

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2004.02.27	(73) Titular(es): ISTITUTO ONCOLOGICO ROMAGNOLO COOPERATIVA SOCIALE A R.L. CORSO MAZZINI, 65 47100 FORLI	IT
(30) Prioridade(s): 2003.03.07 IT MI20030434		
(43) Data de publicação do pedido: 2005.12.07	(72) Inventor(es): DANIELE CALISTRI CLAUDIA RENGUCCI	IT IT
(45) Data e BPI da concessão: 2010.12.08 025/2011	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE TUMORES COLORRECTAIS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO DIZ RESPEITO A UM MÉTODO PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DE CARCINOMA COLORRECTAL E À DETERMINAÇÃO DE LESÕES PRÉ-CANCERÍGENAS DO CÓLON E DO RECTO COM BASE NA QUANTIFICAÇÃO DE ADN EXTRAÍDO A PARTIR DE FEZES E AMPLIFICADO RECORRENDO A TÉCNICAS DE PCR.

RESUMO**"MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE TUMORES COLORRECTAIS"**

A invenção diz respeito a um método para o diagnóstico precoce de carcinoma colorrectal e à determinação de lesões pré-cancerígenas do cólon e do recto com base na quantificação de ADN extraído a partir de fezes e amplificado recorrendo a técnicas de PCR.

DESCRIÇÃO

"MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE TUMORES COLORRECTAIS"

De um modo geral, a presente invenção diz respeito ao diagnóstico de tumores em pacientes humanos e em animais. Em particular, a invenção proporciona um método e um kit para o diagnóstico precoce de carcinoma colorrectal e para a determinação de lesões pré-cancerígenas do cólon e do recto. O método de acordo com a invenção tem por base a quantificação de ADN extraído a partir de fezes e amplificado por meio de técnicas de PCR.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Nos últimos anos, tem vindo a ser recolhida muita informação sobre as alterações moleculares que têm lugar durante o desenvolvimento de tumores, tais como as mutações génicas ou os rearranjos genómicos, sublinhando a possibilidade de detecção de alterações tumorais em fluidos biológicos e, conseqüentemente, indicando a utilização destes marcadores como abordagem válida de diagnóstico não invasivo.

Um tumor que foi já bastante investigado segundo esta abordagem é o cancro colorrectal, o qual constitui uma das formas mundiais mais comuns de cancro, apresentando um resultado clínico com uma variação considerável de acordo com o tipo de lesão e a fase da doença aquando do diagnóstico (1-3). Um diagnóstico precoce é fundamental para a redução da morbilidade e da mortalidade uma vez que uma percentagem elevada de pacientes diagnosticados nas fases precoces da doença sobrevivem durante um tempo mais

longo (4). Além do mais, a possibilidade de detecção de lesões pré-malignas torna este tumor um dos alvos ideais para os programas de rastreio. No entanto, embora estejam disponíveis diversos métodos de rastreio, uma percentagem elevada de indivíduos não participa nos programas de rastreio do cancro colorrectal. Há diversos motivos para esta fraca adesão, tais como a falta de conhecimento dos benefícios dos métodos de rastreio disponíveis, em particular a colonoscopia, bem como os procedimentos desagradáveis e nos quais podem surgir complicações (5).

As mutações génicas nas fezes, em particular no gene k-ras (6-12) e em menor grau nos genes p53 (13) e APC (14, 15) e a instabilidade de microssatélites (16) foram já investigadas inúmeras vezes. Os resultados demonstraram a presença destas alterações moleculares nas fezes apenas numa fracção de pacientes, devido à frequência relativamente reduzida de alterações num único marcador no cancro colorrectal. Em paralelo, foram analisadas mutações múltiplas nas mesmas fezes, tendo esta abordagem proporcionado uma sensibilidade superior de teste, embora seja dispendiosa, demorada e não possa ser facilmente aplicada a programas de rastreio (17-21).

Foi recentemente considerado o potencial ao nível do diagnóstico da amplificação de ADN de células esfoliadas em fezes. Provas preliminares (19-21) demonstraram que a avaliação semi-quantitativa da amplificação de ADN (L-ADN) de alguns fragmentos de ADN com um comprimento superior a 200 pb detecta mais de 50% dos cancros colorrectais com uma especificidade bastante elevada.

No pedido de patente de invenção norte-americana nº 20020004206 encontra-se descrito um ensaio genético para a

identificação de uma doença tumoral a partir de amostras que contenham células epiteliais esfoliadas. No pedido de patente de invenção encontra-se descrito um ensaio que compreende um passo de amplificação por PCR de fragmentos de Kras, APC e p53, e subsequente determinação semi-quantitativa do ADN amplificado com base no método de coloração do gel.

No documento US 5723298 encontra-se descrito um método para a marcação e sequenciação de moléculas de ácido nucleico, em particular de moléculas de ADN, em que um iniciador parcialmente prolongado e marcado internamente é alongado numa reacção de extensão com um iniciador cíclico, e um kit para a preparação de amostras para uma análise da sequência de ácido nucleico que compreende um iniciador de ácido nucleico não marcado, uma dNTP marcada, três dNTP não marcadas, uma polimerase termostável e um tampão de reacção de polimerase termostável.

No documento WO 01/42502 encontra-se descrito um método para a detecção de doenças que compreende, *inter alia*, a realização de uma amplificação por PCR de ADN purificado a partir de amostras de fezes de pacientes que padeçam de cancro colorrectal. Os iniciadores utilizados no referido procedimento de amplificação são concebidos para a amplificação de 5 ou 7 locais diferentes do ADN, permitindo a amplificação de fragmentos de ADN que possuam um comprimento superior a 200 pb. A quantidade de amplicões é então comparada com um valor de referência. Utiliza-se o procedimento de coloração com brometo de etídio para a quantificação de ADN amplificado.

No documento WO 02/092858 encontram-se descritos métodos para o rastreio de doenças. Um dos métodos aí

descrito compreende a realização de um procedimento de diagnóstico para a detecção da presença, numa amostra biológica, de espécies de ácidos nucleicos específicos que constituam uma indicação de cancro ou de estados pré-cancerígenos. O referido método compreende a amplificação de ácidos nucleicos numa amostra de fezes representativa utilizando iniciadores específicos de humanos e detectando os amplicões que possuam mais de 200 pb, por meio do procedimento de coloração com brometo de etídio, sendo os iniciadores de PCR seleccionados para detectar especificamente os genes sobre os quais se sabe ou se suspeita que estejam associados ao cancro colorrectal. No referido método a amplificação por PCR é concebida para a amplificação de 7 locais diferentes com um comprimento pelo menos de 200 pb. O resultado da amplificação é então comparado com um valor de referência.

Rengucci *et al.*, *Clinical Cancer Research*, 7: 590-593 (2001), descrevem a detecção de alterações genéticas, em particular mutações de p53 e k-ras e instabilidade de microssatélites, para o rastreio de tumores colorrectais.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção tem por base uma nova abordagem, rápida e precisa, para a detecção de cancro, a qual permite uma discriminação superior entre indivíduos afectados e não afectados.

Em particular, constitui o objecto da invenção um método para a quantificação de ADN a partir de amostras de fezes, o qual é útil para o diagnóstico precoce de tumores e de lesões pré-cancerígenas do colo e do recto, o qual compreende os seguintes passos:

- a) extracção de ADN a partir de amostras de fezes;
- b) amplificação por PCR de 8 fragmentos diferentes de ADN que abrangem regiões diferentes dos genes p53 e APC, utilizando trifosfatos de desoxinucleótido ou iniciadores marcados com moléculas fluorescentes, em que os fragmentos de p53 que correspondem aos exões 5-8 são amplificados utilizando os pares de iniciadores seguintes:
 - (i) ctcttctgcagtactcccctgc; gcccagctgctcaccatcgcta;
 - (ii) gattgctcttaggtctggccctc; ggccactgacaaccacccttaacc;
 - (iii) gcgttgtctcctaggttggtctg; caagtggctcctgacctggagtc;
 - (iv) acctgatttccttactgcctctggc; gtctgcttgcttacctcgcttagt;e os fragmentos de APC são amplificados utilizando os pares de iniciadores seguintes:
 - (i) aactaccatccagcaacaga; taatttggcataaggcatag;
 - (ii) cagttgaactctggaaggca; tgacacaaagactggcttac;
 - (iii) gatgtaatcagacgacacag; ggcaatcgaacgactctcaa;
 - (iv) cagtgatcttccagatagcc; aaatggctcatcgaggctca
- c) quantificação dos fragmentos amplificados (amplicões);
- d) cálculo da quantidade total de amplicões;
- e) comparação dos valores obtidos em (d) com um valor de referência, em que o valor de referência é determinado com base em séries de casos que compreende pacientes saudáveis e pacientes que padecem de tumores ou lesões colorrectais.

A extracção de ADN pode ser efectuada por meio de técnicas convencionais e recorrendo à utilização de kits comercialmente disponíveis. Os fragmentos de ADN amplificados no passo (2) podem abranger uma ou várias regiões não sobrepostas do genoma, incluindo genes e

sequências não codificadoras, desde que o comprimento do fragmento seja superior a 100 pb (pares de bases), de preferência entre 100 pb e 1000 pb e mais preferencialmente entre 100 pb e 500 pb. Os fragmentos podem ser amplificados em separado ou em simultâneo; neste último caso, os produtos de amplificação deverão ser distinguíveis entre si utilizando marcadores fluorescentes adequados. De preferência, os iniciadores de oligonucleótidos ou trifosfatos de desoxinucleótidos utilizados na reacção de amplificação podem ligar-se às moléculas fluorescentes seguintes (fluorocromos): HEX (Applied Biosystems), 6-FAM (Applied Biosystems) e TAMRA (Applied Biosystems), ou outras moléculas, tais como fluoresceína, rodamina, Cy3, Cy5, 5-FAM Ned, Vic e Pet. Os marcadores ligam-se quimicamente a um ou vários nucleótidos na parte interior ou nas extremidades das sequências iniciadoras, de preferência no primeiro resíduo nucleótido, ou aos trifosfatos desoxinucleótidos presentes na mistura de reacção de PCR.

São amplificados os fragmentos de genoma seguintes: exões 5 a 8 de p53 (Gene Bank nº X54156, n. 13042-13253, 13308-13489, 13986-14124, 14404-14603); e regiões genómicas que codificam os aminoácidos 862-954, 1035-1130, 1288-1402 e 1421-1515 de APC (exão 15 - Gene Bank AF127506, M74088).

De acordo com uma outra variante preferida, os produtos de amplificação são quantificados por meio de sequenciadores/analísadores automáticos de ADN, de preferência utilizando o '3100 Avant Genetic Analyzer' (Applied Biosystems). Como outras técnicas adequadas para a amplificação de fragmentos de acordo com a invenção refere-

se as técnicas imunoenzimáticas, PCR em tempo real e as técnicas de quimioluminescência.

De preferência, a amplificação por PCR é efectuada na presença de um controlo interno para a detecção de inibidores de Taq. Por exemplo, também é possível adicionar um plasmídeo que contém uma sequência, a qual não está associada a humanos, que é amplificável com um conjunto de iniciadores utilizados na amplificação, à mistura de reacção de PCR. Este controlo interno permite prevenir a obtenção de resultados negativos falsos devido à presença de inibidores de Taq.

Para se determinar a quantidade de cada amplicão é necessário preparar uma curva de calibração por meio da amplificação de diluições conhecidas de ADN ou plasmídeos genómicos que contenham as sequências de nucleótidos dos fragmentos de ADN alvo, utilizando os mesmos iniciadores e as mesmas condições das amostras de ensaio. Por exemplo, no caso de se utilizar um sequenciador/analizador automático de fragmentos, então os valores da ASC (área sob a curva) obtidos a partir da amplificação de quantidades conhecidas de ADN são representados numa curva de calibração; as quantidades de ADN nas amostras de ensaio são então interpoladas com base na mesma curva.

A quantidade total dos produtos de amplificação que correspondem a fragmentos diferentes (isto é, a soma das quantidades de amplicões individuais), expressa em unidades de massa, é então comparada com um valor de referência ou de "corte", o qual é determinado previamente com base num conjunto de casos que compreendem indivíduos saudáveis e pacientes para os quais foram já diagnosticados tumores ou lesões colorrectais. Estes casos deverão incluir um número

suficiente de pacientes e de controlos para proporcionar um bom intervalo de confiança (IC 95%), de preferência pelo menos de 50 pacientes e de 50 voluntários saudáveis.

A precisão, a sensibilidade e a especificidade do método tornam-no particularmente útil para o diagnóstico precoce de tumores colorrectais e na avaliação do risco ou da probabilidade do desenvolvimento de tais tumores em pessoas com lesões colorrectais pré-cancerígenas. Como outras vantagens da do método refere-se a sua simplicidade, a sua velocidade e o seu custo reduzido.

Um outro aspecto da invenção diz respeito a um kit que é adequado para a realização do método descrito antes. O kit irá conter os oligonucleótidos marcados descritos antes, a polimerase de ADN termostável, as soluções e os reagentes para a realização de uma reacção de PCR e para o ensaio de determinação da quantidade (v.g., de imunoenzimas ou de acordo com o método fluorimétrico). O kit também irá conter as instruções sobre o método correcto de utilização.

Figuras 1 a 3: exemplos de análises de FL-ADN

Figuras 1a e 1b: ADN extraído a partir de amostras de fezes. Os níveis de amplificação para cada amostra - expresso em unidades de massa (nanogramas) - são determinados a partir das curvas de calibração correspondentes (fig. 2c). A FL-ADN (fluorescência prolongada em ADN) para cada amostra é determinada pela soma das quantidades (ng) dos três grupos de amplicões: p53 - exões 5 a 8, fragmentos 1-2 e 3-4 de APC.

Figuras 2a e 2b: electroferogramas obtidos por amplificação de quantidades conhecidas de ADN. Os valores

de ASC são normalizados (área/100*ng) e representados num gráfico versus a quantidade de ADN (1, 2, 5, 10 e 20 ng).

Fig. 3: curva ROC da análise de FL-ADN de amostras de fezes de pacientes e de dadores saudáveis.

Materiais e métodos

Purificação de ADN

Dissolveu-se aproximadamente 4 g de fezes à temperatura ambiente. Extraiu-se o ADN após homogeneização durante 15 minutos com 16 mL de tampão TE-9, pH 9 (Tris-HCl 0,5 M, EDTA 20 mM e NaCl 10 mM), utilizando 'ULTRA-Turrax T25' (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG IKA-Labortechnik, Staufen, Alemanha). Após centrifugação a 5000 g durante 15 minutos, transferiu-se o sobrenadante para um tubo que continha 5 mL de uma solução de acetato de amónia 7,5 M (M-Medical, Florence, Itália) e 30 mL de etanol a 100% (Carlo Erba, Milan, Itália). Recuperou-se o ADN por centrifugação a 5000 g durante 15 minutos à temperatura ambiente. Colocou-se em suspensão as amostras de fezes em 1,6 mL de tampão ASL e extraiu-se o ADN utilizando um kit de amostra de ADN 'QIAamp' (QIAGEN, Hilden, Alemanha).

Análise de FL-ADN

Efectuou-se as amplificações dos exões 5 a 8 de p53 e dos fragmentos 1 a 4 do exão 15 de APC em 2 µL de ADN a partir de amostras, com um volume total de 25 µL que continha 0,4 µM de cada iniciador, 200 µM de trifosfatos de desoxinucleótidos, 1 × tampão de reacção com MgCl₂ 3,5 mM e 1 unidade de Taq-polimerase (QIAGEN). Submeteu-se a mistura de reacção a 32 ciclos: 60 segundos a 94°C e depois 60

segundos a 60°C para os exões de p53, e 58°C para os fragmentos de APC, seguindo-se a incubação a 72°C durante 60 segundos.

Os exões de p53 foram amplificados simultaneamente numa mistura de reacção individual e os 4 fragmentos de APC foram amplificados em duas misturas diferentes (mistura 1 - fragmentos 1 e 2; mistura 2 - fragmentos 3 e 4). Para este fim, os iniciadores utilizados para a análise L-ADN foram marcados na extremidade com fluorocromos fornecidos por Applied Biosystems (Foster City, CA).

Amplificação 1: exões 5 a 8 do gene p53 (Gene Bank n. X54156, nt. 13042-13253, 13308-13489, 13986-14124, 14404-14603). Amplificações 1 e 2: fragmentos que correspondem aos aminoácidos 862-954 e 1035-1130 do exão 15 do gene APC (Gene Bank AF127506, M74088). Amplificações 3 e 4: fragmentos que correspondem aos aminoácidos 1288-1402 e 1421-1515 do exão 15 do gene APC (Gene Bank AF127506, M74088).

Exões de p53	Nome do iniciador	do Marcação em 5'	Sequência
5	5-F	6-FAM-	ctcttcctgcagtaactcccctgc
	5-R		gccccagctgctcaccatcgcta
6	6-F	HEX	gattgctcttaggtctggcccctc
	6-R		ggccactgacaaccacccttaacc
7	7-F	6-FAM	gcgttgtctcctaggttggtctg
	7-R		caagtggctcctgacctggagtc
8	8-F	HEX	acctgatttccttactgcctctggc
	8-R		gtcctgcttgcttacctcgcttagt

Fragmento de APC	Nome do iniciador	Marcação em 5'	Sequência
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		aatggctcatcgaggctca

Efectuou-se a electroforese utilizando um dispositivo '3100 Avant Genetic Analyzer' (Applied Biosystems) equipado com um programa 'GeneScan Analysis 3.7'.

Efectuou-se a FL-ADN por análise da intensidade de fluorescência de cada amostra-produto de PCR específico (fig. 1ab). Determinou-se a quantificação de cada amostra por referência a uma curva padrão (1, 2, 5, 10 e 20 ng) de ADN genómico e esta quantificação foi expressa em nanogramas (fig. 2abc). Para se verificar a presença ou a ausência de inibidores de Taq, foi efectuada uma amplificação em todas as amostras com uma mistura que continha 2 µL de ADN extraído a partir de fezes e 25 atogramas [ag] de um plasmídeo com uma sequência de controlo. Todas as determinações foram realizadas em duplicado e repetidas para cerca de 20% das amostras nas quais se obteve uma variação > 20%.

Série de casos

Recolheu-se amostras de fezes de 86 pacientes com cancro colorrectal primário na unidade de gastroenterologia e no departamento de cirurgia I do Morgagni Hospital, Forli

e nos departamentos de oncologia e de cirurgia geral do Infermi Hospital, Rimini. Recolheu-se amostras de fezes de 62 indivíduos que apresentaram resultados negativos para cancro ou para lesões benignas após colonoscopia e a partir de pessoal do laboratório.

As amostras foram obtidas pelo menos três dias após a administração de tratamentos laxativos de preparação para colonoscopia para permitir a recuperação do funcionamento normal do intestino. As amostras fecais foram imediatamente congeladas e armazenadas a -70°C durante um período máximo de dois meses.

O diagnóstico de cancro foi confirmado histologicamente e o estado patológico foi definido de acordo com a classificação de Dukes: 8 tumores receberam a classificação de estado A, 30 de estado B, 37 de estado C e 9 de estado D. Além disso, 19 cancros estavam localizados no cólon ascendente, 30 no cólon descendente, 2 no cólon transversal e 35 no tracto rectal. Apenas não foi disponibilizada a informação dos estados para dois casos.

Dos 86 pacientes, 42 eram do sexo masculino e 44 do sexo feminino e apresentavam uma idade média de 72 anos (intervalo de 36 a 90). Dos 62 indivíduos de controlo, 29 eram do sexo masculino e 33 do sexo feminino e apresentavam uma idade média de 51 anos (intervalo de 21 a 87).

Resultados

Os sinais de fluorescência estavam compreendidos entre 0 e 283 ng (média de 47 ng) nas fezes dos pacientes e compreendidos entre 0 e 87 ng (média de 4 ng) nas fezes de dadores saudáveis. Não foram observadas diferenças nos

valores médios no que diz respeito à idade dos pacientes e ao tamanho, ao local e ao estado do tumor.

Quando se comparam os resultados das duas abordagens, observa-se uma relação directa, mas com uma variabilidade ampla dos níveis de FL-ADN nos subgrupos definidos de acordo com o número de amplificações elevadas de L-ADN. Além disso, detectou-se a fluorescência pelo método FL-ADN em 33 dos 47 indivíduos que não apresentavam qualquer amplificação elevada no ensaio de L-ADN. Estes resultados constituem um claro indicador de uma sensibilidade superior do método de fluorescência em relação à abordagem convencional.

A análise da curva ROC dos níveis de FL-ADN (fig. 3) mostra uma boa precisão de diagnóstico desta abordagem. Em particular, observou-se uma especificidade bastante elevada compreendida entre 83% e 95% e uma sensibilidade elevada compreendida entre 82% e 72% para a maior parte dos cortes a 15, 20, 25 e 30 ng de ADN (quadro 1). Quando se analisou o corte de 25 ng, o qual proporciona o melhor resultado global em termos de precisão, relativamente às diferentes características do tumor, a sensibilidade permaneceu elevada em pacientes com tumores pequenos (70%) em comparação com tumores largos (82%) e obteve-se um resultado semelhante para os tumores com estados de Dukes diferentes (quadro 2). Mais importante, observou-se uma sensibilidade semelhante para a detecção de tumores localizados nos tractos do cólon ascendente e descendente.

Quadro 1. Sensibilidade e especificidade da análise de FL-

ADN

Níveis de ADN	DADORES SAUDÁVEIS		PACIENTES		Sensibilidade (%)	I.C. 95%	Especificidade (%)	I.C. 95%
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo				
Corte (ng)								
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)

Quadro 2. Sensibilidade* como função das diferentes características no cancro colorrectal

Categoria	Nº PACIENTES	POSITIVO	NEGATIVO	SENSIBILIDADE %
TAMANHO (cm)				
0,1-0,4	40	28	12	70
≥ 4,1	38	31	7	82
ESTADO DE DUKES				
A	8	7	1	88
B	29	25	4	86
C	37	25	12	68
D	9	8	1	89
LOCALIZAÇÃO				
Ascendente	18	13	5	72
Transversal	2	2	0	100
Descendente	30	22	8	73
Recto	35	28	7	80

* valor de corte igual a 25 ng

REFERÊNCIAS

(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.

(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.

(4) Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, et al., editors. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2000. Bethesda (MD): National Cancer Institute; 2003. Disponível em 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.

(6) Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, et al. 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, et al. 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.

(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, et al. 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.

(11) Puig P, Urgell E, Capella G, Sancho FJ, Pujol J, Boadas J, *et al.* 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.

(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, *et al.* Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 2002; 346: 311-20.

(16) Traverso G, Shuber A, Olsson L, Levin B, Johnson C, Hamilton SR, *et al.* 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, *et al.* Detecting colorectal cancer in stool with

the use of multiple genetic targets. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 858-65.

(19) Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, et al. 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, Lawson MJ, Yucaitis JA, Gage R, Orr T, Shuber AP, et al. Sensitivity and specificity of a stool DNA multitarget assay panel for the detection of advanced colorectal neoplasia. *Clin Colorectal Cancer* 2003; 3: 47-53.

(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.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> ISTITUTO ONCOLOGICO ROMAGNOLO COOPERATIVA SOCIALE A R.L.

<120> MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE TUMORES COLORRECTAIS

<130> 6988MEUR

<160> 16

<170> PatentIn versão 3.1

<210> 1

<211> 23

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 1

ctcttcctgc agtactcccc tgc 23

<210> 2
<211> 23
<212> ADN
<213> Desconhecido
<220>
<223> oligonucleótido sintético
<400> 2
gccccagctg ctcaccatcg cta 23

<210> 3
<211> 24
<212> ADN
<213> Desconhecido
<220>
<223> oligonucleótido sintético
<400> 3
gattgctctt aggtctggcc cctc 24

<210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> Desconhecido
<220>
<223> oligonucleótido sintético
<400> 4
ggccactgac aaccaccctt aacc 24

<210> 5
<211> 24
<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 5

gcggttgctc ctaggttggc tctg 24

<210> 6

<211> 23

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 6

caagtggctc ctgacctgga gtc 23

<210> 7

<211> 25

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 7

acctgatttc cttactgcct ctggc 25

<210> 8

<211> 25

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 8

gtcctgcttg cttacctcgc ttagt 25

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 9

aactaccatc cagcaacaga 20

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 10

taatttggca taaggcatag 20

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 11

cagttgaact ctggaaggca 20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Desconhecido
<220>
<223> oligonucleótido sintético
<400> 12
tgacacaaag actggcttac 20

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Desconhecido
<220>
<223> oligonucleótido sintético
<400> 13
gatgtaatca gacgacacag 20

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Desconhecido
<220>
<223> oligonucleótido sintético
<400> 14
ggcaatcgaa cgactctcaa 20

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Desconhecido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 15

cagtgatctt ccagatagcc 20

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 16

aaatggctca tcgaggctca 20

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pelo requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o IEP não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- US 20020004206 A [0006]
- US 5723298 A [0007]
- WO 0142502 A [0008]
- WO 02092858 A [0009]

Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção

- **Rengucci et al.** Clinical Cancer Research, 2001, vol. 7, 590-593 [0010]
- Incidence in five countries. IARC. Scientific Publications, 1997 [0035]
- **Boyle P.** Faecal occult blood testing (FOBT) as screening for colorectal cancer: the current controversy. Ann Oncol, 2002, vol. 13, 16-8 [0035]
- **Strul H; Arber N.** Fecal occult blood test for colorectal cancer screening. Ann Oncol, 2002, vol. 13, 51-6 [0035]
- SEER Cancer Statistics Review. National Cancer Institute, 2003 [0035]
- **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, vol. 53, 44-55 [0035]

- **Sidransky D; Tokino T; Hamilton SR; Kinzler KW; Levin B; Frost P et al.** Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science*, 1992, vol. 256, 102-5 [0035]

- **Hasegawa Y; Takeda S; Ichii S; Koizumi K; Maruyama M; Fujii A et al.** Detection of K-ras mutations in ADNs isolated from feces of patients with colorectal tumors by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Oncogene*, 1995, vol. 10, 1441-5 [0035]

- **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, vol. 36, 81-6 [0035]

- **Villa E; Dugani A; Rebecchi AM; Vignoli A; Grottola A; Buttafoco P et al.** Identification of subjects at risk for colorectal carcinoma through a test based on K-ras determination in the stool. *Gastroenterology*, 1996, vol. 110, 1346-53 [0035]

- **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, vol. 66, 332-6 [0035]

- **Puig P; Urgell E; Capella G; Sancho FJ; Pujol J; Boadas J et al.** A highly sensitive method for K-ras mutation detection is useful in diagnosis of gastrointestinal cancer. *Int J Cancer*, 2000, vol. 85, 73-7 [0035]

- **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, vol. 48, 428-35 [0035]

- **Eguchi S; Kohara N; Komuta K; Kanematsu T.** Mutations of the p53 gene in the stool of patients with resectable colorectal cancer. *Cancer*, 1996, vol. 77, 1707-10 [0035]
- **Deuter R; Muller O.** Detection of APC mutation in stool ADN of patients with colorectal cancer by HD-PCR. *Hum Mutat*, 1998, vol. 11, 84-9 [0035]
- **Traverso G; Shuber A; Levin B; Johnson C; Olsson L; Schoetz DJ Jr et al.** Detection of APC mutations in fecal ADN from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med*, 2002, vol. 346, 311-20 [0035]
- **Traverso G; Shuber A; Olsson L; Levin B; Johnson C; Hamilton SR et al.** Detection of proximal colorectal cancer through analysis of faecal ADN. *Lancet*, 2002, vol. 359, 403-4 [0035]
- **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, vol. 7, 590-3 [0035]
- **Dong SM; Traverso G; Johnson C; Geng L; Favis R; Boynton K et al.** Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *J Natl Cancer Inst*, 2001, vol. 93, 858-65 [0035]
- **Ahlquist DA; Skoletsky JE; Boynton KA; Harrington JJ; Mahoney DW; Pierceall WE et al.** Colorectal cancer screening by detection of altered human ADN in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology*, 2000, vol. 119, 1219-27 [0035]
- **Tagore KS; Lawson MJ; Yucaitis JA; Gage R; Orr T; Shuber AP et al.** Sensitivity and specificity of a stool ADN multitarget assay panel for the detection of advanced

colorectal neoplasia. *Clin Colorectal Cancer*, 2003, vol. 3, 47-53 [0035]

• **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, vol. 1, 377-83 [0035]

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a determinação da presença de tumores colorrectais ou de lesões pré-cancerígenas num sujeito humano, o qual compreende os seguintes passos:

a) extracção de ADN a partir de amostras de fezes;

b) amplificação por PCR de 8 fragmentos diferentes de ADN que abrangem regiões diferentes dos genes p53 e APC, utilizando trifosfatos de desoxinucleótido ou iniciadores marcados com moléculas fluorescentes, em que os fragmentos de p53 que correspondem aos exões 5-8 são amplificados utilizando os pares de iniciadores seguintes:

(i) ctcttcctgcagtactcccctgc; gcccagctgctcaccatcgcta;

(ii) gattgctcttaggtctggcccctc; ggccactgacaaccacccttaacc;

(iii) gcgttgctccttaggttgctctg; caagtggctcctgacctggagtc;

(iv) acctgatttccttactgcctctggc; gtctgcttgcttacctcgcttagt;

e os fragmentos de APC são amplificados utilizando os pares de iniciadores seguintes:

(i) aactaccatccagcaacaga; taatttggcataaggcatag;

(ii) cagttgaactctggaaggca; tgacacaaagactggcttac;

(iii) gatgtaatcagacgacacag; ggcaatcgaacgactctcaa;

(iv) cagtgatcttccagatagcc; aaatggctcatcgaggctca

c) quantificação dos fragmentos amplificados (amplicões);

d) cálculo da quantidade total de amplicões;

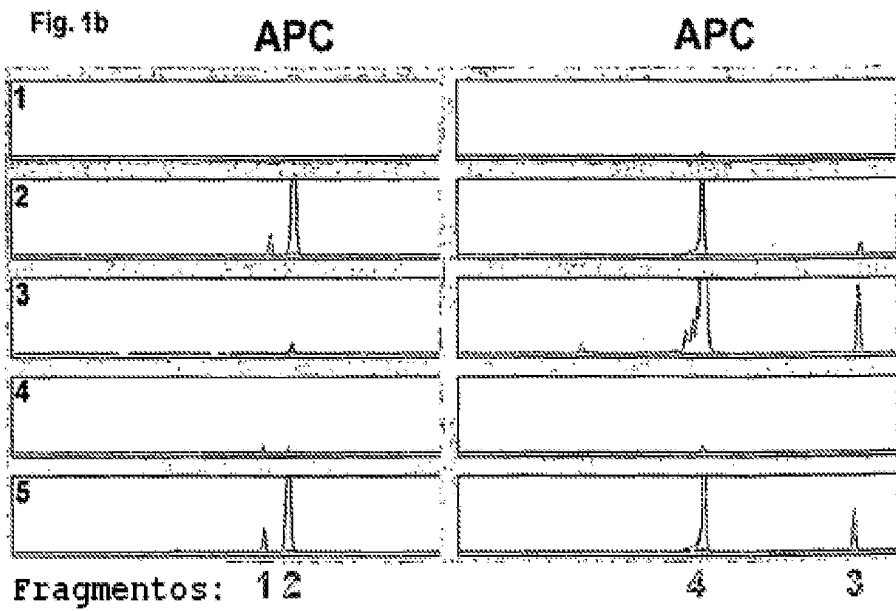
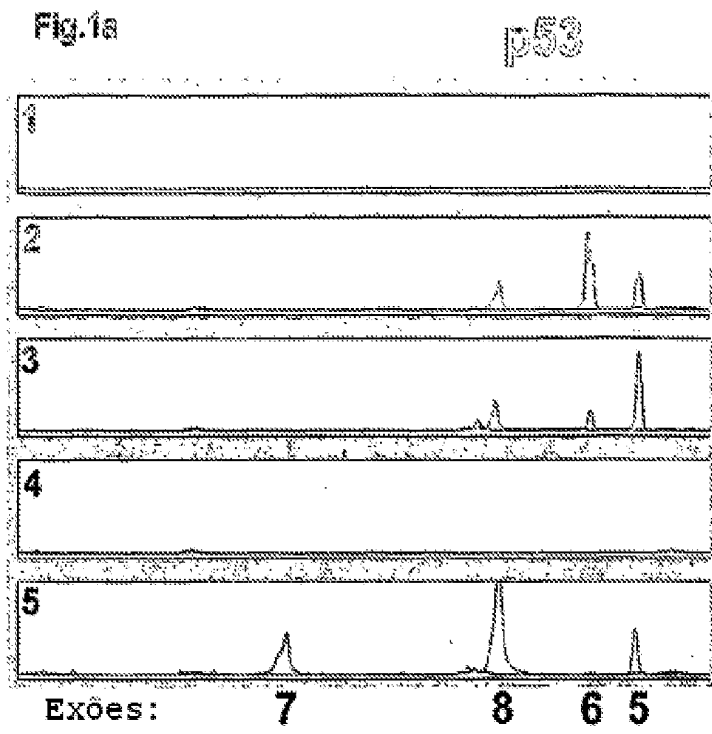
e) comparação dos valores obtidos em (d) com um valor de referência, em que o valor de referência é determinado com base em séries de casos que compreende pacientes saudáveis e pacientes que padecem de tumores ou lesões colorrectais.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as referidas moléculas fluorescentes são seleccionadas entre HEX, 6-FAM e TAMRA.

3. Método de acordo com uma das reivindicações 1 a 2, em que as quantidades de amplicões são interpoladas numa curva de calibração obtida a partir de quantidades de ADN conhecidas.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que os amplicões são quantificados utilizando um sequenciador/ /analizador automático ou utilizando sistemas de detecção fluorimétricos, colorimétricos, radioactivos ou espectrofotométricos.

5. Kit que contém os iniciadores de acordo com a reivindicação 1 marcados com moléculas fluorescentes de acordo com a reivindicação 2, uma ADN polimerase termoestável e instruções para o utilizador realizar o método de acordo com as reivindicações 1 a 4.



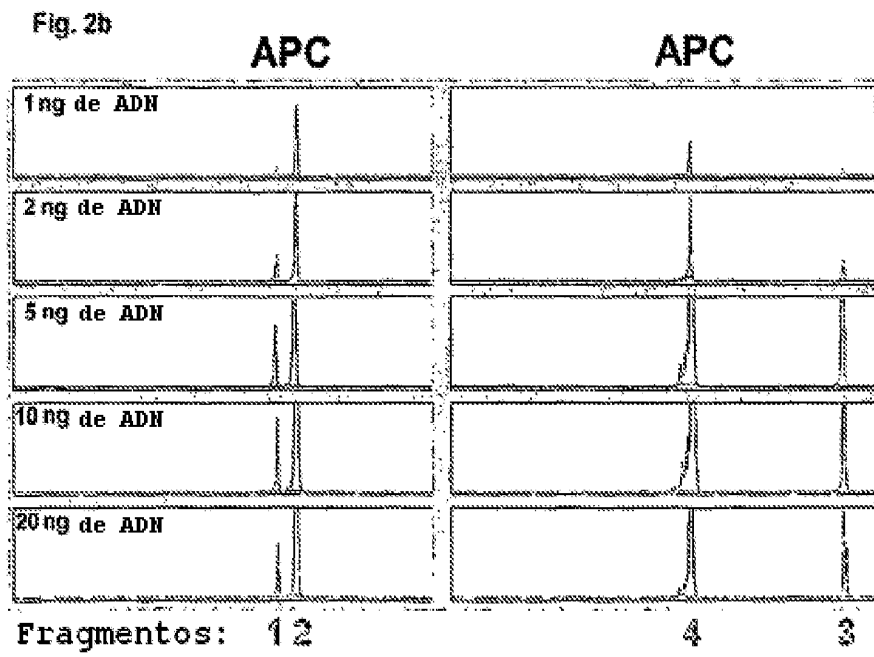
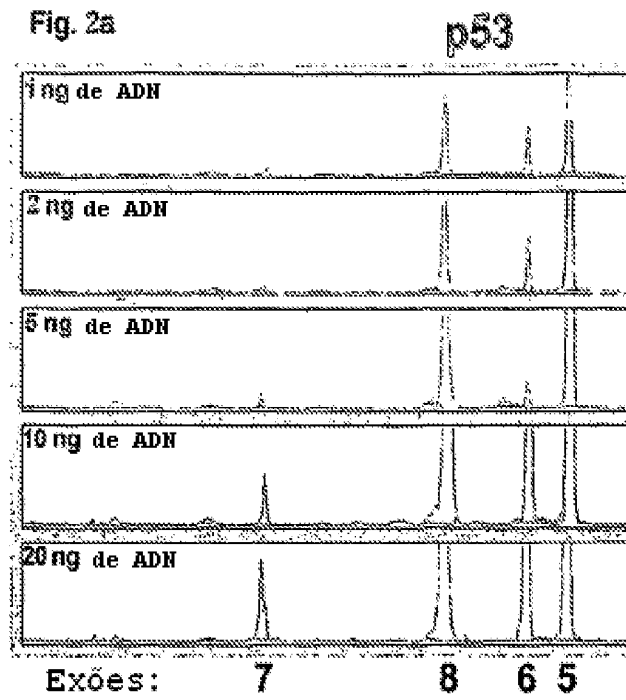


Fig. 2c

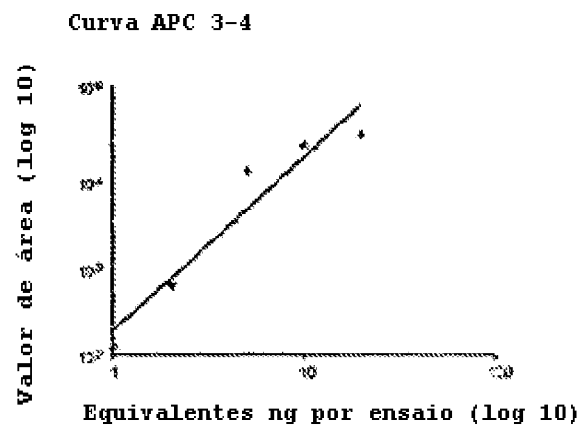
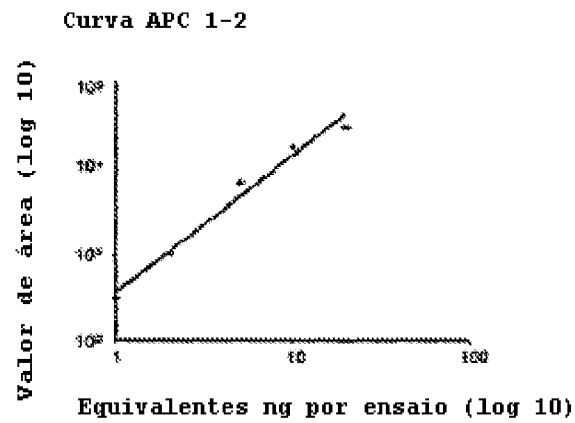
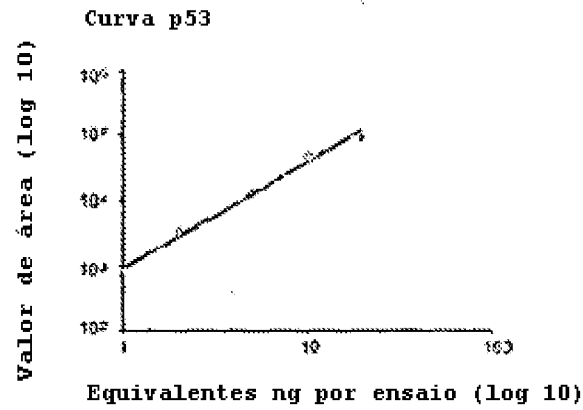


Fig. 3

