

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 244 308**

21 Número de solicitud: 200400119

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

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **21.01.2004**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2005**

Fecha de la concesión: **23.01.2007**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2007**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.02.2007

73 Titular/es: **ORYZON GENOMICS, S.A.**
c/ J. Samitier, 1-5
08028 Barcelona, ES

72 Inventor/es: **Buesa Arjol, Carlos y**
Schwartz Navarro, Simó

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

54 Título: **Método de diagnóstico molecular y tratamiento en cáncer colorrectal esporádico inestable.**

57 Resumen:

Método de diagnóstico molecular y tratamiento en cáncer colorrectal esporádico inestable.

La presente invención describe un método de diagnóstico molecular y tratamiento en cáncer colorrectal esporádico inestable basado en que los tumores HNPCC asociados a mutaciones de MLH1 o MSH2 resultan todos negativos para la mutación V599E mientras que esta mutación está presente en aproximadamente la mitad de los tumores esporádicos, permitiendo descartar cáncer HNPCC asociado a mutaciones de MLH1 o MSH2 y evitando el laborioso análisis de detección en estos genes. La presente invención tiene aplicación en el diagnóstico y prevención del cáncer colorrectal esporádico.

ES 2 244 308 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico molecular y tratamiento en cáncer colorrectal esporádico inestable.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico molecular entre las formas esporádicas y las familiares de HPNCC en pacientes de cáncer colorrectal que puede ser utilizado como criterio de diagnóstico de dichos tumores así como en la prevención y tratamiento de los mismos.

10 **Antecedentes de la invención**

En términos absolutos, el cáncer es la segunda causa de muerte en España. De entre los múltiples tipos de cáncer destaca el cáncer colorrectal que causó el 11% de las defunciones por cáncer en hombres y el 15% en mujeres según los datos de 1999.

El riesgo acumulativo durante la vida de contraer la enfermedad es del 5-6%, estando influenciado por hábitos de vida y factores hereditarios. La forma de cáncer colorrectal más frecuente es el de tipo esporádico (80%) existiendo casos con componentes hereditarios: la poliposis adenomatosa familiar (FAP) (0,01%) y el cáncer colorrectal hereditario no-polipósico (HNPCC) (5-10%) (Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology*. 1993 May; 104(5): 1535-49. Review), en el que los individuos afectados desarrollan en fases intermedias - tempranas de su vida (antes de los 50 años) tumores de colon, estómago, ovario, endometrio y en otros órganos.

Los principales factores genéticos han podido ser determinados en los síndromes hereditarios, tanto de la poliposis familiar como en el síndrome hereditario del cáncer colorrectal no polipósico, así como en el cáncer colorrectal esporádico. El desarrollo tumoral colorrectal es posiblemente la consecuencia de una serie de eventos moleculares que se inician con una o varias mutaciones o eventos epigenéticos y sigue con fenómenos de progresión, en los que pueden estar involucrados factores tanto genéticos como ambientales.

Recientemente se han caracterizado varias alteraciones genéticas relacionadas con el desarrollo de cáncer colorrectal, tanto en los síndromes familiares como en cánceres esporádicos. Así, el gen APC se ha localizado en el brazo largo del cromosoma 5 y relacionado con la FAP y la mayoría de cánceres esporádicos, mientras que, por otra parte, se han identificado los genes MLH1 y MSH2, como principales responsables del HNPCC. Por otra parte, también se han identificado activaciones por mutación puntual de oncogenes como el *k-ras* o aumento de la expresión del RNA mensajero del oncogen *c-myc* y pérdidas específicas del material de genes supresores, específicamente los localizados en los cromosomas 5 (APC) y 17 (p53), en especial en casos esporádicos.

Clínicamente el HNPCC se define principalmente por su inicio temprano (< 50 a) y por la presencia de cánceres en familiares de primer grado en al menos dos generaciones contiguas. Los criterios clínicos están recogidos en los denominados criterios de Amsterdam I, II y Bethesda (Vasen HFA, Mecklin J-P, Khan PM, Lynch HT. The international collaborative group on Hereditary Nonpolyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis. Colon Rectum* 1991;34:424-5; Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999 Jun; 116(6): 1453-6; Rodríguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*. 1997 Dec 3; 89(23): 1758-62). Las investigaciones llevadas a cabo mostraron que los tumores HNPCC se caracterizaban por la presencia de alteraciones somáticas en numerosas secuencias de microsatélites, que consistían en repeticiones de uno, dos o más nucleótidos (Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS *et al*. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-6.). Otros estudios mostraron que un subgrupo similar de tumores esporádicos (15%) mostraban también inserciones o deleciones en secuencias simples repetitivas, particularmente microsatélites (Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61; Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9; Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS *et al*. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-6.). Estos tumores esporádicos mostraban características comunes con aquéllos que se desarrollaban en el síndrome de Lynch o HNPCC. Estos datos sugerían que los tumores HNPCC y cierto subgrupo de tumores esporádicos estaban asociados con un defecto que producía errores de replicación de DNA y ocasionaba alteraciones o inestabilidad en los microsatélites (Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61; Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS *et al*. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-6.).

Más tarde se observó que la alteración causada por disfunción de los genes reparadores de DNA (mismatch repair system o MMR) *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* producía la inestabilidad de microsatélites (MSI-H) en los tumores de los pacientes con síndrome de Lynch (Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*. 1993 Sep 16; 365(6443): 274-6;

Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, *et al.* Microsatellite instability is associated with tumors that characterise the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993;53:5853-5; Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9). A pesar de que el 90% de las mutaciones descritas en HNPCC hasta el momento afectan a los genes *MLH1* y *MSH2*, sin embargo, estas mutaciones sólo están presentes en aproximadamente un 50% de los casos de HNPCC.

Esto ha hecho que las estrategias de diagnóstico de HNPCC se basen tanto en criterios clínicos como en moleculares, siendo la detección de MSI-H un punto importante de inclusión en los programas de consejo genético. Sin embargo, debido a los problemas de costes y tiempo no se ha considerado efectivo realizar análisis de detección de MSI-H en todos los pacientes de cáncer colorrectal. A pesar de todo esto, si exceptuamos el inicio temprano y los antecedentes familiares, los tumores HNPCC y los MSI-esporádicos son virtualmente indistinguibles y la distinción entre ambos pasa por la laboriosa secuenciación de los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*.

Recientemente, (Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA (2002) Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* 417:949-54) se ha descubierto que el oncogén *BRAF* (B-Raf proto-oncogen serine/threonine-protein kinase (EC 2.7.1.-) (p94) (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)) está activado por mutación en un 70% de melanomas, 10% de cánceres colorrectales y un subconjunto menor de otros tumores. La forma activada de *BRAF* presenta un sitio puntual preferencial de mutación (hotspot: V599E), representado por un cambio de base en la posición 1796 del cDNA: A → T que resulta en una sustitución del aminoácido 599 que pasa a ser ácido glutámico en vez de la valina original. Esta mutación representa el 80% de las formas mutadas de *BRAF* y tiene una actividad quinasa aumentada y propiedades transformantes en células NIH3T3. También recientemente (Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. *RAF/RAS* oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418:934) se ha demostrado una asociación entre V599E y los tumores de colon con déficit de reparación, es decir, inestables para microsatélites (MSI-H). No obstante, se ha descrito que las mutaciones de *BRAF* en cáncer de colon no son atribuibles a defectos en el sistema de MMR (Wang L, Cunningham JM, Winters JL, *et al.* *BRAF* mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res* 2003;63:5209-12), por lo que su implicación en el HNPCC es un interrogante y está por determinar.

Por lo tanto, existe una necesidad en el estado del arte de identificar nuevos genes y/o mutaciones responsables y/o indicadores de los cánceres HNPCC versus MSI-esporádicos.

La identificación de este/estos genes y sus posibles mutaciones permitiría un diagnóstico molecular selectivo y rápido entre cáncer MSI esporádico y cáncer HNPCC que permitiría incluirlo en la práctica clínica habitual y realizar un tipado molecular universal de los tumores colorrectales diagnosticados.

Al mismo tiempo produciría un ahorro de costes sanitarios y tiempos de espera inferiores al limitar la secuenciación de los genes responsables de MMR a aquellos casos negativos.

También permitiría la adopción de nuevos criterios pronósticos y de orientación terapéutica en los casos positivos ya que permitiría adaptar las terapias actuales y personalizarlas a aquellos casos en los que el carácter hereditario queda indicado de forma temprana.

Finalmente permitiría el diseño de terapias selectivas destinadas a inactivar estos genes.

50 Descripción de la invención

La presente invención tiene por objeto un método de diagnóstico de cáncer colorrectal que comprende analizar una muestra para determinar la presencia de una mutación puntual V599E en el gen *BRAF* cuya presencia permite descartar la naturaleza hereditaria del cáncer colorrectal como cáncer hereditario no polipósico (HNPCC) asociado a mutaciones de *MLH1* o *MSH2* u otras de otros genes reparadores del DNA e identificar el tumor molecularmente como MSI-H esporádico.

En particular, dicha muestra puede ser DNA o RNA y puede aislarse a partir de células de tumor obtenidas por biopsia o cualquier otro método de extracción. Opcionalmente, la muestra analizada puede ser la proteína codificada por dicho gen o fragmentos de la misma.

El método de diagnóstico de la presente invención comprende adicionalmente una detección mediante una amplificación por PCR, SDA o cualquier otro método de amplificación de DNA. En particular, dicha amplificación se realiza mediante el uso de cebadores alelo-específicos.

Optativamente, la detección se puede llevar a cabo mediante secuenciación del DNA, por biochips de DNA realizados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo, por biochips de DNA realizados con oligonucleótidos

ES 2 244 308 B1

sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo, por análisis conformacional del polimorfismo (SSCP) u otros métodos basados en el análisis conformacional o por análisis de restricción enzimática.

5 La presente invención también tiene por objeto proporcionar una molécula de DNA que cuando se encuentra mutada de forma específica permite clasificar el tumor como cáncer esporádico MSI-H, descartando el síndrome hereditario del cáncer colorrectal no polipósico HNPCC o síndrome de Lynch.

10 La presente invención tiene también por objeto adicional proporcionar un método de análisis de pronóstico en la evolución del cáncer colorrectal esporádico inestable diferenciado del resto de los cánceres colorrectales esporádicos basado en la determinación de la actividad de la forma V599E del gen *BRAF* en tumores colorrectales MSI-H. El método de diagnóstico de la presente invención también tiene por objetivo el establecimiento de una estrategia terapéutica personalizada para el cáncer colorrectal esporádico inestable.

15 Por otra parte, la presente invención tiene también por objetivo adicional proporcionar un método de análisis de compuestos para identificar agentes terapéuticos basados en la determinación de la actividad de la forma V599E del gen *BRAF* en tumores colorrectales MSI-H.

20 También es objeto de la presente invención el uso de compuestos para eliminar la actividad de la forma V599E de *BRAF* en el tumor colorrectal esporádico para detener o revertir la progresión de este tipo de tumores.

La presente invención tiene asimismo por objetivo adicional proporcionar un compuesto farmacéutico basado en interferencia de RNA para inhibir la actividad de la forma V599E del gen *BRAF* en tumores colorrectales MSI-H.

25 Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un compuesto farmacéutico basado en oligonucleótidos anti-sentido para inhibir la actividad de la forma V599E del gen *BRAF* en tumores colorrectales MSI-H.

La presente invención también tiene por objeto adicional proporcionar un compuesto basado en interferir la replicación o traducción de la forma V599E del gen *BRAF* en tumores colorrectales MSI-H.

30 Asimismo, la presente invención tiene por objeto proporcionar un compuesto basado en compuestos que inhiben de forma selectiva la actividad serina-treonina quinasa de la forma V599E *BRAF* en tumores colorrectales esporádicos MSI-H.

35 La presente invención está basada en que una forma mutada del oncogén humano *BRAF* está siempre ausente de los tumores colorrectales que se desarrollan en el Síndrome de Lynch (HNPCC). Esta forma mutada en el nucleótido 1796 A→ T implica un cambio de aminoácido de valina a un glutámico y comporta la activación constitutiva de la actividad Serina-Treonina quinasa de *BRAF*. Esta mutación ha sido descrita con anterioridad como presente de forma extensiva en melanomas, algunos cánceres colorrectales y otros tumores siendo una mutación preferencial (hotspot) que representa hasta el 92% de las mutaciones de sustitución en este gen.

40 Al mismo tiempo, los datos disponibles demuestran que esta mutación V599E se halla presente en, aproximadamente, la mitad de los tumores colorrectales esporádicos que presentan elevada inestabilidad de microsatélites (MSI-H).

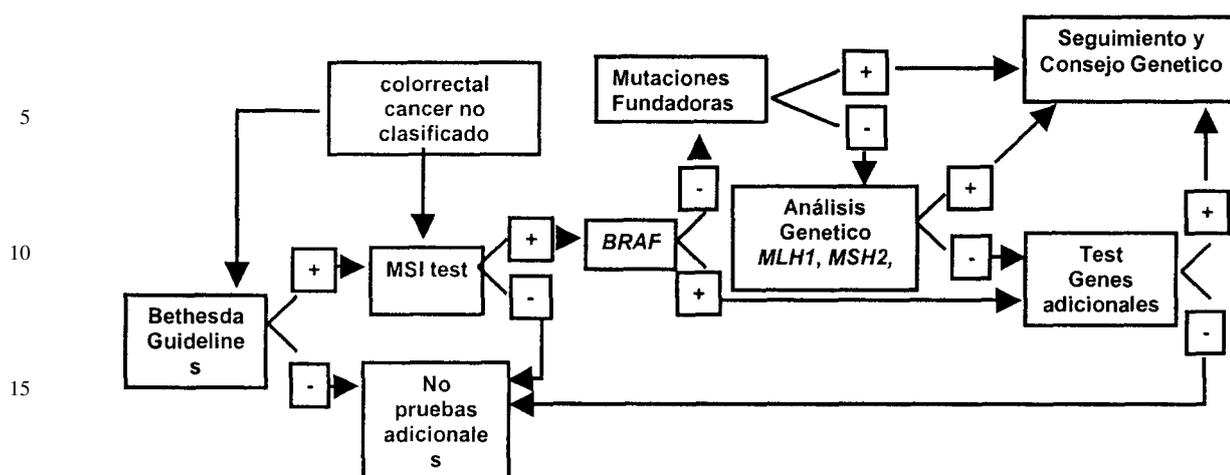
45 Los tumores colorrectales esporádicos y hereditarios tipo HNPCC son prácticamente indistinguibles histológica y patológicamente. El síndrome HNPCC se manifiesta por la aparición de tumores a temprana edad, la existencia de al menos dos familiares de primer grado que han desarrollado tumores y la presencia de elevada inestabilidad de microsatélites o MSI-H. A pesar de esto, los datos clínico-familiares no son siempre claros ya que alrededor de un 20% de las familias con mutaciones germinales no cumplen los criterios de Amsterdam. La distinción molecular es muy compleja, especialmente porque también hay un subconjunto significativo de tumores esporádicos con MSI-H (aproximadamente un 15%).

55 Por lo tanto, la presente invención demuestra una disociación total de los tumores HNPCC y la mutación V599E de *BRAF*, que está presente en la mitad de los tumores colorrectales esporádicos que presentan elevada inestabilidad de microsatélites (MSI-H) lo que supone disponer por vez primera de una herramienta molecular gracias a la cual pequeños cambios genotípicos permiten distinguir de forma totalmente clara ambos tipos de tumores.

60 Actualmente, los enfermos con criterios de Amsterdam son primero analizados para MSI-H y, en el caso de dar un resultado positivo, son posteriormente analizados para *MLH-1* y *MSH-2* y, de ser estos resultados negativos, analizados para *MSH-6*.

De acuerdo con el método de diagnóstico de la presente invención las pautas de análisis de tumores colorrectales no seleccionados quedarían de la siguiente forma:

65



De esta forma, un paciente que tiene un tumor colorrectal diagnosticado por una biopsia y con una apreciación clínica-familiar no definitiva sería sometido a pruebas preliminares de MSI-H. De ser positivo el resultado se procede a una amplificación por PCR o similar utilizando los siguientes cebadores específicos para el exon 15 del gen *BRAF* sobre DNA genómico:

Cebador directo 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3'

Cebador reverso 5'-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3'

También se contempla como parte de la presente invención el uso de una terapia antineoplásica dirigida de forma específica a los pacientes con cáncer colorrectal esporádico inestable que muestran la forma activada V599E *BRAF*. Esta terapia combina cualquier protocolo terapéutico estándar al que el paciente puede acabar desarrollando resistencia junto con una terapia específica anti*BRAF*. Ejemplos de terapias antitumorales estándar son tratamientos hormonales, con radiaciones ionizantes, con fármacos citotóxicos y/o citostáticos, con anticuerpos etc.. La terapia anti-*BRAF* comienza por determinar la presencia de la mutación V599E en la masa tumoral u otra muestra corporal. La inactivación de la vía mitogénica activada por V599E *BRAF* puede suponer la contención y/o regresión de la masa tumoral. El proceso de oncogénesis ocurre a través de la adquisición y selección de mutaciones somáticas múltiples cada una de las cuales contribuye a la supervivencia y expansión del tumor. El comportamiento maligno del tumor puede ser mitigado o revertido mediante la disminución selectiva de dichos oncogenes. Las aproximaciones de inhibición químicas o por anticuerpos se han probado con cierto éxito con la beta- catenina en el cancer colorrectal y con BCR-ABL en leucemia mieloide crónica. Así, estas observaciones sugieren que ciertos oncogenes podrían ser susceptibles de una disrupción provocando la caída del fenotipo tumoral o permitiendo la eficacia del tratamiento estándar combinado. De entre los mecanismos de disrupción génica disponibles, la interferencia por RNAs de pequeño tamaño (RNAi) es una de las aproximaciones más prometedoras, inicialmente descubierto en petunias (Napoli C, Lemieux C, and Jorgensen R. (1990) Introduction of a chalcone synthase gene into Petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289) su mecanismo molecular de acción ha sido descrito (Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. (2001) Post-transcriptional Gene Silencing by Double-stranded RNA. *Nature Rev Gen* 2: 110-119) y ha suscitado una gran expectativa en sus aplicaciones antitumorales (Kittler R, Buchholz F. RNA interference: gene silencing in the fast lane. *Semin Cancer Biol.* 2003 Aug;13(4):259-65; Deveraux QL, Aza-Blanc P, Wagner KW, Bauerschlag D, Cooke MP, Hampton GM. Exposing oncogenic dependencies for cancer drug target discovery and validation using RNAi. *Semin Cancer Biol.* 2003 Aug;13(4):293-300; Bedford JS, Liber HL Applications of RNA interference for studies in DNA damage processing, genome stability, mutagenesis, and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2003 Aug;13(4):301-8).

Un ejemplo de este efecto puede postularse con líneas celulares de origen tumoral colorrectal que muestran un genotipo K-RAS negativo *BRAF* positivo. Un ejemplo de estas líneas son las Linea

Linia RKO, con capacidad clonogénica. Ref. *J Biol Chem.* 2002 May 24;277(21):19156-65.

Linia HT29, con capacidad clonogénica.: Ref. *Br J Cancer.* 2003 Dec 15;89(12):2277-83.

Para un tratamiento específico con RNA de interferencia de pequeño tamaño (21-mers) hay que seleccionar secuencias específicas dentro del cDNA para su uso como diana anti-*BRAF*. Las secuencias candidatas son comparadas mediante algoritmos BLAST o similares para eliminar aquellas que no son únicas. En la tabla siguiente se describen como ejemplo algunas de las dianas posibles en el cDNA

ES 2 244 308 B1

| | |
|-----|-----------------------|
| 1. | ATGGATTACTTACACGCCAAG |
| 2. | CTCCAGCTTGTATCACCATCT |
| 3. | ATGAAGAGATTAATGGCAGAG |
| 4. | GGCTCACTAACTAACGTGAAA |
| 5. | GGCAACGAGACCGATCCTCAT |
| 6. | CCACCATCAATATATCTGGAG |
| 7. | GTGTGGAGTTACAGTCCGAGA |
| 8. | TCTCGCCTCTATTGAGCTGCT |
| 9. | GAGGCGTCCTTAGCAGAGACT |
| 10. | ATTGCACGACAGACTGCACAG |

Las células tumorales en cultivo son conocidas por su pérdida de inhibición por contacto lo que las hace crecer a confluencia en un cultivo y posteriormente formar agregaciones que continúan creciendo en tres dimensiones (foci) Estos foci mimetizan de alguna forma el crecimiento tumoral. En un experimento tipo las células RKO o HT29 cultivadas en condiciones estándar en medio de Dulbecco modificación de Eagle (DMEM) suplementado con 10% fetal calf serum (FCS), 100 unidades/ml de penicilina, y 100 $\mu\text{g/ml}$ of streptomycin, bajo 5% CO_2 forman foci. Por el contrario, las células tratadas con los RNAi no muestran una capacidad para formar estos foci y muestran una tasa de crecimiento diferente de las células sin tratar.

También se contempla como parte de la presente invención el uso de la forma activada V599E *BRAF* para realizar análisis de compuestos terapéuticos y/o composiciones farmacéuticas que puedan remediar el potencial oncogénico de *BRAF* en cáncer colorrectal esporádico inestable. Estos compuestos terapéuticos y/o composiciones farmacéuticas pueden unirse a la proteína *BRAF* mutada y restaurar la actividad normal de la misma. De forma alternativa, estos compuestos terapéuticos y/o composiciones farmacéuticas pueden modificar la expresión de vías de señalización celular alternativas que pueden compensar la activación incontrolada de *BRAF*. Los análisis de compuestos terapéuticos y/o composiciones farmacéuticas pueden realizarse de forma comparativa por análisis de aplicación directa a las células normales y células con la versión activada del oncogén. Estas células pueden ser una línea celular proveniente de un tumor colorrectal o de otro tipo de tumor y con un genotipo similar al encontrado en los tumores extirpados (por ejemplo *K-Ras-BRAF+*) y que pueda suponer un razonable modelo biológico para el estudio de la progresión/regresión tumoral. Alternativamente estas células pueden obtenerse directamente de tumores extraídos y puestas en cultivo.

Breve descripción de las figuras

Figura 1A. Gel de agarosa en bromuro de etidio de los productos de PCR de *BRAF* posteriormente utilizados en los gels SSCP.

M: marcador de peso molecular. Tamaños indicados en el lateral.

C-: control negativo sin mutación en *BRAF* (línea celular tumoral).

C+: control positivo con la mutación V599E (línea celular tumoral). La flecha indica el tamaño esperado para *BRAF*.

Se muestran ejemplos de los casos HNPCC asociados a *MLH1* (carriles 4 a 9) y de los casos HNPCC asociados a *MSH2* (carriles 10 a 15). Se observa que el tamaño de los fragmentos de PCR corresponde al esperado de acuerdo con los cebadores de *BRAF* utilizados para la amplificación.

Figura 1B. Detección por polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) de los casos HNPCC con mutaciones germinales de *MLH1* y *MSH2* analizados por movilidad mediante un gel radiactivo vertical no desnaturizante. En esta figura se muestran los amplicones obtenidos a partir de tumores colorrectales HNPCC asociados a *MLH1* (carriles 4-9) y a *MSH2* (carriles 10-15) junto con los controles positivos (C+) y negativos (C-). La flecha indica las bandas alteradas debidas a *BRAF-V599E*.

Descripción de una realización preferente

A continuación se describe una realización preferente, aunque no limitativa, de la invención.

Amplificación de muestras de DNA obtenidas a partir de tumores colorrectales previamente clasificados como HNPCC

La reacción de amplificación de muestras de DNA obtenidas a partir de tumores colorrectales previamente clasificados como HNPCC se llevó a cabo sobre DNA genómico utilizando cebadores específicos para el exon 15 del gen *BRAF*, como por ejemplo el cebador directo identificado como SEQ. ID 1 y el cebador reverso identificado como

ES 2 244 308 B1

SEQ. ID 2, partiendo de unos 50 ng de molde y un ciclo con una fase de desnaturalización de 30 s. a 94°C seguida de un anillamiento durante 20 s. a 60°C y una posterior extensión de 30 s. a 72°C. Este ciclo se repitió durante 30 ó 35 veces. Como se observa en la figura 1A, los fragmentos amplificados presentaban el tamaño esperado de acuerdo con los cebadores utilizados. Posteriormente el producto de PCR se purificó mediante un kit de purificación de productos de amplificación Wizard™ PCR Preps DNA Purification System de Promega y posteriormente se secuenció siguiendo las instrucciones del kit ABI prism Dye terminator de Perkin Elmer.

Una secuencia de pasos similar puede realizarse a partir de RNA previo paso de construcción de una 1ª cadena complementaria de cDNA utilizando una mezcla de cebadores hexámeros-aleatorios que priman de forma estadística todos los mensajeros de la célula y añadiendo los mononucleótidos y un tampón necesario para la acción de la enzima Transcriptasa Reversa. A partir de la construcción de la primera cadena de DNA complementario se puede amplificar un fragmento de cDNA de *BRAF* conteniendo la zona de mutación preferencial empleando en este caso oligonucleótidos cebadores adaptados al molde sin intrones.

Detección por polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) de los diferentes tumores colorrectales previamente clasificados como HNPCC

El análisis del producto de amplificación obtenido puede llevarse a cabo por secuenciación directa o por SSCP y secuenciación de los amplicones con polimorfismos. Cuando están presentes los polimorfismos provocan un cambio conformacional que redundante en una diferente velocidad de migración. En la figura 1B se muestran los amplicones que se obtuvieron a partir de tumores colorrectales HNPCC asociados a MLH1 y a MSH2 y se analizaron por movilidad mediante un gel radiactivo vertical no desnaturizante. Como puede observarse, todos los casos eran negativos para V599E.

BRAF se amplificó por PCR utilizando el mismo protocolo mencionado anteriormente, pero añadiendo isótopos radioactivos, concretamente alfa-³²P dCTP. El producto de reacción se resolvió previa desnaturalización a 95°C, en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 5% en el sistema mutation detection enhancement gels (MDE - Flowgen, Rockland, ME, USA), a 8°C durante 16 horas. Se procedió a su secado a 80°C durante 1 hora y a su exposición autoradiográfica y revelado posterior, a las 24 horas. Las bandas PCR alteradas se purificaron posteriormente y se secuenciaron en un ABI Prism 377 automatic sequencer (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) usando ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer).

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de análisis molecular para descartar la naturaleza hereditaria del cáncer colorrectal con inestabilidad de
microsatélites, **caracterizado** porque comprende analizar una muestra para determinar la presencia de una mutación
puntual T1796A en el gen *BRAF* que resulta en la mutación V599E en la proteína *BRAF* cuya presencia permite
descartar la naturaleza hereditaria del cáncer colorrectal como cáncer hereditario no polipósico (HNPCC) asociado
a mutaciones de *MLH1* o *MSH2* u otras de otros genes reparadores del DNA e identificar el tumor molecularmente
como MSI-H esporádico.
- 10 2. Método de análisis molecular según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la muestra es aislada de células
de tumor obtenidas por biopsia o cualquier otro método de extracción.
- 15 3. Método de análisis molecular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque la muestra a
analizar es DNA.
- 20 4. Método de análisis molecular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque la muestra a
analizar es RNA.
- 25 5. Método de análisis molecular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque se realiza
una detección mediante una amplificación por PCR, SDA o cualquier otro método de amplificación de DNA.
- 30 6. Método de análisis molecular según la reivindicación 5, **caracterizado** porque la amplificación se realiza me-
diante el uso de cebadores alelo-específicos.
- 35 7. Método de análisis molecular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque se lleva a
cabo una detección por secuenciación del DNA.
- 40 8. Método de análisis molecular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque se lleva a
cabo una detección por biochips de DNA realizados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo.
- 45 9. Método de análisis molecular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque se lleva a
cabo una detección por biochips de DNA realizados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía
o por cualquier otro mecanismo.
- 50 10. Método de análisis molecular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque se lleva
a cabo una detección por análisis conformacional del polimorfismo (SSCP) u otros métodos basados en el análisis
conformacional.
- 55 11. Método de análisis molecular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque se lleva a
cabo una detección por análisis de restricción enzimática.
- 60 12. Método de análisis molecular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque la muestra
analizada es la proteína codificada por dicho gen o fragmentos de la misma.
- 65 13. Método de análisis de compuestos con potencialidad terapéutica en cáncer de colon que comprende determinar
la capacidad de dichos compuestos de disminuir la actividad quinasa de la forma mutada V599E de la proteína BRAF
que se encuentra aumentada en el tumor colorrectal esporádico con relación a la actividad de la proteína no mutada.

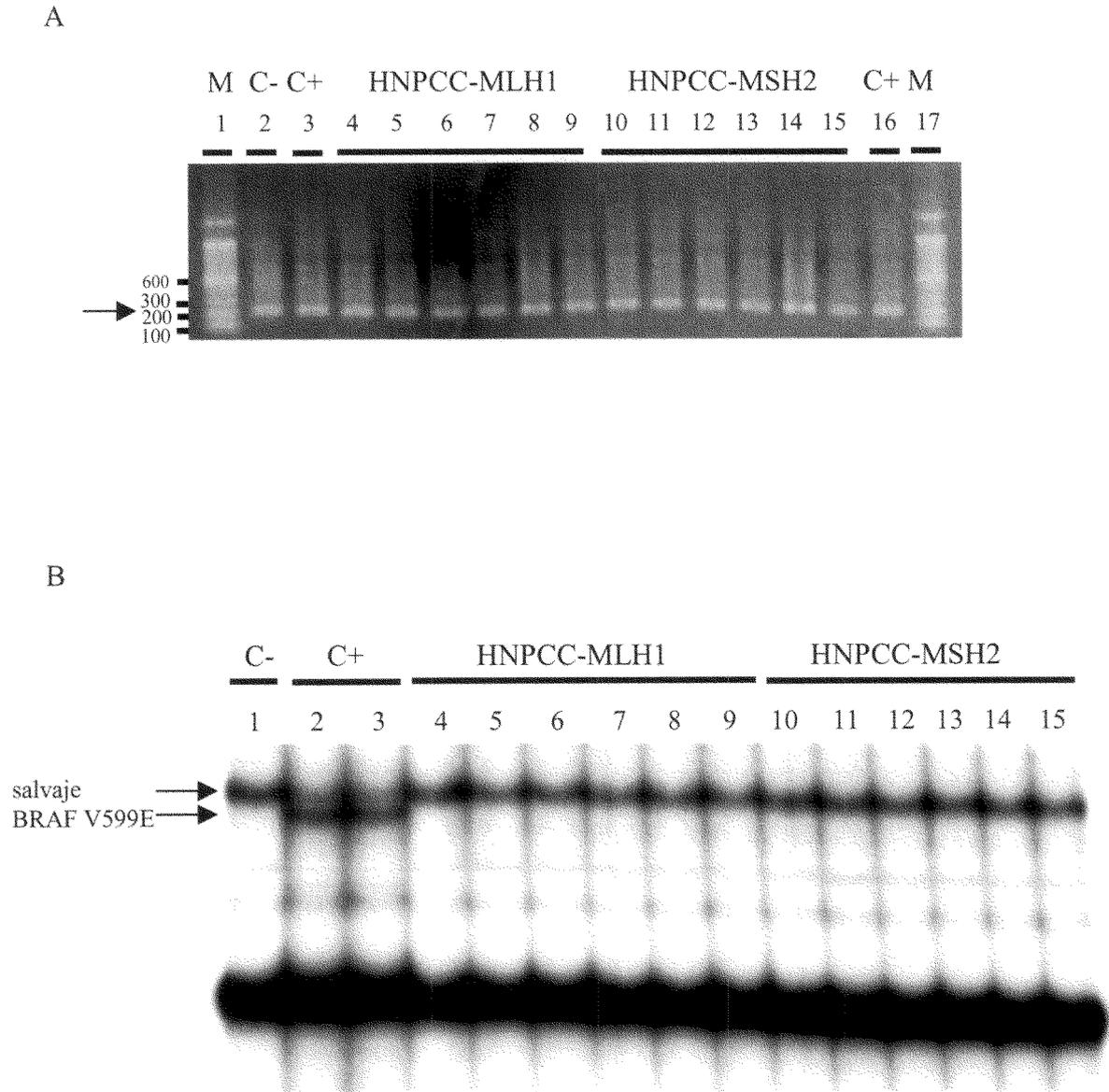


Fig. 1

A

```

1  cgctcccg  cccctcccc  gccgcacgc  ggcgctcgg  gcccggctc  tcggtataa
61 gatggcgcg  ctgagcggg  cgggtgggt  cggcgcgag  ccgggccag  ctctgtcaa
121 cggggacat  gagcccagg  cggcgcgcg  cgccggcgc  gcggcctct  cggtgcgga
181 ccctgccatt  cgggaggag  tgtggaatat  caaacaatg  attaatgta  cacaggaaca
241 tatagaggcc  ctattggaca  aatttgggt  ggagcataat  ccaccatcaa  tatactgga
301 ggctatgaa  gaatacacca  gcaagctaga  tgcactcaa  caaagagaac  aacagttatt
361 ggaatctct  gggaacggaa  ctgattttt  tgtttctagc  tctgcatcaa  tggataccgt
421 tacatcttct  tcctcttcta  gcctttcagt  gctaccttca  tctctttcag  tttttcaaaa
481 tcccacagat  gtggcacgga  gcaaccccaa  gtcaccacaa  aaacctatcg  ttagagtctt
541 cctgcccac  aaacagagga  cagtggacc  tgcaagggt  ggagttacag  tccgagacag
601 tctaaagaaa  gactgatga  tgagaggct  aatcccagag  tgctgtgct  tttacagaat
661 tcaggatgga  gagaagaaac  caattggtg  ggacactgat  atttctggc  ttactggaga
721 agaattgcat  gtggaagtgt  tggagaatt  tccacttaca  acacacaact  ttgtacgaaa
781 aacgttttct  accttagcat  ttgtgactt  ttgtcgaaag  ctgcttttcc  agggtttccg
841 ctgtcaaaaa  tgtggtata  aatttcacca  gcgttgtagt  acagaagtt  cactgatgtg
901 tgttaattat  gaccaacttg  atttgctgt  tgtctcaag  ttctttgaa  accaccaat
961 accacaggaa  gaggcgtct  tagcagagac  tgccctaaca  tctggatcat  cccctccgc
1021 accgcctcg  gactctatt  ggcccaaat  tctcaccagt  cgtctcctt  caaatccat
1081 tccaattcca  cagcccttcc  gaccagcaga  tgaagatcat  cgaaatcaat  tgggcaacg
1141 agaccgatcc  tcatcagctc  ccaatgtgca  tataaacaca  atagaacctg  tcaatattga
1201 tgacttgatt  agagaccaag  gatttcgtg  tgatggagga  tcaaccacag  gtttgtctgc
1261 tccccccct  gcctcattac  ctggctcact  aactaacgtg  aaagccttac  agaatctcc
1321 aggacctcag  cgagaaaagga  agtcatctc  atctcagaa  gacaggaat  gaatgaaaa
1381 acttggtaga  cgggactcga  gtgatattg  ggagattcct  gatggcaga  ttacagtggt
1441 acaagaatt  ggatctggat  catttggaac  agtctacaag  ggaaagtggc  atggtgatgt
1501 ggcagtgaaa  atgttgaatg  tgacagcacc  tacacctcag  cagttacaag  ccttcaaaaa
1561 tgaagtagga  gtactcagga  aaacacgaca  tgtgaatata  ctactcttca  tgggtattc
1621 cacaagcca  caactggcta  ttgttacca  gtggtgtgag  ggtccagct  tgtatacca
1681 tctccatata  attgagacca  aatttgagat  gatcaactt  atagatattg  cacgacagac
1741 tgcacagggc  atggattact  tacacgcaa  gtcaatcctc  cacagagacc  tcaagagtaa
1801 taatatattt  ctcatgaag  acctcacagt  aaaaataggt  gattttggtc  tagctacagt
1861 gaaatctcga  tggagtgggt  cccatcagtt  tgaacagttg  tctggatcca  ttttgtggat
1921 ggcaccagaa  gtcacagaa  tgcaagataa  aaatccatac  agctttcagt  cagatgtata
1981 tgcatttgga  attgttctgt  atgaattgat  gactggacag  ttacctatt  caaacatcaa
2041 caacagggac  cagataattt  ttatggtgg  acgaggatac  ctgtctccag  atctcagtaa
2101 ggtacggagt  aactgtccaa  aagccatgaa  gagattaatg  gcagagtgcc  tcaaaaagaa
2161 aagagatgag  agaccactct  ttcccaaat  tctgcctct  attgagctgc  tggcccgtc
2221 attgcaaaaa  attcaccgca  gtgcatcaga  accctcctg  aatcgggctg  gtttcaaac
2281 agaggatttt  agtctatatg  ctgtgcttc  tcaaaaaaca  cccatccagg  cagggggata
2341 tgggtcgttt  cctgtccact  gaacaaaatg  agtgagagag  ttcaggagag  tagcaacaaa
2401 aggaaaataa  atgaacatat  gtttgcttat  atgttaaat  gaataaata  ctctctttt
2461 ttttaaggtg  aaccaagaa  aaaaaaaaa  aaaaaaaaa  aaaaaaaaa  ccc

```

B

```

1741 tgcacagggc atggattact tacacgcaa gtcaatcctc cacagagacc tcaagAgtaa forma WT
1741 tgcacagggc atggattact tacacgcaa gtcaatcctc cacagagacc tcaagTgtaa forma V599E

```

FIG. 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 244 308

② Nº de solicitud: 200400119

③ Fecha de presentación de la solicitud: 21.01.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12Q 1/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X | DENG G. et al. "BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer". Clin Cancer Res. 1 Enero 2004. Vol. 10, nº 1, páginas 191-195. | 1-13 |
| P,X | McGIVERN A. et al. "Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer". Fam Cancer. 2004. Vol. 3, nº 2, páginas 101-107. | 1-13 |
| Y | US 2001044936 A1. (ROBBINS D. et al) 22.11.2001, reivindicaciones. | 1-13 |
| Y | RAJAGOPALAN H. et al. RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status". Nature. 29 Agosto 2002. Vol. 418, nº 6901, página 934. | 1-13 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

31.10.2005

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/1