



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 37437 A1** (51) Cl. internationale : **C12Q 1/68; C12N 15/11**
- (43) Date de publication : **31.05.2016**

-
- (21) N° Dépôt : **37437**
- (22) Date de Dépôt : **17.10.2014**
- (71) Demandeur(s) : **MASCIR (MORROCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & RESEARCH), RUE MOHAMED EL JAZOULI, MADINAT AL IRFANE RABAT 10100 (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **SEFRIQUI EL HASSANE ; MOUMEN ABDELADIM ; MANAL EL AMRANI ; ABDELLAOUI-MAANE IMANE ; EL HADI HICHAM**
- (74) Mandataire : **ABDELHAQ AMMANI**

-
- (54) Titre : **KIT DE DIAGNOSTIC DU CANCER DE SEIN EN RÉACTION QPCR MULTIPLEX ET SON APPLICATION DANS L'ÉVALUATION DU STATUT DE LA PROTÉINE HER2 ET LE CHOIX DU TRAITEMENT**
- (57) Abrégé : La présente invention concerne un kit de diagnostic in vitro pour la quantification des transcrits du gène HER2 surexprimé dans le cas du cancer du sein et de l'estomac ainsi que dans d'autres types de cancers. Le présent kit est composé d'une combinaison innovante de nouveaux sets d'amorces et de sondes permettant la détection spécifique et la quantification des transcrits du gène HER2 et les gènes de référence, choisis parmi les gènes RPL30 OU RPL37 OU BIEN MRPL19 en utilisant la méthode de transcription inverse-pcr en temps réel (RTqPCR) en format multiplexe ou simplexe. Le présent kit est destiné pour l'établissement du statut de la protéine HER2 et le choix du traitement pour le cancer de sein ou tout cancer nécessitant une quantification de la protéine HER2.

Kit de diagnostic du cancer de sein en réaction qPCR multiplex et son application dans l'évaluation du statut de la protéine HER2 et le choix du traitement

Abrégé :

La présente invention concerne un kit de diagnostic *in vitro* pour la quantification des transcrits du gène HER2 surexprimé dans le cas du cancer du sein et de l'estomac ainsi que dans d'autres types de cancers. Le présent kit est composé d'une combinaison innovante de nouveaux sets d'amorces et de sondes permettant la détection spécifique et la quantification des transcrits du gène HER2 et les gènes de référence, choisis parmi les gènes RPL30 ou RPL37 ou bien MRPL19 en utilisant la méthode de transcription inverse-PCR en temps réel (RTqPCR) en format multiplexe ou simplexe. Le présent kit est destiné pour l'établissement du statut de la protéine HER2 et le choix du traitement pour le cancer de sein ou tout cancer nécessitant une quantification de la protéine HER2.

Kit de diagnostic du cancer de sein en réaction qPCR multiplex et son application dans l'évaluation du statut de la protéine HER2 et le choix du traitement

31 MAI 2016

Domaine de l'invention:

La présente invention concerne un kit de diagnostic *in vitro* pour la quantification des transcrits du gène HER2 surexprimé dans le cas du cancer du sein et de l'estomac ainsi que dans d'autres types de cancers. Le présent kit est composé d'une combinaison innovante de nouveaux sets d'amorces et de sondes permettant la détection spécifique et la quantification des transcrits du gène HER2 et les gènes de référence, choisis parmi les gènes RPL30 ou RPL37 ou bien MRPL19 en utilisant la méthode de transcription inverse-PCR en temps réel (RTqPCR) en format multiplexe ou simplexe. Le présent kit est destiné pour l'établissement du statut de la protéine HER2 et le choix du traitement pour le cancer de sein ou tout cancer nécessitant une quantification de la protéine HER2.

Description de l'art antécédent

Le cancer du sein représente la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Il est aussi le cancer le plus répandu des cancers de la femme. Au Maroc, le cancer du sein frappe plus de 15 000 femmes chaque année (registre des cancers Région Casablanca, 2004, édition 2007).

Le gène HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) est localisé sur le chromosome 17 et code pour le récepteur de facteur de croissance HER2, une protéine transmembranaire ayant une activité tyrosine kinase et étant surexprimée dans 30% des cancers de sein. La surexpression de HER2 induit par une amplification génique et son activation induit la prolifération des cellules tumorales, la stimulation de l'angiogénèse et la métastase.

L'Herceptin® est un anticorps monoclonal humanisé qui reconnaît spécifiquement le domaine extra-membranaire de la protéine HER2 (ECD) et inhibe ainsi l'activité tumorale de cette dernière. Plusieurs essais cliniques randomisés ont démontré un bénéfice en survie globale de l'Herceptin® en combinaison avec la chimiothérapie chez les patientes atteints par un du cancer de sein surexprimant HER2 (Romond EH ; *N Engl J Med.* 2005; 353:1673–684. Gianni L ; *Lancet Oncol* ; 2011;12:236–244]. D'autre essais cliniques ont montré la même efficacité de l'Herceptin® dans le cas du cancer de l'estomac ou de l'œsophage surexprimant HER2 (Bang YJ ; *Lancet.* 2010; 16;376(9749):1302).

La méthode standard actuelle permettant de quantifier relativement l'expression de HER2 d'une tumeur est l'immunohistochimie (IHC). Le but de l'IHC est de mettre en évidence une surexpression de la protéine HER2, qui se caractérise par un score HER2 (3+), lequel indique un traitement par l'Herceptin® (Genentech, San Francisco, Calif.). L'Herceptin est un anticorps qui détecte la protéine HER2 au niveau de la membrane cellulaire. La technique de FISH (fluorescence in situ hybridization) est utilisée dans les situations de scores intermédiaires (Her2 (2+)). La FISH permet de visualiser directement l'amplification du gène HER2 en utilisant des sondes ADN fluorescentes. Cependant, l'IHC et la FISH manquent surtout d'essais quantitatifs et qualitatifs, elles sont moins spécifiques, utilisent des anticorps ou des hybridations complexes, prennent énormément de temps (plusieurs jours), le score final nécessite plusieurs examinateurs, en plus la méthode FISH est très coûteuse.

C'est pour les raisons citées ci-dessus qu'il est préférable d'identifier des méthodes de quantification de HER2 avec plus de sensibilité et de fiabilité, de meilleures reproductibilités quantitatives et qualitatives et avec un coût plus bas..

Actuellement, la PCR en temps réel (qPCR) qui consiste en une amplification du gène cible a été appliquée avec succès en diagnostics cliniques (Hughes TP ; N Engl J Med. 2003;349:1423-1432) en raison de sa haute spécificité, de sa rapidité, de sa fiabilité et de son faible coût.

Pour la quantification d'un gène cible, la qPCR utilise en parallèle un gène contrôle 'reference gene' exprimé de manière ubiquitaire dans toutes les cellules du corps et qui permettra la quantification exacte du gène cible. Dans le cas de la quantification de HER2, plusieurs gènes contrôles ont été utilisés en littérature comme GAPDH (Bofin A, Am J Clin Pathol 2004;122:110-119) et beta-actine (Kao J, PLoS ONE 2009 ; 4 ; e6146)). La liste des gènes contrôles humain sont cités par Eisenberg et al (Trends in Genetics 2003 ; 19 : 362-365).

Cependant, l'utilisation d'un gène contrôle dont l'expression n'est pas stable entre les différents échantillons analysés affecte la validité des résultats. C'est pour cette raison, il faut tester plusieurs gènes contrôles et choisir le plus stable. Dans le cas de la présente invention, 3 gènes contrôles stables ont été sélectionnés après être validés et confirmés simultanément par 2 différents logiciels statistiques internationaux Genorm et GenFinder

Expose de l'invention.

La présente invention concerne un kit de diagnostic *in vitro* pour la quantification des transcrits du gène HER2 surexprimé dans le cas du cancer du sein et de l'estomac. Elle

préconise l'utilisation de nouveaux sets de sondes et d'amorces et d'un procédé RTqPCR en réaction simple ou multiplexe pour la détection et la quantification des transcrits du gène HER2 et les gènes de référence, RPL30 ou RPL37 ou bien MRPL19. Le présent kit est destiné pour l'établissement du statut de la protéine HER2 et le choix du traitement pour le cancer de sein ou tout cancer nécessitant une quantification de la protéine HER2.

La présente invention améliore les autres méthodes antérieures citées ci-dessus et permet a) de gagner en sensibilité en utilisant des nouvelles sondes et amorces de HER2 et du gène de référence choisi parmi les gènes RPL30 ou RPL37 ou bien MRPL19 plus spécifiques et plus sensibles que celles citées dans l'art antérieur b) une réduction en cout de consommables et en temps de réalisation ainsi qu'en fiabilité car il utilise la méthode innovant RT-qPCR caractérisée par sa haute spécificité, sa rapidité, sa fiabilité et de son faible coût c) l'amplification des transcrits des gènes HER2 ou de référence peut se faire simultanément dans le même puits de qPCR.

Selon la présente invention, la détection et la quantification des transcrits des gènes cibles se font par la méthode RTqPCR en différentes étapes a) concevoir et synthétiser des nouvelles séquences nucléotidique de sondes et amorces qui s'hybrident spécifiquement sur les transcrits du gène HER2 ou le gène contrôle b) le gène contrôle est sélectionné parmi le group RPL30, MRPL19, RPL37, et tout autres gènes contrôles codant pour des protéines ribosomales c) extraction des ARNs totaux des échantillons paraffinés ou frais et production de cDNA par transcription inverse c) quantification des transcrits par qPCR d) quantification des transcrits du gène HER2 dans un échantillon donne par apport de l'échantillon calibrateur par la méthode de $\Delta\Delta CT$ e) comparaison de la quantité déterminée a un seuil minimum de détection prédéterminé et l'identification de patients candidats pour un traitement à l'Herceptin®.

Selon une caractéristique de l'invention, a) les amorces permettant la détection du transcrit HER2 dans un test échantillon ont des séquences d'oligonucleotides sélectionnées parmi un groupe de : SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3 , SEQ ID NO :4 et SEQ ID NO :9 b) les amorces pour détecter le transcrit du gène contrôle RLP30 par exemple dans un test

échantillon ont des séquences d'oligonucléotides sélectionnées parmi un groupe de : SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8 et SEQ ID NO :10.

En accord avec la méthode d'amplification de la présente invention, le gène décrit ci dessus consiste à mettre le test échantillon dans une réaction d'amplification en présence de réactif d'amplification. La réaction d'amplification peut être au moins une PCR, qPCR ou RT-PCR.

Selon cette invention et en accordance avec, au moins une sonde contient une unité fluorescente (reporter) attachée à la région 5' d'ADN. En plus au moins une sonde peut contenir une partie quencher à la région 3' d'ADN. La quantification de l'unité fluorescence permet la quantification du gène cible (HER2 et/ou gène de référence).

Selon une autre caractéristique de l'invention, l'amplification des transcrits du gène HER2 et du gène de référence par la qPCR de la présente invention peuvent se faire en réaction simplexe ou multiplexe.

EXPOSE DETAILLE DE L'INVENTION

La présente invention concerne un kit de diagnostic *in vitro* pour la quantification des transcrits du gène HER2 surexprimé dans le cas du cancer du sein et de l'estomac.

La présente invention concerne l'utilisation des sondes, amorces, set d'amorces, set de sondes et amorces qui peuvent être utilisés pour amplifier, détecter et quantifier le gène HER2 et le gène de référence choisi parmi les gènes RPL30, RPL37A ou bien MRPL19 dans un échantillon test.

La présente invention concerne aussi la méthode de détection de HER2 et le gène de référence choisi parmi les gènes RPL30, RPL37A ou bien MRPL19 dans un échantillon test en utilisant les sets d'amorces et sondes cités ci-dessus. Les sets d'amorces et sondes de la présente invention permettent une meilleure sensibilité et spécificité pour détecter HER2 et le gène de référence choisi parmi les gènes RPL30, RPL37A ou bien MRPL19

Selon la présente invention, l'amplification de HER2 et le gène de référence choisi parmi les gènes RPL30, RPL37A ou bien MRPL19 se fait au moins en qPCR en format simplexe ou multiplexe permettant ainsi une meilleure quantification de HER2 et un gain en temps, fiabilité et en coût sont garanties.

Selon une autre caractéristique de l'invention, la quantification plus sensible et plus spécifique des transcrits de gène HER2 se fait soit par la méthode $\Delta\Delta CT$ en utilisant un

échantillon de cellules exprimant HER2 d'une façon normale comme calibrateur soit une extrapolation du nombre de copie des transcrits des gènes cibles à partir d'une courbe standard. Cette dernière est générée par une gamme de dilution de calibrant constitués par un plasmide bactérien qui contient à la fois une séquence du gène HER2 et gène de référence comprenant les amplicons reconnus sur leurs ADNc correspondants.

Le kit présenté ici comprend :

- a) pour une réaction en simplexe, un tube contenant un mélange de 3 μ M de l'amorce « forward » HER2, 3 μ M de l'amorce « reverse » HER2, 2 μ M de la probe HER2, et un tube contenant 3 μ M de l'amorce « forward » gène de référence choisi des gène cite ci-dessus, 3 μ M de l'amorce « reverse » gène de référence choisi des gène cite ci-dessus et 2 μ M de la probe pour gène de référence choisi des gène cite ci-dessus . Pour une réaction en duplex un seul tube contenant tous ces amorces avec la concentration cite ci-dessus.
- d) un tube contenant un ARN extrait de la lignée positive surexprimant HER2 constituant le contrôle positif.
- e) un tube contenant un ARN extrait de la lignée négatif exprimant normalement HER2 constituant le contrôle négatif.

Le mot 'HER2' décrit dans la présente invention correspond au gène HER2

Le mot 'gène' réfère à une séquence d'acide nucléique dans la molécule d'ADN qui occupe une région précise dans un chromosome et permet de coder les instructions pour la synthèse de l'ARN.

Le mot amplification de gène comme utilisé dans cette invention réfère à une ou plusieurs méthodes capables de copier un acide nucléique permettant ainsi une augmentation du nombre de copie d'une séquence d'acide nucléique cible. La séquence amplifiée peut être un acide desoxyribonucléique (ADN) ou un acide ribonucléique (ARN).

Le mot 'oligonucléotide' comme utilisé ici est une séquence composée d'ADN ou d'ARN ou leur combinaison avec une longueur qui varie de 10 à 70 nucléotides. Les oligonucléotides peuvent être synthétisés avec différentes méthodes mais pas limitées à celle de la synthèse

5'-3' basée sur l'utilisation des groupes protégeant beta-cyanoethyl phosphine (Rosenthal et al, Terahedron Letter 24 : 1691, 1983; Gait et al, Nuc Acids Res 4: 1135, 1977) ou la méthode des phosphochloridites (Matteucci J AM CHEM SOC 103: 3185-91, 1981).

Le mot 'amorce' représente une séquence d'oligonucléotides qui peut être synthétisée chimiquement ou naturellement. L'amorce est le point d'initiation de la synthèse d'ADN dans des conditions optimales de température et en présence de tampons, d'enzyme, de nucléotides et de séquences nucléotidiques complémentaires spécifiques.

Le mot 'sonde' représente une séquence nucléotidique qui forme une structure hybride avec une séquence cible dans une molécule d'un échantillon test.

Le mot 'plasmide' représente un ADN circulaire d'origine bactérienne contenant une origine de répllication et un gène de résistance à un antibiotique permettant la sélection.

Le mot 'transcription inverse' comme utilisé dans cette invention réfère à une méthode permettant la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de molécule d'ARN. L'ADNc peut être utilisée dans la méthode PCR.

Le mot 'PCR' (polymerase chain reaction) de la présente invention réfère à une méthode dont un échantillon d'ADN ou ADNc est ajouté dans une solution en présence de 2 oligonucleotides amorces (forward et reverse) ; de nucléotides non attachés (exemple les dNTPs) ; et de l'enzyme ADN polymérase (préféablement la Taq polymérase qui résiste à la chaleur) qui catalyse la formation d'ADN à partir des 2 amorces et dNTPs. La solution est chauffée à 94-96 C° pour dénaturer la molécule d'ADN et former 2 simples brins d'ADN. Les amorces vont ensuite se fixer spécifiquement sur l'ADN simple brin permettant ainsi à l'ADN polymérase de catalyser l'attachement des dNTPs aux amorces.

Le mot 'RT-PCR' (reverse transcriptase-PCR) de la présente invention représente une méthode de PCR dont le produit de départ n'est pas directement un ADN mais un ARN traduit en ADNc après transcription inverse.

Le mot 'qPCR' (quantitative PCR ou real time RT-PCR) cité dans la présente invention réfère à une méthode de PCR permettant l'étude des produits de la réaction PCR durant les premières étapes d'amplification de l'ADN. La détection des produits de PCR se fait grâce à des sondes marquées à leurs extrémités 5' par un fluorochrome émetteur (reporter), et à leurs extrémités 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) fluorescent ou non, qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. De ce fait, l'intensité du signal de la fluorescence mesurée au cours de la réaction d'amplification est proportionnelle au nombre de produits nouvellement formés (amplicons). La mesure en ADN ou ADNc se fait en logarithme. Pour déterminer la positivité d'une PCR et/ou quantifier un échantillon par qPCR, on détermine le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable. Le moment d'apparition de ce signal seuil dénommé cycle seuil ou Ct (Cycle Threshold) est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. Le Ct calculé est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales.

Parmi les sondes les plus utilisées en qPCR on trouve les sondes TaqMan et « molecular beacons ». La TaqMan utilise l'activité 5'exonucléase de l'enzyme Taq polymérase pour mesurer la quantité de la séquence d'ADN dans un échantillon test. Tandis que le « molecular beacon » quantifie l'ADN en libérant de la fluorescence une fois hybridé sur la séquence cible.

Préférentiellement, dans la présente invention, la qPCR est réalisée en utilisant les sondes TaqMan avec un analyseur d'amplification comme ABI PRISM 7500HT 'sequence detection system' qui est un système de screening qui peut détecter et quantifier des acides nucléiques. La quantité de HER2 et gène de référence choisi parmi les gènes cite ci-dessus est calculée par le logiciel intégré dans le système ABI PRISM 7500HT en utilisant la méthode $\Delta\Delta CT$ ou de la courbe standard. Selon une autre caractéristique de la présente invention, le reporteur de la sonde peut être FAM, JOE, YAKYE YELLOW (YY) et le quencher BBQ, BHQ1, MGB1 ou TAMRA.

Le mot 'courbe standard' correspond à une droite standard qui est une présentation mathématique des valeurs de Ct obtenues expérimentalement en fonction du \log_{10} des

concentrations en molécules cibles fixées, issues de séries de dilutions d'un échantillon standard.

Le mot 'gène contrôle' ou 'gène de référence' représente un gène exprimé en général de façon similaire par toutes les cellules d'un organisme. Parmi les gènes contrôle, on trouve le RPL30, RPL37A et MRPL19.

Le mot simplexe de la présente invention réfère à un essai qui ne se déroule pas simultanément avec d'autres essais. Dans notre invention, la qPCR en simplex reflète la détection et la quantification d'un seul gène dans un tube de réaction.

Le mot multiplexe de la présente invention réfère à un essai qui se déroule simultanément avec au moins un autre essai. La qPCR en multiplexe reflète la détection et la quantification d'au moins 2 gènes dans un même tube de réaction. Par exemple, dans la présente invention, les 2 gènes HER2 et gène de référence choisi parmi les gènes cités ci-dessus sont détectés simultanément par qPCR.

Le mot 'échantillon test' comme utilisé dans la présente invention réfère à un échantillon de cellules gardé dans le paraffine ou autre méthodes de conservation, cellule fraîche, de cellules primaires, lignées cellulaires ou autre tissus et où des cellules utilisées pour une quantification des transcrits du gène HER2. L'échantillon test de la présente invention peut être d'origine humaine ou autre animal exprimant le gène HER2 et gène de référence choisi parmi les gènes cités ci-dessus qui peuvent être amplifiés en utilisant les amorces et sondes de la présente invention.

Le mot efficacité de la réaction de la qPCR réfère au pourcentage des molécules d'ADN subissant une réplication à chaque cycle de PCR. Une efficacité de 100% reflète une réplication de toutes les molécules d'ADN cibles présentes dans le milieu réactionnel après chaque cycle de PCR.

Le mot «threshold» ou seuil de quantification correspond à une quantité en dessous de laquelle l'échantillon est considéré négatif et au-dessus de laquelle l'échantillon est considéré positif pour l'expression du gène HER2.

L'exemple 1 décrit un protocole utilisé dans le test de qPCR de la présente invention. Le protocole décrit aussi les étapes d'extraction d'ARN et de synthèse d'ADNc.

Exemple 2 décrit un protocole pour la quantification des transcrits HER2 par la méthode $\Delta\Delta CT$ dans un échantillon donné en utilisant les transcrits issus de la lignée cellulaire MCF7 (exprimant normalement le gène HER2) comme calibrateur. Un exemple de lignée positif SKBR3 (surexprimant HER2) est mentionné.

Exemple 3 décrit un protocole de réalisation d'une plaque-type pour la quantification des transcrits du gène HER2 en utilisant des biopsies paraffinées de cancer de sein et la lignée MCF7 comme calibrateur.

EXPERIENCES

Exemple 1 : Protocole de qPCR de la présente invention pour la détection de HER2 et le gène référence RPL30 (Figure 1)

Ce procédé est constitué de plusieurs étapes :

1-Extraction de l'ARNm totale cellulaire

L'extraction de l'ARN cellulaire se fait avec RNeasy mini kit de Qiagen suivant les recommandations du fournisseur (Qiagen Inc). La qualité du test est liée à la qualité de l'ARN initiale. De ce fait, le degré de la purification ainsi que la qualité de l'ARN sont analysés soit sur électrophorèse en gel d'agarose ou sur Bioanalyzer (Agilent).

2-Synthèse de l'ADNc par transcription inverse.

L'ADNc est obtenue à partir d'ARN total extrait d'échantillon test. La synthèse d'ADNc est réalisée à l'aide du Thermocycleur (Applied Biosystems) en utilisant le kit «RNA to cDNA

Reverse Transcription» suivant les recommandations du fournisseur Applied Biosystems. En bref, dans un tube à essai et dans un volume final de 20µl, mélanger :

1-2 µg de l'ARN (maximum 14.2 µl total de l'ARN)

0.8 µl de dNTP Mix (100mM)

2µl de 10X RT random primers

2µl de 10X RT Buffer

1µl de MultiScribe reverse transcriptase

Qsp Nuclease free H₂O 20µl

Mettre le milieu réactionnel dans un thermocycleur en utilisant les températures suivantes
25°C pour 10min

37°C pour 60 min

37°C pour 60 min

84°C pour 5s

4°C jusqu'à utilisation

3- La réaction de qPCR.

3a. Format simplexe.

Il est réalisé dans un volume final de 25µl en mélangeant:

50 à 200ng de l'ADNc issu de la transcription inverse.

300 nM (2,5 µl d'une solution mère de 3µM) de l'amorce « Forward » sélectionnée parmi les séquences, SEQ ID N° 1 et SEQ ID N°3 (pour la détection des transcrits du gène HER2) ou bien les séquences SEQ ID N°5 et SEQ ID N°7 (pour la détection des transcrits du gène RPL30).

300 nM (2,5 µl d'une solution mère de 3µM) de l'amorce « Reverse » sélectionnée parmi les séquences, SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N°4 (pour la détection des transcrits du gène HER2) ou

bien les séquences SEQ ID N°6 ou SEQ ID N°8 (pour la détection des transcrits du gène RPL30).

200nM (2,5 µl d'une solution mère de 2µM) de la Sonde TaqMan fluorescente sélectionnée parmi les séquences, SEQ ID N° 9 (pour la détection des transcrits du gène HER2) ou bien SEQ ID N°10 (pour la détection des transcrits du gène RPL30).

12,5 µl du TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x) contenant tous les éléments nécessaires pour la réalisation de la réaction de polymérisation à savoir l'enzyme ADN polymérase, les dNTPs et le tampon de la réaction avec des quantités optimales.

Mettre le milieu réactionnel dans une plaque 96 puits placée dans le thermocycleur permettant la réalisation de la réaction de PCR, la détection de la fluorescence libérée au cours de la réaction et la quantification du matériel amplifié (thermocycleur de type ABI PRISM 7500HT en est un exemple). Les cycles de température utilisés pour la réaction sont :

95°C pour 20s (1 cycle)

95°C pour 1s et 60°C pour 30s (50 cycles)

3b. Format multiplexe (duplexe).

Il est réalisé dans un volume final de 25µl en mélangeant:

50 à 200ng de l'ADNc issu de la transcription inverse.

300 nM (1,25 µl d'une solution mère de 6µM) de l'amorce « Forward » sélectionnée parmi les séquences, SEQ ID N° 1 et SEQ ID N°3 (pour la détection des transcrits du gène HER2) et les séquences SEQ ID N°5 et SEQ ID N°7 (pour la détection des transcrits du gène RPL30).

300 nM (1,25 µl d'une solution mère de 6µM) de l'amorce « Reverse » sélectionnée parmi les séquences, SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N°4 (pour la détection des transcrits du gène BCR-AB) et les séquences SEQ ID N°6 ou SEQ ID N°8 (pour la détection des transcrits du gène ABL1).

200nM (1,25 µl d'une solution mère de 4µM) de la Sonde TaqMan fluorescente correspondant à la SEQ ID N° 9 (pour la détection des transcrits du gène HER2) et 300nM (1,25 µl d'une solution mère de 6µM) de la Sonde TaqMan fluorescente correspondant à la SEQ ID N°10 (pour la détection des transcrits du gène RPL30).

12,5 µl du TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x) contenant tous les éléments nécessaires pour la réalisation de la réaction de polymérisation à savoir l'enzyme ADN polymérase, les dNTPs et le tampon de la réaction avec des quantités optimales.

Mettre le milieu réactionnel dans une plaque 96 puits placée dans le thermocycleur permettant la réalisation de la réaction de PCR, la détection de la fluorescence libérée au cours de la réaction et la quantification du matériel amplifié (thermocycleur de type ABI PRISM 7500HT en est un exemple). Les cycles de température utilisés pour la réaction sont :

95°C pour 20s (1 cycle)

95°C pour 1s et 60°C pour 30s (50 cycles)

Exemple 2. : Protocole de la quantification par $\Delta\Delta CT$ (Figure 2).

La méthode $\Delta\Delta CT$ est bien établie dans la littérature comme une méthode de calcul de la quantité de l'expression d'un gène donné dans un échantillon par rapport à un autre considéré comme normalisateur ou calibrateur (Litvak). Dans notre exemple la quantité des transcrits HER2 dans un échantillon est mesurée par rapport au calibrateur qui est ici la lignée du cancer de sein MCF7 dont le taux d'expression du gène HER2 est normal. Pour se faire, la valeur CT du gène cible HER2 et du gène de référence PRL 30 est mesurée dans l'échantillon teste et la lignée MCF7 et la méthode $\Delta\Delta CT$ est calculée comme suivant

$$\Delta CT_{(\text{échantillon})} = CT_{\text{HER2}} - CT_{\text{RPL30}}$$

$$\Delta CT_{(\text{MCF7})} = CT_{\text{HER2}} - CT_{\text{RPL30}}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{(\text{échantillon})} - \Delta CT_{(\text{MCF7})}$$

$$\text{Quantité HER2}_{(\text{échantillon/MCF7})} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Exemple 3: Protocole de la réalisation d'une plaque type de quantification des transcrits du gène HER2 en utilisant des biopsies paraffinées de cancer de sein (Figure 4).

Le tableau ci-dessous décrit une présentation schématique d'une plaque-type de qPCR en format simplex pour quantification du gène HER2 dans des biopsies paraffinées de cancer de sein. Chacun des échantillons est analysé en duplicata pour une meilleure précision. Le

contrôle positif (ARN de la lignée cellulaire SKBR3 surexprimant le gène HER2), le négatif (ARN de la lignée cellulaire MCF7 utilise comme calibrateur), le NRT (Négatif Reverse Transcription) et le NAC (No Amplification Control) qui contient de l'eau à la place de l'acide nucléique sont mis dans la dernière ligne de la plaque. La réaction de la qPCR est effectuée dans les mêmes conditions décrites dans l'*Exemple 1*.

	HER2	HER2	HER2	HER2	HER2	HER2	RPL30	RPL30	RPL30	RPL30	RPL30	RPL30
A	Sample 1	Sample 1	Sample 2	Sample 2	Sample 3	Sample 3	Sample 1	Sample 1	Sample 2	Sample 2	Sample 3	Sample 3
B	Sample 4	Sample 4	Sample 5	Sample 5	Sample 6	Sample 6	Sample 4	Sample 4	Sample 5	Sample 5	Sample 6	Sample 6
C	Sample 7	Sample 7	Sample 8	Sample 8	Sample 9	Sample 9	Sample 7	Sample 7	Sample 8	Sample 8	Sample 9	Sample 9
D	Sample 10	Sample 10	Sample 11	Sample 11	Sample 12	Sample 12	Sample 10	Sample 10	Sample 11	Sample 11	Sample 12	Sample 12
E	Sample 13	Sample 13	Sample 14	Sample 14	Sample 15	Sample 15	Sample 13	Sample 13	Sample 14	Sample 14	Sample 15	Sample 15
F	Sample 16	Sample 16	Sample 17	Sample 17	Sample 18	Sample 18	Sample 16	Sample 16	Sample 17	Sample 17	Sample 18	Sample 18
G	Sample 19	Sample 19	Sample 20	Sample 20	Sample 21	Sample 21	Sample 19	Sample 19	Sample 20	Sample 20	Sample 21	Sample 21
H	NRT	NRT	SKBR3	SKBR3	MCF7	MCF7	NRT	NRT	SKBR3	SKBR3	MCF7	MCF7

LISTE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES

SEQ ID N° 1 : F-HER2

Longueur : 18

Aatgccaggcactgtttg (F9)

SEQ ID N° 2: R- HER2

Longueur : 20

Gtccttatagtgggcacagg (R6)

SEQ ID N° 3: F-HER2

Longueur : 20

Ctcccaggagatgtga (F5)*

SEQ ID N° 4: R-HER2

Longueur; 20

Aacagtcactgagccattc (R1)*

SEQ ID NO° 5: F-RPL30

Longueur: 20

Tggctatcattgatccaggt (F1)

SEQ ID N° 6 : R-RPL30 (R1)

Longueur : 20

Tttgcaggttaaggttgc (R1)

SEQ ID NO 7 : F-RPL30

Longueur: 20

Ggctatcattgatccaggtg (F2)

SEQ ID NO 8 : R-RPL30

Longueur: 20

Ggttaaggttgcaggtga (R2)

SEQ ID N°9 : S- HER2

Longueur : 20

Gtccttatagtgggcacagg (« ccgtgccaccctgagtgca »)

SEQ ID N° 10 : S-RPL30

Longueur : 23

Ttcaccagtctgttctgcatgc

SEQ ID N° 11: S-RPL30

Longueur: 23

Tcagatttctcaaagctgggca

F = amorce forward

R = amorce reverse

S = sonde

Revendications :

1. Kit pour le diagnostic, le pronostic, l'orientation du traitement et l'établissement de l'état d'expression du gène HER2 de la maladie du cancer de sein ou toute autre cancer nécessitant une mesure de l'expression du gène HER2 **caractérisé en ce que** ledit kit utilise la technologie de qPCR ou PCR conventionnelle pour la détection et la quantification du gène HER2 et le gène de référence choisi parmi les gènes RPL30, RPL37A ou bien MRPL19 en format multiplexe ou simplexe selon la procédure suivante :
 - a) mélange de l'ADNc synthétisé à partir de l'ARNm extrait d'un échantillon test avec un mastermix contenant tous les réactifs nécessaire pour la détection spécifique en condition multiplexe ou simplexe d'un amplicon au sein du gène HER2 et un gène de référence choisi parmi les gènes RPL30, RPL37A ou bien MRPL19.
 - b) application des cycles thermiques pour la réalisation de la PCR conventionnelle ou la qPCR
 - c) mesure des valeurs CT du gène HER2 et de référence dans l'échantillon test et le calibrateur
 - d) mesure de la quantité des transcrits du gène HER2 en utilisant la méthode $\Delta\Delta CT$ ou bien une courbe standard.
2. Kit selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** le Mastermix contient une combinaison d'amorces constituée : pour HER2 d'une amorce «forward» ayant des séquences sélectionnées parmi le groupe de séquences [SEQ ID N° 1 , SEQ ID N° 3] , d'une amorce «reverse» sélectionnée parmi le groupe de séquences [SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4], la sonde de détection SEQ ID N° 9 ; pour RPL30 d'une amorce «forward» ayant des séquences sélectionnées parmi le groupe de séquences [SEQ ID N° 5 , SEQ ID N° 7], d'une amorce «reverse» sélectionnée parmi le group de séquences [SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8] et la sonde de détection SEQ ID N° 10 ou 11.

3. Kit selon les revendications 1 et 2, **caractérisé en ce que** la sonde de détection des transcrits du gène HER2 et le gène de référence choisi parmi les gènes RPL30, RPL37A ou bien MRPL19 en qPCR soient attachées à des entités fluorescentes (reporters) et non fluorescentes (quencher). Le reporteur peut être FAM, JOE, YY, VIC ou similaire, attaché à l'extrémité 5' et le quencher peut être BBQ, BHQ1, MGB ou TAMRA ou similaire attaché à l'extrémité 3'.

4. Kit selon les revendications 1 à 3, **caractérisé en ce que** la détection des gènes HER2 et de référence choisi parmi les gènes RPL30, RPL37A ou bien MRPL19 dans un échantillon test est effectuée par qPCR ou PCR conventionnelle en format multiplexe ou simplexe.

5. Kit selon la revendication 1, **caractérisé a ce que** :
 - a) l'ARNm est extrait a partir d'un échantillon test, ainsi sa concentration et sa pureté sont mesurées par électrophorèse, nanodrop ou bien bioanalyser.
 - b) l'ARNm est converti en une copie d'ADN (ADNc) par le biais d'une transcription inverse.

6. Kit selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** :
 - a) la quantification des transcrits de gène HER2 se fait soit par la méthode $\Delta\Delta CT$ en utilisant un échantillon de cellules exprimant HER2 d'une façon normale comme calibrateur soit une extrapolation du nombre de copie des transcrits des gènes cibles à partir d'une courbe standard. Cette dernière est générée par une gamme de dilution de calibrant constitués par un plasmide bactérien qui contient à la fois une séquence du gène HER2 et gène de référence comprenant les amplicons reconnus sur leurs ADNc correspondants
 - b) l'ADN plasmidique de la gamme de dilution du calibrant est linéarisé par une enzyme de restriction ayant un site unique sur le plasmide ainsi l'ADNc et l'ADN plasmidique de la gamme d'étalonnage sont préparés dans un milieu de dilution comportant en outre des acides nucléiques ne présentant pas d'homologie avec les séquences d'intérêt de l'ADNc et du calibrant. L'acide nucléique utilisé pour la

dilution peut être de l'ADN génomique, l'ADN plasmidique circulaire ou linéarisé ou de l'ARN.

7. Kit selon les revendications 1 à 7, **caractérisé en ce que** la quantité des transcrits HER2 mesurée par la méthode $\Delta\Delta CT$ ou bien la mesure effectuée en utilisant une courbe standard du nombre de copie absolu de chacun des transcrits de gènes HER2 et le gène de référence ou le rapport du nombre de copie du gène HER2 et le gène de référence ou bien le pourcentage de rapport de nombre de copies est comparé à un seuil de détection appelé ici « threshold »
8. Kit selon les revendications 1 à 8 **caractérisé en ce que** le « threshold » est calculé a partir des échantillons ayant une quantité normale d'expression du gène HER2. Ces échantillons sont choisis parmi les échantillons révélés négatifs par immunohistochimie (score 0+ et 1+) et par FISH (nombre du gène $HER2 \leq 1.2$).
9. Kit selon les revendications 1 à 9 **caractérisé en ce que** le «threshold» ou seuil de quantification correspond a une quantité en dessous duquel l'échantillon est considéré négatif et au dessus duquel l'échantillon est considéré positif pour l'expression du gène HER2

Figure1

Amplification Plot

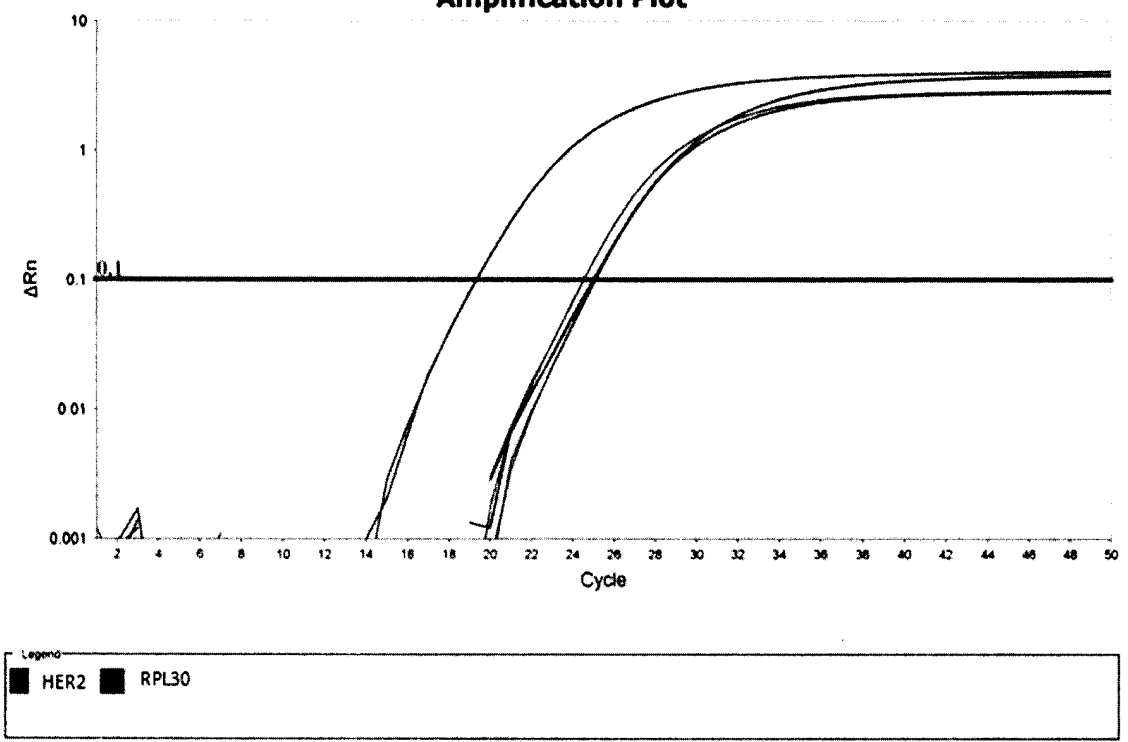


Figure 2

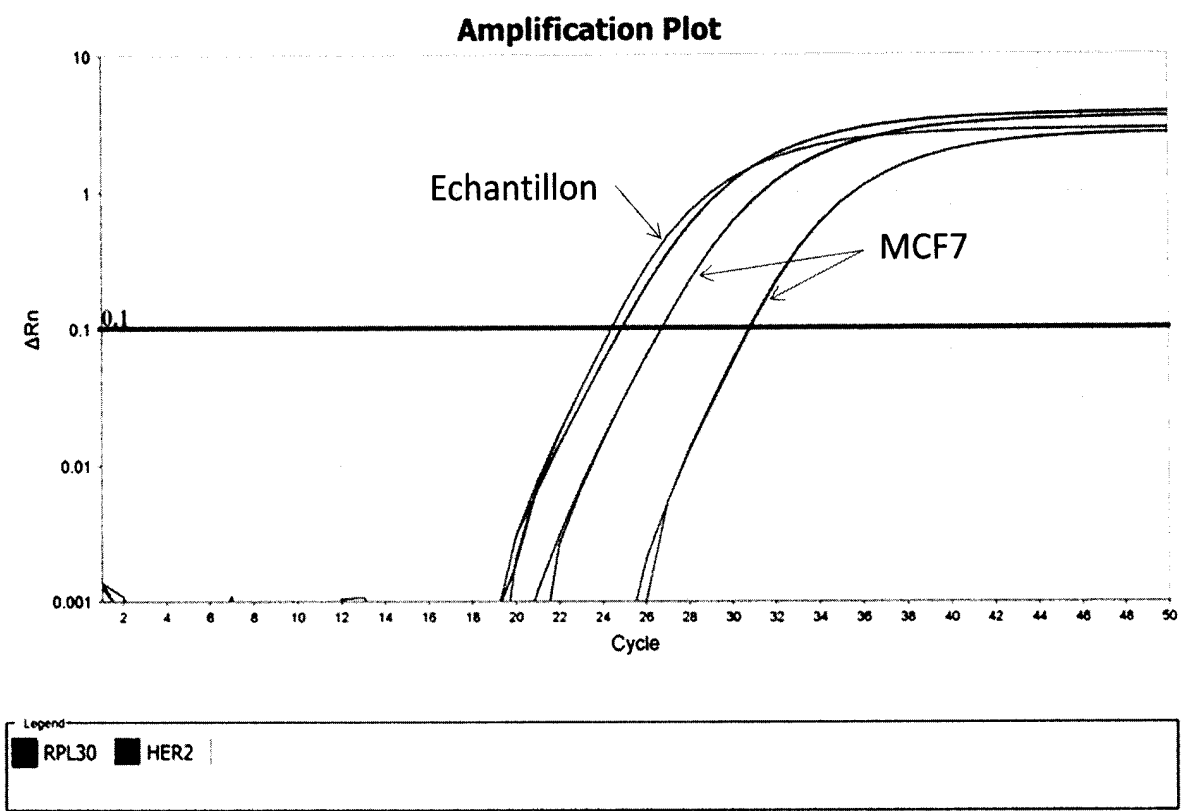
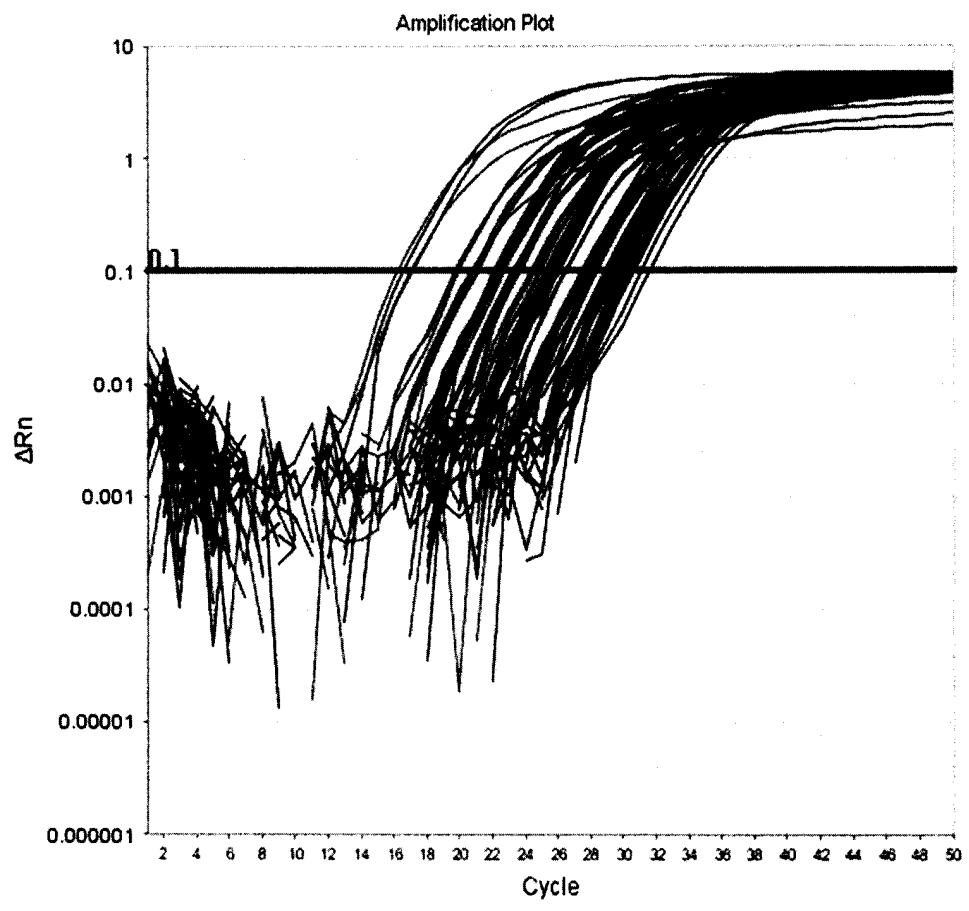


Figure 3



ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE

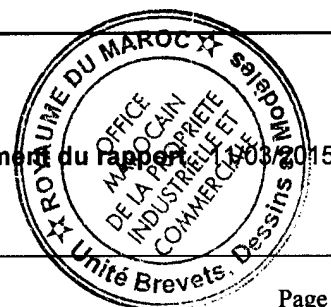


المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية و التجارية

**RAPPORT DE RECHERCHE
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la
protection de la propriété industrielle)

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 37437	Date de dépôt : 17/10/2014
Déposant : MASCIR (MORROCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & RESEARCH)	
Intitulé de l'invention : KIT DE DIAGNOSTIC DU CANCER DE SEIN EN RÉACTION QPCR MULTIPLEX ET SON APPLICATION DANS L'ÉVALUATION DU STATUT DE LA PROTÉINE HER2 ET LE CHOIX DU TRAITEMENT	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents cités par l'examineur dans la partie rapport de recherche sont joints au présent document	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport <input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité <input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de clarté <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée <input type="checkbox"/> Cadre 7 : Défaut d'unité d'invention	
Examineur: R. TELLAA	Date d'établissement du rapport : 17/03/2015
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	



Partie 1 : Considérations générales		
<i>Cadre 1 : base du présent rapport</i>		
Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :		
<ul style="list-style-type: none"> • <u>Description</u> Pages 1 - 14 • <u>Revendications</u> 9 • <u>Planches de dessin</u> Pages 18 - 20 		
Partie 2 : Rapport de recherche		
Classement de l'objet de la demande :		
CIB : C 12N 15/11, C 12Q 1/68		
Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :		
EPOQUE, Orbit		
Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
X A	US20080261227; 23/10/2008; SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS [US].	1, 5 2, 3, 4, 6-9
X A	ELAINE LYON et al; QUANTIFICATION OF HER2/NEU GENE AMPLIFICATION BY COMPETITIVE PCR USING FLUORESCENT MELTING CURVE ANALYSIS ; 01/05/2001	1, 5 2, 3, 4, 6-9
X A	MASSIMO BARBERIS et al ; QUANTITATIVE PCR AND HER2 TESTING IN BREAST CANCER - A TECHNICAL AND COST-EFFECTIVENESS ANALYSIS ; 01/01/2008	1, 5 2, 3, 4, 6-9
X A	MELANIE KÖNIGSHOFF; HER-2 / NEU NOMBRE GENE COPIE QUANTIFIÉ PAR PCR EN TEMPS RÉEL: COMPARAISON DES AMPLIFICATION GÉNIQUE, HÉTÉROZYGOTIE, ET IMMUNOHISTOCHIMIQUE STATUT DANS LES TISSUS DU CANCER DU SEIN ; 01/02/2003	1, 5 2, 3, 4, 6-9
X A	US20110003753; [US] SAMUEL WAXMAN CANCER RES FOUNDATION; 06/01/2011	1, 5 2, 3, 4, 6-9
A	WO2014104867; MOROCCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & [MA] RES MASCIR; 03/07/2014	1 - 9
*Catégories spéciales de documents cités :		

-« X » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
 -« Y » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
 -« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
 -« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs
 -« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité

Cadre 4 : Remarques de clarté

- a) des caractéristiques énoncées dans la revendication 1 de kit de diagnostic portent sur un procédé d'utilisation du dispositif, au lieu de définir clairement ce dispositif en termes de caractéristiques techniques. Les limitations visées ne ressortent donc pas clairement de cette revendication, le procédé d'utilisation dudit kit doit être rédigé dans une revendication indépendante.
- b) La revendication 4 présente une forme de redondance par rapport à la revendication 1 puisqu'elle n'ajoute aucun détail technique de plus par rapport à cette dernière.

Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle

Nouveauté (N)	Revendications 2, 3, 4, 6-9	Oui
	Revendications 1, 5	Non
Activité inventive (AI)	Revendications 2, 3, 4, 6-9	Oui
	Revendications 1, 5	Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1 - 9	Oui
	Revendications aucune	Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

- D1 : US20080261227
 D2 : QUANTIFICATION OF HER2/NEU GENE AMPLIFICATION BY COMPETITIVE PCR USING FLUORESCENT MELTING CURVE ANALYSIS
 D3 : QUANTITATIVE PCR AND HER2 TESTING IN BREAST CANCER - A TECHNICAL AND COST-EFFECTIVENESS ANALYSIS
 D4 : HER-2 / NEU NOMBRE GENE COPIE QUANTIFIÉ PAR PCR EN TEMPS RÉEL: COMPARAISON DES AMPLIFICATION GÉNIQUE, HÉTÉROZYGOTIE, ET IMMUNOHISTOCHIMIQUE STATUT DANS LES TISSUS DU CANCER DU SEIN
 D5 : US20110003753
 D6 : WO2014104867

1. Nouveauté (N) :

L'objet des revendications 1 et 5 n'est pas nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Le document D1 écrit l'utilisation de la Q-PCR en temps réel pour le pronostic, le traitement et la détection du gène HER2 en utilisant le gène MMP-28 comme témoin par le procédé suivant: d'abord une étape de dénaturation à 95 °C pendant 5 minutes suivie par 40 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 5 secondes, hybridation à 60 °C pendant 30 secondes et élongation à 72 °C pendant 30 secondes. L'ADN complémentaire "ADNc" est réalisé à partir d'ARN par transcription inverse. La pureté de l'ADN a été déterminée par la densité optique (DO), la détection et la quantification de HER2 sont effectuées en utilisant la MMP-28 en tant que témoin. Pour la détermination de l'expression des gènes, les valeurs ont été montrées dans les molécules par microgramme d'ARN total et sont issues de la delta-Ct entre le gène GAPDH et le gène cible, le même document divulgue l'utilisation du gène RPL30 pour le contrôle.

Le document D2 décrit des méthodes de détection moléculaire par amplification du gène HER2 comprenant l'hybridation fluorescente in situ (FISH) et PCR compétitive dans un système de PCR quantitative a été conçu en utilisant des sondes d'hybridation fluorescentes et un concurrent qui diffère du HER2 par un seul changement de séquence de base.

Le document D3 a pour objet l'utilisation de la rt-PCR quantitative pour la détection du gène HER2 dans le cancer du sein.

Aucun des documents cité en-dessus ne divulgue l'utilisation d'amorces ayant des séquences telles que celles décrites dans la présente demande.

Par conséquent l'objet de la revendication 2 ainsi que toutes les revendications dépendantes 3, 4, 6-9 est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive (AI) :

L'objet des revendications 1 et 5 n'est pas nouveau et n'implique pas donc une activité inventive au sens de l'article 28 de la loi N° 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Le document D1 considéré comme l'état de technique le plus proche de la présente demande décrit des amorces spécifiques pour leurs utilisations dans la quantification et la détection du gène HER2 pour le diagnostic du cancer du sein.

L'objet de la présente demande diffère de D1 en ce qu'il a pour objet des amorces avec des séquences nucléotidiques différentes de celles revendiquées dans la présente demande la demande.

Le problème technique que la présente invention se propose de résoudre peut être considéré comme la fourniture d'autres amorces pour le diagnostic, le pronostic et l'orientation du traitement de la maladie du cancer du sein en utilisant la technologie de PCR pour la détection du gène

HER2.

La solution proposée dans la revendication 2 peut être considérée comme inventive pour les raisons suivantes :

L'homme de métier aurait effectué des modifications structurelles importantes sur les séquences des amorces de D1 pour arriver aux amorces de la revendication 2 de la présente demande. En plus de cela, l'homme de métier ne pouvait pas s'attendre à ce que les amorces revendiquées gardent leurs activités malgré les modifications structurelles apportées sur les séquences nucléotidiques.

Par conséquent l'objet des revendications 2-4, 6-9 implique une activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

3. Possibilité d'application industrielle (PAI) :

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.