó por referencia a una curva patrón (1, 2, 5, 10 y 20 ng) de ADN genómico y se expresa como nanogramos (figura 2abc). Para verificar la presencia o ausencia de inhibidores de la Taq, se llevó a cabo una amplificación en todas las muestras con una mezcla que contiene 2 µl de ADN extraído de cepa y 25 atogramos [ag] de un plásmido con una secuencia de control. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado y se repitieron en aproximadamente el 20% de las muestras en las que la variación era > 20%.

Series de casos

15 Se recogieron muestras de cepa en 86 pacientes con cáncer colorrectal primario en la Unidad de Gastroenterología y Dept. de Cirugía I, Morgagni Hospital, Forli y en los Departamentos de Oncología y Cirugía General, Infermi Hospital, Rimini. Se recogieron muestras de 62 individuos que dieron negativo en cáncer o lesiones benignas tras colonoscopia, y del personal del laboratorio.

20 Se obtuvieron muestras de cepa al menos tres días después de la administración de tratamientos laxativos en la preparación de colonoscopia para permitir la recuperación de funcionalidad normal del intestino. Se congelaron inmediatamente especímenes fecales y se conservaron a -70° C durante un máximo de dos meses.

Se confirmó histológicamente el diagnóstico de cáncer y se definió la fase patológica de acuerdo con la clasificación de Duke: se clasificaron 8 tumores como fase A, 30 como fase B, 37 como fase C y 9 como fase D.

Además se localizaron 19 cánceres en colon ascendente, 30 en colon descendente, 2 en colon transverso y 35 en el tracto rectal. Sólo para dos únicos casos no se disponía de información de la fase.

De los 86 pacientes 42 eran hombres y 44 eran mujeres y la edad media era de 72 años (intervalo de 36 a 90). De los 62 controles, 29 eran hombres y 33 mujeres y la edad media era de 51 años (intervalo de 21 a 87).

5 Resultados

Las señales de fluorescencia variaban de 0 a 283 ng (mediana 47 ng) en cepa de paciente y de 0 a 87 ng (mediana de 4 ng) en cepa de donador sano. No se observaron diferencias en valores de la mediana respecto a la edad de pacientes y tamaño, lugar y fase del tumor.

10 Cuando los resultados de los dos enfoques se compararon se observó una relación directa, pero con una amplia variabilidad de niveles de ADN-LF dentro de los subgrupos definidos de acuerdo con el número de amplificaciones de alto ADN-L. Además se detectó fluorescencia por procedimiento de ADN-LF en 33 de los 47 individuos que no mostraron amplificación elevada por ensayo de ADN-L. Estos resultados eran claramente indicativos de una mayor sensibilidad del procedimiento de fluorescencia frente al enfoque convencional.

15 El análisis de la curva ROC de niveles de ADN-LF (figura 3) muestra una buena exactitud de diagnóstico de este enfoque. De forma particular se observaron especificidad muy alta que varía de 83% a 95% y alta sensibilidad que varía de 82% a 72% para los cortes más discriminatorios de 15, 20, 25 y 30 ng de ADN (tabla 1). Cuando el corte de 25 ng, que proporciona la mejor exactitud global, se analizó en relación a las diferentes características del tumor, la sensibilidad se mantuvo alta en pacientes con tumores pequeños (70%) en comparación con tumores grandes (82%) y era similar para los diferentes tumores en fase de Dukes (tabla 2). Aún más importante, se observó una sensibilidad similar en la detección de tumores localizados en tractos de colon ascendentes y descendentes.

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad de análisis de ADN-LF

Niveles de ADN Corte (ng)	DONADORES SANOS		PACIENTES		Sensibilidad %	I.C. 95%	Especificidad %	I.C. 95%
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo				
15	10	49	70	15	82	(74-90)	83	(73-93)
20	7	52	70	15	82	(74-90)	88	(80-96)
25	4	55	65	20	76	(67-85)	93	(86-100)
30	3	56	61	24	72	(62-82)	95	(89-100)

Tabla 2. Sensibilidad* como una función de diferentes características en cáncer colorrectal

Categoría	Nº pacientes	POSITIVO	NEGATIVO	SENSIBILIDAD %
Tamaño (cm)				
0,1 - 4,0	40	28	12	70
≥ 4,1	38	31	7	82
Fase de Duke				
A	8	7	1	88
B	29	25	4	86
C	37	25	12	68

D	9	8	1	89
LOCALIZACIÓN				
Ascendente	18	13	5	72
Transverso	2	2	0	100
Descendente	30	22	8	73
Recto	35	28	7	80

* Valor de corte 25 ng

REFERENCIAS

- (1) Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J, editors. Cancer incidence in five countries. IARC Scientific Publications nº 143. Lyon : International Agency for Research on Cancer ; 1997.
- 5 (2) Boyle P. Faecal occult blood testing (FOBT) as screening for colorectal cancer: the current controversy. *Ann Oncol* 2002; 13: 16-8.
- (3) Strul H, Arber N. Fecal occult blood test for colorectal cancer screening. *Ann Oncol* 2002 ; 13: 51-6.
- 10 (4) Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, y col. , editors. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2000. Bethesda (MD): National Cancer Institute; 2003. Available from: URL: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2000, 2003.
- (5) Levin B, Brooks D, Smith RA, Stone A. Emerging technologies in screening for colorectal cancer: CT colonography, immunochemical fecal occult blood tests and stool screening using molecular markers. *CA Cancer J Clin* 2003; 53: 44-55.
- 15 (6) Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, y col. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992 ; 256: 102-5.
- (7) Hasegawa Y, Takeda S, Ichii S, Koizumi K, Maruyama M, Fujii A, y col. Detection of K-ras mutations in DNAs isolated from feces of patients with colorectal tumors by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Oncogene* 1995; 10: 1441-5.
- 20 (8) Smith-Ravin J, England J, Talbot C, Bodmer W. Detection of c-Ki-ras mutations in faecal samples from sporadic colorectal cancer patients. *Gut* 1995 ; 36 : 81-6.
- (9) Villa E, Dugani A, Rebecchi AM, Vignoli A, Grottola A, Buttafoco P, y col. Identification of subjects at risk for colorectal carcinoma through a test based on K-ras determination in the stool. *Gastroenterology* 1996; 110: 1346-53.
- (10) Nollau P, Moser C, Weinland G, Wagener C. Detection of K-ras mutations in stools of patients with colorectal cancer by mutant- enriched PCR. *Int J Cancer* 1996; 66: 332-6
- 25 (11) Puig P, Urgell E, Capella G, Sancho FJ, Pujol J, Boadas J, y col. A highly sensitive method for K-ras mutation detection is useful in diagnosis of gastrointestinal cancer. *Int J Cancer* 2000; 85 : 73-7.
- (12) Prix L, Uciechowski P, Bockmann B, Giesing M, Schuetz AJ. Diagnostic biochip array for fast and sensitive detection of K-ras mutation in stool. *Clin Chem* 2002; 48: 428-35.
- 30 (13) Eguchi S, Kohara N, Komuta K, Kanematsu T. Mutations of the p53 gene in the stool of patients with resectable colorectal cancer. *Cancer* 1996; 77: 1707-10.
- (14) Deuter R, Muller O. Detection of APC mutation in stool DNA of patients with colorectal cancer by HD-PCR. *Hum Mutat* 1998 ; 11: 84-9.
- (15) Traverso G, Shuber A, Levin B, Johnson C, Olsson L, Schoetz DJ Jr, y col. Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 2002 ; 346: 311-20.
- 35 (16) Traverso G, Shuber A, Olsson L, Levin B, Johnson C, Hamilton SR, y col. Detection of proximal colorectal cancer through analysis of faecal DNA. *Lancet* 2002; 359: 403-4.

- (17) Rengucci C, Maiolo P, Saragoni L, Zoli W, Amadori D, Calistri D. Multiple detection of genetic alterations in tumors and stool. Clin Cancer Res 2001; 7: 590-3.
- (18) Dong SM, Traverso G, Johnson C, Geng L, Favis R, Boynton K, y col. Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. J Natl Cancer Inst 2001 ; 93: 858-65.
- 5 (19) Ahlquist DA, Skoletsy JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, y col. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. Gastroenterology 2000 ; 119 : 1219-27.
- (20) Tagore KS, Lavson MJ, Yucaitis JA, Gage R, Orr T, Shuber AP, y col. Sensitivity and specificity of a stool DNA multitarget assay panel for the detection of advanced colorectal neoplasia. Clin Colorectal Cancer 2003 ; 3: 47-53.
- 10 (21) Calistri D, Rengucci C, Bocchini R, Saragoni L, Zoli W, Amadori D. Fecal multiple molecular tests to detect colorectal cancer in stool. Clin Gastr Hep 2003 ; 1: 377-83.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ISTITUTO ONCOLOGICO RAMAGNOLO COOPERATIVA SOCIALE A R.L.
- <120> PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE TUMORES COLORECTALES
- 15 <130> 6988MEUR
- <160> 16
- <170> Patentin versión 3.1
- <210> 1
- <211> 23
- 20 <212> ADN
- <213> Desconocido
- <220>
- <223> Oligonucleótido sintético
- <400> 1
- 25 ctcttctgc agtactcccc tgc 23
- <210> 2
- <211> 23
- <212> ADN
- <213> Desconocido
- 30 <220>
- <223> Oligonucleótido sintético
- <400> 2
- gccccagctg ctccacctcg cta 23
- <210> 3
- 35 <211> 24
- <212> ADN
- <213> Desconocido
- <220>
- <223> Oligonucleótido sintético
- 40 <400> 3
- gattgctctt aggtctggcc cctc 24
- <210> 4
- <211> 24

	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 4	
	ggccactgac aaccaccctt aacc	24
	<210> 5	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 5	
	gcggtgtctc ctagggtggc tctg	24
15	<210> 6	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 6	
	caagtggctc ctgacctgga gtc	23
	<210> 7	
	<211> 25	
25	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 7	
30	acctgatttc cttactgcct ctggc	25
	<210> 8	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 8	
	gtcctgcttg cttacctgcg ttagt	25
	<210> 9	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	

	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 9	
5	aactaccatc cagcaacaga	20
	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
	<220>	
10	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 10	
	taatttgca taaggcatag	20
	<210> 11	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 11	
20	cagttgaact ctggaaggca	20
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 12	
	tgacacaag actggcttac	20
	<210> 13	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 13	
	gatgtaatca gacgacacag	20
	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	

	<400> 14	
	ggcaatcgaa cgactctcaa	20
	<210> 15	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 15	
10	cagtgatctt ccagatagcc	20
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 16	
	aaatggctca tcgaggctca	20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la determinación de la presencia de tumores colorectales o lesiones pre-cancerosas en un sujeto humano, que comprende:
- 5 a) extracción de ADN de muestras de cepas:
- b) amplificación por PCR de 8 fragmentos de ADN diferentes que se extienden en diferentes regiones de genes p53 y APC, usando deoxinucleótido trifosfatos o cebadores etiquetados con moléculas fluorescentes,
- en la que se amplifican fragmentos de p53 que corresponden a exones 5-8 usando los siguientes pares de cebadores:
- (i) ctcttctgcagtactcccctgc; gccccagctgctcaccatcgcta;
- (ii) gattgctcttaggtctggcccctc; ggccactgacaaccacccttaacc;
- (iii) gcggtgtctcctagggtggctctg; caagtggctcctgacctggagtc;
- (iv) acctgatttcctactgcctctggc; gtctgcttgcttacctcgcttagt;
- 10 y se amplifican fragmentos APC usando los siguientes pares de cebadores:
- (i) aactaccatccagcaacaga; taattggcataaggcatag;
- (ii) cagttgaactctggaaggca; tgacacaaagactggcttac;
- (iii) gatgtaatcagacgacacag; ggcaatcgaacgacttcaa;
- (iv) cagtgatcttccagatagcc; aatggctcatcgaggctca
- c) cuantificación de los fragmentos amplificados (amplicones);
- d) cálculo de la cantidad total de diferentes amplicones;
- 15 e) comparación de los valores obtenidos en (d) con un valor de referencia, en el que el valor de referencia se determina en base a series de casos que comprenden sujetos sanos y pacientes afectados por tumor o lesiones colorrectales.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas moléculas fluorescentes se seleccionan de HEX, 6-FAM y TAMRA.
- 20 3. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, en el que las cantidades de amplicón se interpolan en una curva de calibración obtenida de cantidades de ADN conocidas.
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los amplicones se cuantifican con un secuenciador/analizador automático o usando sistemas de detección fluorimétricos, colorimétricos, radioactivos o espectrofotométricos.
- 25 5. Un kit que contiene los cebadores de la reivindicación 1 marcados con moléculas fluorescentes de acuerdo con la reivindicación 2, un ADN polimerasa termoestable e instrucciones para el usuario para llevar a cabo el procedimiento de las reivindicaciones 1-4.

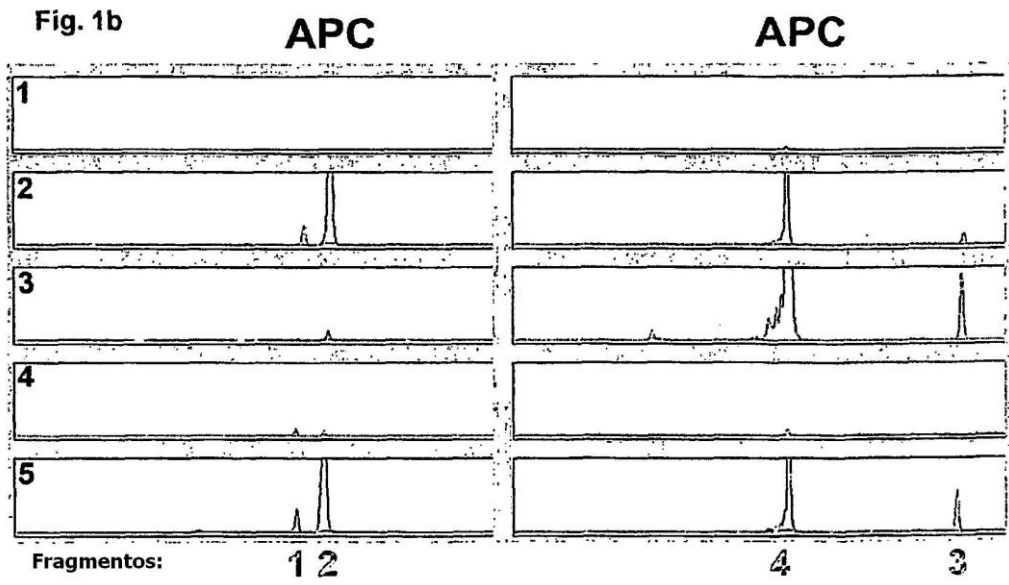
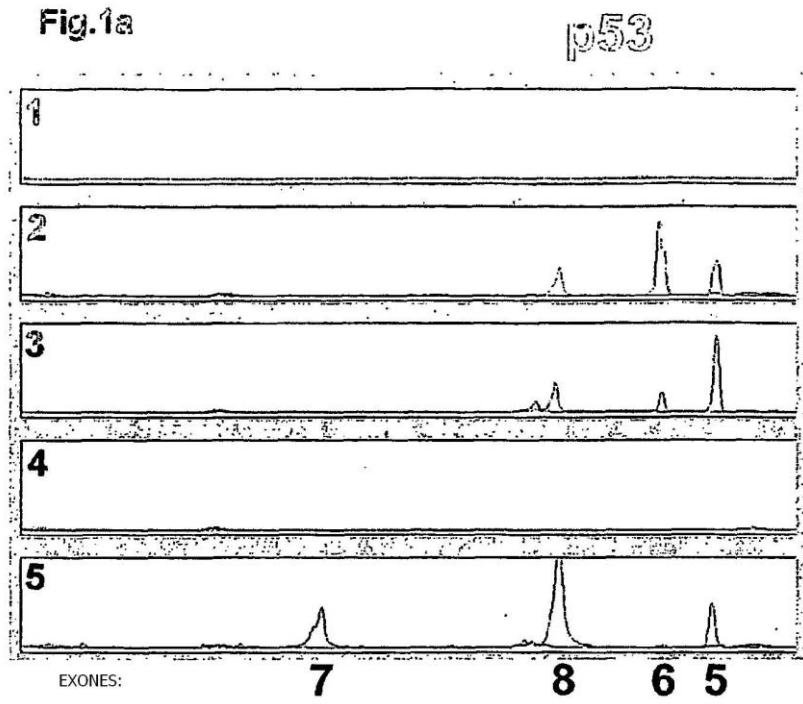


Fig. 2a

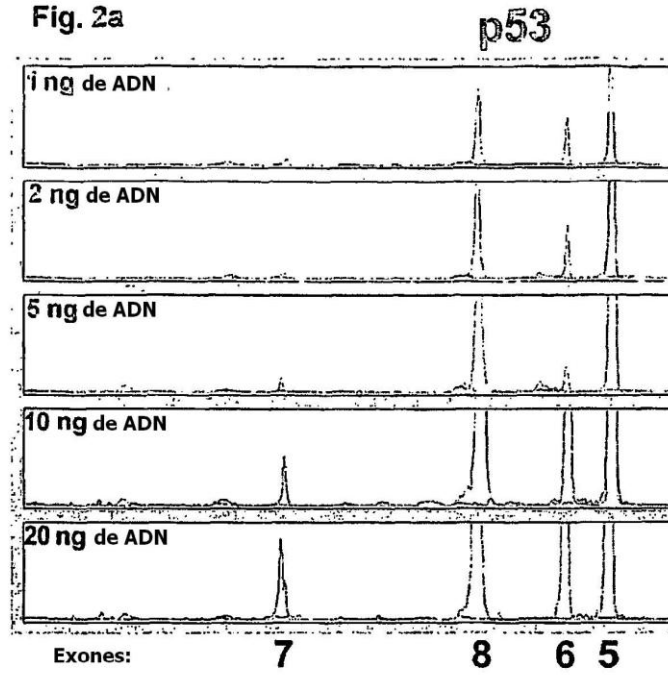


Fig. 2b

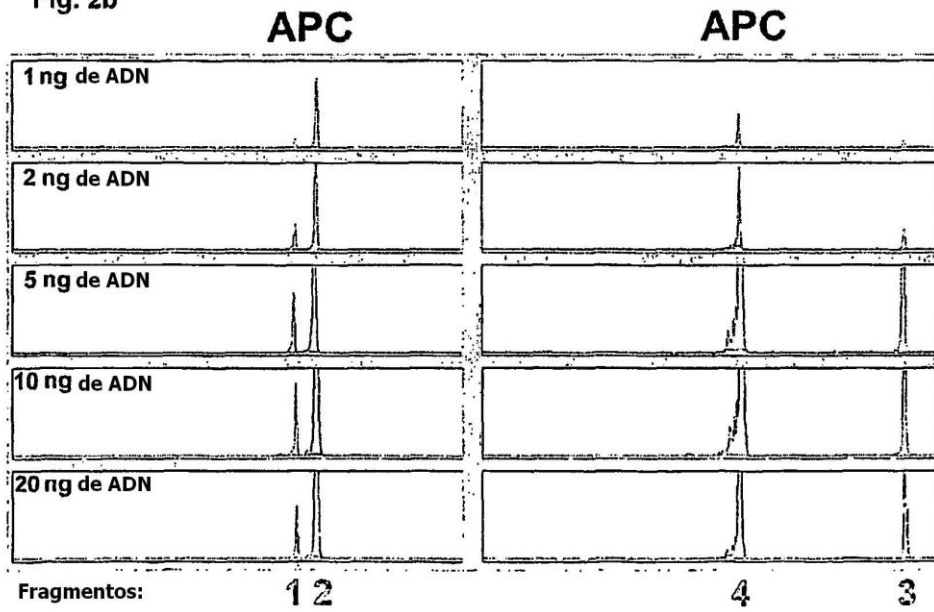


Fig. 2c

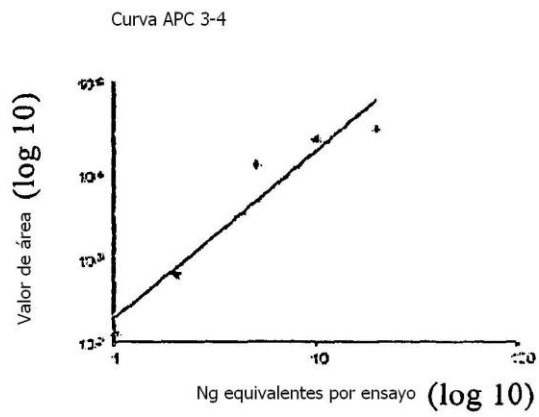
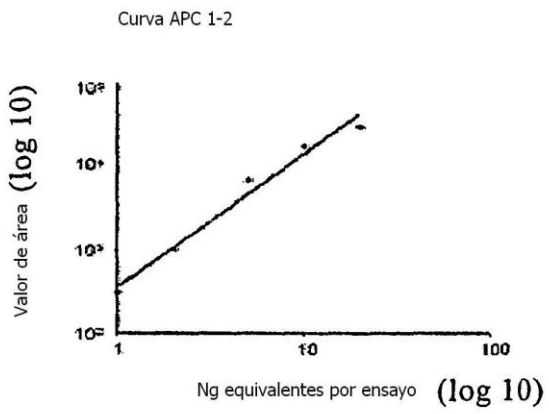
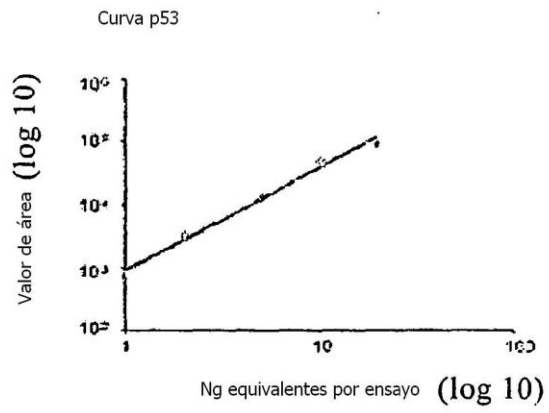


Fig. 3

