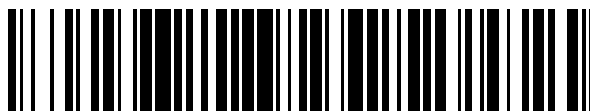


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 514**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09165252 .9**
96 Fecha de presentación: **10.07.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2272978**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2011**

54 Título: **Método isotérmico rápido, altamente sensible, para la detección de mutaciones puntuales y SNP**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.08.2012

73 Titular/es:
Biotrin International Limited
13/14 Holly Ave Stillorgan Industrial Park
Dublin, IE

72 Inventor/es:
Adlerstein, Daniel;
Amicarelli, Giulia y
Minnucci, Giulia

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 386 514 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método isotérmico rápido, altamente sensible, para la detección de mutaciones puntuales y SNP

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para detectar mutaciones puntuales de una secuencia de nucleótidos mediante una mejora del método de amplificación LAMP (polimerización mediada por amplificación por bucle). Como realización no limitativa, la invención se refiere a la mutación G1849T del gen de JAK2.

10

Antecedentes

15

20

25

Los trastornos mieloproliferativos (TMP) son trastornos clonales de progenitores hematopoyéticos, e incluyen los TMP clásicos leucemia mielógena crónica (LMC), policitemia verdadera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MFP), así como leucemia eosinofílica crónica (LEC), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) y mastocitosis sistémica (MS) y otros. En las últimas dos décadas, se han identificado alelos mutantes en LMC, LMMC, LEC y MS2-5, y en cada caso, la mutación causante da como resultado la activación constitutiva de la señalización de tirosina cinasa. Las causas genéticas de los TMP más comunes seguían siendo desconocidas hasta la identificación de mutaciones que activan la señalización de la cinasa Janus 2 (JAK2) en la mayoría de los pacientes con PV, TE o MFP(1, 2, 3, 4). La JAK2 es un miembro de la familia Janus de tirosina cinasas no receptoras citoplásmicas, que también incluye JAK1, JAK3 y TYK2. La mutación es una sustitución de guanina-a-timidina en la base 1489 (n.º de acceso al GenBank NM_004972), que da como resultado una sustitución de valina por fenilalanina en el aminoácido 617 de la proteína JAK2 (JAK2V617F), dentro del dominio pseudocinasa JH2 (5). La pérdida de autoinhibición de JAK2 da como resultado la activación constitutiva de la cinasa, de manera análoga a otras mutaciones en TMP y leucemia que activan de forma aberrante las tirosina cinasas (6,7,8).

30

35

La secuenciación directa sólo es sensible hasta aproximadamente un 20% del ADN mutante en un antecedente natural (9, 10). Este aspecto es muy relevante para los trastornos mielógenos crónicos, en los que la sangre y la médula a menudo se componen de una mezcla de elementos hematopoyéticos normales neoplásicos y residuales. En especial, en el caso de TE y SMD, en los que pueden estar presente mutaciones génicas fenotípicamente aparentes en pequeños clones comprendiendo menos de un 10% de la población de células de la médula total. James et al. (11) exploró este aspecto específicamente con respecto a 1849 G-T de JAK2 realizando una serie de experimentos de mezclado con células de eritroleucemia HEL, que llevan la mutación de JAK2, mezclada con células de eritroleucemia TF-1, que no lo llevan. Se falló en la detección del alelo mutado cuando estaba presente en < 5% del ADN total. Con ADN de paciente con mutante homocigótico diluido en ADN de una persona sana, la secuenciación fue incluso menos sensible (10%) que con las líneas celulares (12).

40

45

Un método común usado es el sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS). Aprovecha el hecho de que los cebadores de oligonucleótidos deben estar perfectamente alineados en extremos 3' para que una ADN polimerasa extienda estos cebadores durante la PCR (12). Al diseñar cebadores de oligonucleótidos que sólo se emparejen con una mutación puntual de ADN específica, tales como los que codifican V617F de JAK2, el ARMS puede distinguir entre alelos polimórficos. Por lo tanto, estas técnicas van por los nombres alternativos de "PCR específica de alelo" (AS-PCR) o "PCR de cebador específico de secuencia". La sensibilidad del ARMS es hasta de un 1 a un 2% (13) de ADN mutante en un antecedente natural.

50

La monitorización en tiempo real de la acumulación del producto de PCR durante el termociclado puede ser de utilidad como método semicuantitativo y se pueden usar ensayos de curvas de fusión de ADN junto con la PCR en tiempo real. Asimismo, James et al. (14) comparó la secuenciación de la química de tintes fluorescentes secuenciación con dos sistemas de detección de mutación basados en PCR en tiempo real diferentes, uno usando un instrumento LightCycler (Roche Diagnostics) y el otro usando una máquina Taqman ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Estas técnicas de PCR en tiempo real detectaron de un 0,5 a un 1% de ADN de línea celular de HEL diluido en ADN de línea celular de TF-1 y de un 2 a un 4% de ADN de paciente mutado homocigóticamente diluido en ADN de una persona sana.

55

60

Es posible un análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) ya que la mutación 1849 G-T de JAK2 suprime un motivo en la secuencia de JAK2 natural que se reconoce por la enzima de restricción BsaXI. Aunque la supresión de un sitio de restricción no es tan satisfactoria como la creación de un nuevo sitio, debido a que una reacción de escisión enzimática negativa se podría deber a la ausencia de la mutación o bien al fallo en el procedimiento de digestión, puede ser útil como un análisis de primer paso. La sensibilidad proporcional comunicada depende en parte del método usado para detectar los fragmentos y aproximadamente es de un 20% de ADN mutante en un antecedente natural (15,16).

65

La pirosecuenciación es un método de genotipado rápido que depende de la liberación de pirofosfato (PPi) siempre que se incorpore un dNTP en una cadena de ADN creciente durante la polimerización de ADN conducida por plantilla (17). La pirosecuenciación de JAK2 usando el sistema HS 96 PSQ automatizado (Biotage, Uppsala, Suecia) se ha tratado por varios grupos (17,18) con experimentos de dilución similares a los descritos anteriormente mostrando una sensibilidad del ensayo comunicado de un 5 a un 10% de alelos mutantes en un antecedente natural.

Se han descrito muchas otras técnicas de detección de mutación, incluyendo el análisis de polimorfismo de conformación de cadena simple (PCCS), electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), cromatografía líquida de alta eficacia de desnaturalización (DHPLC), ensayos de extensión de cebador de nucleótido simple (Pronto), y otros. De hecho, la DHPLC puede detectar la mutación de ADN genómico subyacente a V617F de JAK2 de forma fiable, y puede detectar mutaciones en una proporcionalidad de <1 a un 2%. Sin embargo, la DHPLC y las otras técnicas son un reto técnico o bien son laboriosas o ambas cosas. Éstas no permiten un alto rendimiento a un coste adecuado para un laboratorio clínico (PCCS y DGGE) o bien requieren una inversión inicial considerable en equipo (DHPLC).

En teoría, también se podían usar técnicas basadas en proteínas para detectar la mutación V617F de JAK2, pero en general son engorrosas, y el acceso a estos recursos es limitado. Por lo tanto, normalmente no se prefieren ensayos basados en proteínas si las pruebas basadas en ADN o ARN son viables.

El documento EP 1692281 da a conocer un método de detección de mutación de JAK2 basado en la amplificación de PCR. El método descrito presenta varias limitaciones. La primera de todas, el menor nivel de sensibilidad, que permite la detección de las secuencias mutantes de JAK2 de hasta un 1% de la muestra en el mejor de los casos. Esta sensibilidad requiere el enriquecimiento de los mutantes por medio de aislamiento de granulocitos antes de la extracción. Esta etapa consume tiempo y es laboriosa y añade aproximadamente 2 horas a los procedimientos ya largos (desde 2 hasta 5 horas) requeridos para el diagnóstico. Además, todos los métodos descritos son relativamente laboriosos y caros, requiriendo a menudo un equipo especializado que no siempre puede estar fácilmente disponible.

Los métodos para la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) empleando cebadores internos FIP y BIP y cebadores de bucle LB o LF, además de cebadores externos F3 y B3, se dan a conocer en la solicitud internacional de patente WO 2009/049630; la publicación de la solicitud de patente de los EE. UU. n.º US 2007/218464; la solicitud de patente europea EP 1975249; así como en la referencia NAGAMINE et al., Clinical Chemistry, vol. 47, n.º 9, septiembre de 2001, páginas 1742-1743.

Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han establecido un método novedoso para la detección de mutaciones puntuales que es selectivo y rápido. El método se aparta de la tecnología LAMP, como se da a conocer en el documento EP 1020534 y se representa en el presente documento en la Fig. 1.

El ensayo es fácil de realizar, ya que se necesita una instrumentación sencilla y produce los resultados en una reacción de un solo tubo. Por estos motivos, también es menos caro con respecto a los otros métodos descritos anteriormente.

El método supera las limitaciones destacadas en otras técnicas. Es más selectivo (hasta un 0,01% de secuencias mutantes en antecedentes naturales (wt)); es isotérmico y rápido, completando el diagnóstico en una reacción de una hora.

El método se refiere a una amplificación selectiva simultánea y una detección de una sustitución de una única base en ácidos nucleicos.

Por lo tanto, es un objetivo de la invención un método para detectar la presencia de una mutación puntual de una molécula de ácido nucleico diana en un antecedente de moléculas naturales de ácido nucleico, que comprende las etapas de:

a. obtener una muestra de ácido nucleico;

b. poner en contacto dicha muestra de ácido nucleico, en condiciones de reacción apropiadas, con una solución que comprende una mezcla de oligonucleótidos y una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena bajo condiciones de hibridación, en el que dicha mezcla de oligonucleótidos consiste en cebadores adecuados para una amplificación isotérmica mediada por bucle de la región de la molécula de ácido nucleico incluyendo teóricamente la mutación puntual, comprendiendo dichos cebadores:

i) dos cebadores externos F3 y B3;

ii) dos cebadores internos FIP y BIP, en el que FIP incluye dos secuencias de oligonucleótidos F2 y F1c, y BIP incluye dos secuencias de oligonucleótidos, B2 y B1c, en el que dichos cebadores internos FIP y BIP pueden reconocer e hibridarse a dos regiones diferentes y opuestas, F2c y B2c respectivamente, de la molécula de ácido nucleico diana, en el que el cebador BIP está diseñado para hibridarse corriente abajo de la mutación puntual, o bien el cebador FIP está diseñado para hibridarse corriente arriba de la mutación puntual, y en el caso de que el cebador BIP esté diseñado para hibridarse corriente abajo de la mutación puntual, entonces el cebador FIP está diseñado para hibridarse a la secuencia diana de modo que la mutación puntual se sitúe en o corriente abajo de la secuencia de F2c y corriente arriba de F1c, o en el caso de que el cebador FIP esté diseñado para hibridarse corriente arriba de la mutación puntual,

ES 2 386 514 T3

entonces el cebador BIP está diseñado para hibridarse a la secuencia diana de modo que la mutación puntual se sitúe en o corriente arriba de la secuencia de B2c y corriente abajo de B1c;

iii) un cebador extensible autoalineable LB o LF respectivamente, que comprende:

5 - una secuencia de bucle central que puede reconocer selectivamente e hibridarse a la región que comprende la mutación puntual teórica de la molécula de ácido nucleico sólo si está presente la mutación puntual,

- una secuencia de extremo 5', y

10 - una secuencia de extremo 3', siendo dichas secuencias de extremo 5' y de extremo 3' complementarias entre sí para formar un tallo, de modo que dicha secuencia de bucle central tenga una afinidad de hibridación mayor para la región que comprende la mutación puntual teórica de la molécula de ácido nucleico que la afinidad de hibridación de la secuencia de extremo 5' con respecto a la secuencia de extremo 3', de modo que de como resultado un alineamiento y amplificación de la región que comprende la mutación puntual teórica de la molécula de ácido nucleico;

iv) un resto no extensible para reconocer e hibridarse selectivamente a la secuencia WT (natural) de la molécula de ácido nucleico;

20 c. incubar la mezcla resultante a una temperatura constante;

d. detectar una señal indicativa de amplificación de la molécula de nucleótido que comprende la mutación puntual.

25 En una realización preferida, la mutación puntual está situada en la región entre F2 y F1c o B2 y B1c; en una realización preferida alternativa, la mutación puntual está situada en la región detectada por B2 o F2.

En una realización preferida, la secuencia en el extremo 5' y la secuencia en el extremo 3' de dicho cebador extensible autoalineable es de al menos 3 nucleótidos.

30 En una realización preferida, el resto no extensible es un ácido nucleico peptídico (ANP), que tiene preferentemente al menos 10 nucleótidos.

35 El ADN y el ARN tienen un esqueleto de azúcar de desoxirribosa y ribosa, respectivamente, donde el esqueleto de ANP está compuesto por unidades de N-(2-aminoetil)-glicina repetidas enlazadas por enlaces peptídicos. Las bases de purina y pirimidina están enlazadas al esqueleto por enlaces metilencarbonilo. Los ANP se representan como péptidos, con el extremo N-terminal en la primera posición (izquierda) y el extremo C terminal en la derecha. Puesto que el esqueleto de ANP no contiene grupos fosfato cargados, la unión entre las cadenas de ANP/ADN es más fuerte que entre las cadenas de ADN/ADN debido a la falta de repulsión electrostática.

40 En una realización más preferida, dicho ácido nucleico peptídico (ANP) comprende una secuencia de bases que se pueden hibridar con la región que incluye la mutación puntual teórica dando como resultado estructuras bicatenarias que tienen respectivamente una temperatura de fusión (T_m) = X con la secuencia natural y una temperatura de fusión (T_m) = Y con la secuencia mutante, donde $Y < temperatura\ de\ incubación \leq X$ y X es al menos 5°C mayor que Y.

45 En una realización preferida, el resto no extensible es un cebador no extensible autoalineable, que comprende una secuencia de bucle central que puede reconocer selectivamente e hibridarse a la región que comprende la secuencia natural de la molécula de ácido nucleico, una secuencia de extremo 5' y una secuencia de extremo 3', siendo dichas secuencias de extremo 5' y de extremo 3' complementarias entre sí para formar un tallo, de modo que dicha secuencia de bucle central tenga una afinidad de hibridación mayor para la región que comprende la secuencia natural de la molécula de ácido nucleico que la afinidad de hibridación de la secuencia de extremo 5' con respecto a la secuencia de extremo 3', de modo que de como resultado un alineamiento y bloqueo de la secuencia wt;

50 En una realización preferida, la ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena es la polimerasa de fragmento grande Bst, o una de o una combinación de: fragmento Bca (exo-), Vent, Vent (exo-), Deep Vent, Deep Vent (exo-), fago Φ 29, fago MS-2, Z-Taq, KOD, Klenow.

En una realización preferida, la temperatura constante está comprendida entre 62 °C y 67°C.

60 En una realización preferida, la señal indicativa de amplificación de la molécula de nucleótido que comprende la mutación puntual se detecta por turbidimetría. De forma alternativa, la señal indicativa de amplificación de la molécula de nucleótido que comprende la mutación puntual se detecta por fluorescencia.

65 En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende la región del gen JAK2 humano (n.º de acceso al GenBank NM_004972 ilustrado en la figura 11a, b, c) que tiene teóricamente la mutación puntual, sustitución de guanina-a-timidina en la base 1849 (G1489T). Preferentemente, F2 Y F1c están en la posición 1730-1750 y 1770-1795, respectivamente, de la secuencia génica NM_004972; B2 está en la posición 1862-1884 de la secuencia

génica NM_004972 y B1c está en la posición 1810-1840 de la secuencia génica NM_004972. Lo más preferentemente, los cebadores tienen las siguientes secuencias:

F3 5' - GCATCTTTATTATGGCAGAGAG- 3'; (Seq Id No. 1) B3 5'-TGCTCTGAGAAAGGCATTA- 3'; (Seq Id No. 2)

FIP 5'-GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC -3'; (Seq Id No. 3)

BIP 5'-GCTTTCTCACMGCATTTGGTTTTAAATTAGCCTGTAGTTTTACTTACTCTC-3' (Seq Id No. 4)

En una realización preferida, el resto no extensible es una molécula de ANP, que tiene preferentemente la estructura:
 $\text{NH}_2\text{GAGTATGTGTCTGTGGA}^{\text{CONH}_2}$

El método de la invención se aplica también a otros genes responsables de una patología o una alteración, es decir, como KRAS, EGFR y a SNP.

La invención se describirá con referencia a ejemplos no limitantes específicos, incluyendo las siguientes figuras:

Figura 1. Principio de LAMP (técnica anterior)

La reacción básica se realiza por 4 cebadores específicos para 6 regiones de una secuencia genómica diana. Los cebadores internos se alinean y se extienden sobre la diana; el producto se desplaza en dos etapas por cebadores externos (F3, B3) y se conforma como una estructura de tallo-bucle doble (*estructura inicial*) (panel A). La estructura inicial se amplifica simultáneamente a partir de su extremo 3' libre y por otro cebador interno (panel B). Los concatémeros de ADN construidos por repeticiones invertidas del módulo inicial se sintetizan progresivamente de una manera exponencial (panel C).

Figura 2. Principio de "estrategia de PESAS" de LAMP (control que no funciona)

El conjunto de cebadores se diseña con la región de F1c y B1c complementaria respectivamente a una base corriente arriba y a una base corriente abajo del nucleótido de interés en la posición 1849. Además, la base del extremo 5' de FIP y BIP es específica para el nucleótido mutado de JAK2 y ambos cebadores internos tienen una base apareada incorrectamente en la tercera base desde el extremo 3'. Cuando se forma la estructura de pesa, si la diana en la reacción es WT, la F1c y B1c específicas mutantes no se alinearán a su extremo 3' dando como resultado que no se produce la amplificación. De manera diferente, si están presentes secuencias mutantes en solución, la F1c y B1c específicas mutantes se alinearán perfectamente, haciéndose extensible por la polimerasa.

Figura 3. Principio de "estrategia de extensión de cebador de bucle específico de alelo" de LAMP

El único cebador de un bucle en la reacción tiene la última base en el extremo 3' complementaria al nucleótido mutante T en la posición 1849 del gen JAK2. También presenta una base apareada incorrectamente en la tercera base desde el extremo 3'. Si la diana en la reacción es WT, el cebador de bucle específico mutante no se alineará en su extremo 3' dando como resultado que no se produce la amplificación. De manera diferente, si están presentes secuencias mutantes en solución, el cebador de bucle específico mutante se alineará perfectamente, haciéndose extensible por la polimerasa.

Figura 4. Principio de "estrategia de cebadores de bucle autoalineados" de LAMP

Conjunto universal (insensible a mutante) de cebadores que comprende F3, B3, FIP y BIP para obtener una pesa que presenta el nucleótido mutado teórico en la región de bucle. Se incluye un cebador de bucle particular diseñado para reconocer la base mutada en la estructura de pesa monocatenaria junto con otro cebador de bucle modificado, complementario a la secuencia natural de JAK2 y con el extremo 3' no extensible. Cuando está presente la secuencia de JAK2 mutada (panel A), el cebador de bucle mutante modificado rompe su estructura interna para alinearse con la diana, siendo por lo tanto extensible por la polimerasa: la amplificación puede avanzar. Cuando está presente la secuencia wt en la muestra (panel B), el cebador de bucle wt modificado se alinea a la diana wt dando como resultado que no se produce la amplificación en las secuencias wt y evitando la unión inespecífica del cebador de bucle mutante (efecto de "silenciación").

Figura 5. Principio de "estrategia de cebador de bucle autoalineado mutante con ANP" de LAMP

Conjunto universal (insensible a mutante) de cebadores que comprende F3, B3, FIP y BIP para obtener una pesa que presenta el nucleótido mutado teórico en la región de bucle. Se incluye un cebador de bucle autoalineado particular diseñado para reconocer la base mutada en la estructura de pesa monocatenaria junto con una sonda de ANP. El ANP está diseñado para ser complementario a la región de bucle comprendida entre B2 y B1c que presenta el nucleótido WT. Forma un dúplex estable sólo con la secuencia complementaria wt, evitando la alineación y la extensión del cebador de bucle autoalineado mut y, por lo tanto, suprimiendo la amplificación (panel B). No se alinea a la secuencia JAK2 mut gracias a la baja afinidad (panel A).

Figura 6. Sensibilidad de la "estrategia de PESA" de LAMP

5 Se ha llevado a cabo la reacción sobre un plásmido natural de 7×10^3 cps/ul (cuadrado), sobre un control no-diana y sobre diluciones en serie de plásmido mutante en agua (desde 7×10^3 hasta 7×10^1 cps/ul, puntos romboides, y 7×10^0 cps/ul, punto circular). Cada una de las muestras se ha sometido a prueba por triplicado. Las barras de error representan una desviación estándar. El método amplifica la diana específica antes de la inespecífica hasta una concentración de 7×10^1 cps/ul. El ensayo muestra linealidad entre 7×10^3 y 7×10^1 cps/ul de muestra mutante.

10 Figura 7. Sensibilidad de "cebador de bucle mutante específico de alelo" de LAMP

15 Se ha llevado a cabo la reacción sobre un plásmido natural de 7×10^3 cps/ul (punto cuadrado), sobre un control no-diana y sobre diluciones en serie de plásmido mutante en agua (desde 7×10^3 hasta 7×10^1 cps/ul, puntos romboides). Cada muestra se ha sometido a prueba por triplicado. Las barras de error representan una desviación estándar. El método amplifica la diana específica antes de la inespecífica hasta una concentración de 7×10^2 cps/ul. El ensayo muestra linealidad entre 7×10^3 y 7×10^1 cps/ul de muestra mutante.

Figura 8. Selectividad de "cebador de bucle autoalineado" de LAMP

20 Se ha llevado a cabo la reacción sobre un plásmido natural de 7×10^3 cps/ul (punto cuadrado), sobre un control no-diana y sobre diluciones en serie de plásmido mutante en plásmido natural, en proporciones de desde un 75% hasta un 1%, 35000 cps de cantidad total de ADN por reacción. Cada muestra se ha sometido a prueba por triplicado. Las barras de error representan una desviación estándar. El método amplifica la diana específica antes que la inespecífica hasta una dosis de un 1% (plásmido mut de 350 cps más plásmido wt de 34650 cps). El ensayo muestra linealidad entre un 100% y un 1% de muestra mutante en antecedente wt.

Figura 9. "Cebador de bucle autoalineado con ANP" de LAMP

30 Prueba del ensayo en presencia y ausencia de ANP en plásmido mutado y wt (35000 cps cada uno). En ausencia de ANP, el plásmido WT se amplifica inespecíficamente por el cebador de bucle mutante autoalineado, con un retraso de 5 min con relación a la diana mutada específica. En presencia de ANP, el plásmido WT no se amplifica dentro de una hora de reacción por el cebador de bucle mutante autoalineado. La amplificación del plásmido mutante se retrasa aproximadamente 5 minutos. El ANP forma un dúplex estable sólo con la secuencia complementaria wt, evitando la alineación y la extensión del cebador de bucle autoalineado mut y, por lo tanto, suprimiendo la amplificación dentro de 35 1 hora de la reacción.

Figura 10. Selectividad de "cebador de bucle autoalineado con ANP" de LAMP

40 Prueba del ensayo sobre plásmido mutado (350000 cps), plásmido natural (350000 cps) y sobre plásmido mutado diluido en serie en plásmido wt en una proporción de un 1, 0,5, 0,1, 0,05 y 0,01%. Las barras de error corresponden a 1 desviación estándar. La muestra WT (plásmido wt de 350000 cps) no se amplifica en una hora de reacción. La diana mutante específica se detecta hasta un 0,01% de secuencias mutantes en wt (35 copias de plásmido mutante tot en 349650 copias de plásmido wt). El ensayo es lineal hasta un 0,1% de MUT (350 copias de plásmido mutante tot en 349650 copias de plásmido wt).

45 La figura 11a,b,c ilustra la secuencia del gen JAK2 humano disponible bajo en n.º de acceso al GenBak NM 004972 y designada como SEQ ID No. 23 en el listado de secuencias.

Ejemplo 1 - Materiales, métodos y resultados de la "estrategia de pesa" de LAMP modificada por JAK2

Reactivos

50 Se sintetizaron los plásmidos de JAK2 por el proveedor GeneArt (Regensburg, Alemania) para que contuvieran la secuencia de JAK2 natural o la mutante. En detalles:

55 - plásmido de JAK2 cuya inserción corresponde a la secuencia 1689-1722 de MN_004972, incluyendo una base G en el nucleótido 1849, denominado como "*plásmido wt*";

60 - plásmido de JAK2 cuya inserción corresponde a la secuencia 1689-1722 de MN_004972 clonada, incluyendo una base T en el nucleótido 1849, denominado como "*plásmido mut*";

Cebadores: sintetizados por el proveedor Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania) denominados "*cebadores*":

65 - GA211 (F3) 5' GTCAAACAACAATTCTTTGTACT 3' (Seq Id No. 5)

- GA212 (B3) 5' AGCTGTGATCCTGAAACTG 3' (Seq Id No. 6)

ES 2 386 514 T3

- GA216 (FIP) 5'AATATACTCCATAATTTAAACCAAATGCTTTCTTTCTTTGAAGCAGCAAGT 3' (Seq Id No. 7)
- GA220(BIP) 5'TTTTGTGGAGACGAGAGTAAGTAAACTACATAAACAAAAACAGATGCTCTGA 3' (Seq Id No. 8)
- GA221 (LF) 5' GTGAGAAAGCTTGCTCATCAT 3' (Seq Id No. 9)
- GA222 (LB) 5' AGGCTTTCTAATGCCTTTC 3' (Seq Id No. 10)

10 Tampón de reacción: Tris HCl 100 mM pH 8,8, KCl 50 mM, MgSO₄ 40 mM, (NH₄)₂SO₄ 50 mM, Tween al 0,5%, DMSO al 5% "*tampón 5x*"

Mezcla de dNTP 25 mM (Fermentas), "*dNTP*"

15 Polimerasa de fragmento grande Bst 8U/ul (New England Biolabs), "*Polimerasa*"

Agua apirógena estéril (SALF Spa), "*ddw*"

Procedimiento

20

Preparación de la muestra

25

Preparar la mezcla de reacción como sigue: Cebadores externos 0,2 μM (F3 y B3), cebadores internos 1,6 μM (FIP y BIP), cebadores de bucle 0,8 μM (LF y LB), 1x solución tampón, mezcla de dNTP 1,4 mM, Bst polimerasa 8 U. El volumen final de la mezcla de reacción debe ser 4/5 del volumen de reacción total (es decir, 20 μl de mezcla de reacción + 5 μl de muestra). Mantener siempre los reactivos en hielo. Preparar la mezcla para al menos 17 muestras, comprendiendo 3 de control negativo (7e3 cps/ul de plásmido natural), 12 de control positivo (3 muestras de 7e3 cps/ul de plásmido mutante, 3 muestras de 7e2 cps/ul de plásmido mutante, 3 muestras de 7e1 cps/ul de plásmido mutante, 3 muestras de 7e0 cps/ul de plásmido mutante), 1 de control no diana.

30

Tabla 1 - composición de mezcla de muestra

Tubo de muestra	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-19
Diana que se va a añadir (5 μl)	Plásmido Wt de 7e3 cps/μl	Plásmido Mut de 7e3 cps/μl	Plásmido Mut de 7e2 cps/μl	Plásmido Mut de 7e1 cps/μl	Plásmido Mut de 7e0 cps/μl	
GA211 100 μM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GA212 100 μM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GA 221 100 μM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
GA 221 100 μM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
GA 216 100 μM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
GA 220 100 μM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Tampón de LAMP 5x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Bst polimerasa 8 U/μl	1	1	1	1	1	1
dNTP 25 mM	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Ddw para 20 μl	13,18	13,18	13,18	13,18	13,18	13,18

35

Dispensar 20 μl de mezcla de reacción en la tira. Mantener las tiras sobre hielo. Mantener siempre la mezcla de reacción en hielo a partir de ahora.

40

Preparar diluciones en serie de la diana ("*diluciones diana*") a partir de la solución enviada (plásmido wt y plásmido mut). La solución enviada es de $7 \cdot 10^{10}$ copias/μl. Diluir inicialmente el plásmido mutante hasta $7 \cdot 10^4$ copias/μl en Tris 10 mM, después diluir en serie hasta 7e3 cps/μl, 7e2 cps/μl, 7e1 cps/μl y 7e0 cps/μl en Tris 10 mM. Diluir el plásmido wt hasta $7 \cdot 10^3$ copias/μl en Tris 10 mM.

Añadir 5 μl de diluciones diana a las tiras, por triplicado. Añadir 5 μl de las diluciones diana comenzando por la de menos concentración hasta la de más concentración. Cerrar todos los tubos.

Reacción

La reacción sigue el esquema de método de la figura 1 y 2.

5 Programar el turbidímetro (Teramecs) para una incubación a temperatura constante y monitorización en tiempo real de la turbidez, para obtener una temperatura de reacción constante de 66°C durante 1 hora.

Colocar las tiras en el instrumento inmediatamente antes del inicio de los programas. Iniciar el programa.

10 Análisis de datos

Analizar la variación de la absorbancia en términos de u.a. (unidades arbitrarias de absorbancia) para encontrar el tiempo umbral para cada muestra analizada. El tiempo umbral es el minuto en el que la absorbancia de la muestra, después de restar el valor de referencia, alcanza el valor de unidad arbitraria que representa el valor umbral (en este caso 0,1 u.a.). El tiempo umbral alcanzado por cada muestra se correlaciona con su Log de copias de ADN/μl.

15 Resultados

20 La "estrategia de la pesa de JAK2 de la LAMP" se basa en el método de LAMP de Eiken para la detección de SNP (descrito en el documento EP 1231281, 20, 21, 22, así como en http://e/loopamp.eiken.co.jp/lamp/snps_anim.html). Como se muestra en la figura 2, el conjunto de cebadores se diseña con la región de F1c y B1c complementaria respectivamente a una base corriente arriba y a una base corriente abajo del nucleótido de interés en la posición 1849. Además, la base del extremo 5' de FIP y BIP es específica para el nucleótido mutado de JAK2 y ambos cebadores internos tienen una base apareada incorrectamente en la tercera base desde el extremo 3'. Cuando se forma la estructura de pesa, si la diana en la reacción es WT, la F1c y B1c específicas mutantes no se alinearán a su extremo 3' dando como resultado que no se produce la amplificación debido a que el apareamiento erróneo en su extremo 3' no debería ser extensible. De manera diferente, si están presentes secuencias mutantes en solución, la F1c y B1c específicas mutantes se alinearán perfectamente, haciéndose extensible por la polimerasa.

30 Como se muestra en la figura 6, el ensayo puede detectar el plásmido mutante desde 7e3 cps/μl hasta 7e0 cps/μl (35 copias de plásmido mutante tot). Se amplifica inespecíficamente el plásmido wt de 7e3 cps/μl, sin distinguir las concentraciones menores de plásmido mut de la diana inespecífica. El nivel de selectividad debería ser menor de un 1%, que es el límite mostrado por las otras técnicas en la literatura. Con este enfoque no se tiene ninguna ventaja clara.

35 **Ejemplo 2 - Materiales, métodos y resultados de la "estrategia de extensión de cebadores de bucle específicos de alelo" de LAMP modificada por JAK2**

Reactivos

40 Se sintetizaron los plásmidos de JAK2 por el proveedor GeneArt (Regensburg, Alemania) para que contuvieran la secuencia de JAK2 natural o la mutante. En detalles:

45 - cuya inserción corresponde a la secuencia 1689-1722 de MN_004972, incluyendo una base G en el nucleótido 1849, denominado como "*plásmido wt*"

- cuya inserción corresponde a la secuencia 1689-1722 de MN_004972, incluyendo una base T en el nucleótido 1849, denominado como "*plásmido mut*"

Cebadores: sintetizados por Eurofins MWG Operon, denominados "*cebadores*":

50 - JAKR5 (F3) 5' TCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAG 3' (Seq Id No. 11)

- JAKR2 (B3) 5'AAGGCATTAGAAAGCCTGTAGT 3'(Seq Id No. 12)

55 - JAKR7 (FIP) 5'ACAAAGAATTGTTGTTTGACTGTTGTCCATTGCATCTTTATTATGGCAGAGAGAA3' (Seq Id No. 13)

- JAKR8 (BIP) 5'AGTCTTTCTTTGAAGCAGCAAGTATGATGTTACTTACTCTCGTCTCCACAGA 3' (Seq Id No. 14)

60 - JAKR9 (LB) 5' AGCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTAGGTT 3' (Seq Id No. 15) la base subrayada corresponde a un nucleótido apareado erróneamente. La base en negrita corresponde al nucleótido mutado en la posición 1849 del gen JAK2.

Tampón de reacción: Tris HCl 100 mM pH 8,8, KCl 50 mM, MgSO4 40 mM, (NH4)2SO4 50 mM, Tween al 0,5%, "*tampón 5x*"

65 Mezcla de dNTP 25 mM (Fermentas), "*dNTP*"

Polimerasa de fragmento grande Bst 8U/ul (New England Biolabs), "Polimerasa"

Agua apirógena estéril (SALF Spa), "ddw"

5

Procedimiento

Preparación de la muestra

10 Reservar los cebadores en alícuotas. Es mejor almacenar las soluciones madre a -20°C, mientras que las diluciones de trabajo se deben almacenar a 4 °C.

15 Preparar la mezcla de reacción como sigue: Cebadores externos 0,2 μM (F3 y b3), cebadores internos 1,6 μM (FIP y BIP), cebadores de bucle 0,8 μM (LB), 1x solución tampón, mezcla de dNTP 1,4 mM, Bst polimerasa 8 U. El volumen final de la mezcla de reacción debe ser 4/5 del volumen de reacción total (es decir, 20 μl de mezcla de reacción + 5 μl de muestra). Mantener siempre los reactivos en hielo. Preparar la mezcla para al menos 14 muestras, comprendiendo 3 controles negativos (7e3 cps/ul de plásmido natural), 9 de control positivo (3 muestras de 7e3 cps/ul de plásmido mutante, 3 muestras de 7e2 cps/ul de plásmido mutante, 3 muestras de 7e1 cps/ul de plásmido mutante), 1 de control no diana.

20

Tabla 2 - composición de mezcla de muestra

Tubo de muestra	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-19
Diana que se va a añadir (5 μl)	Plásmido Wt de 7e3 cps/μl	Plásmido Mut de 7e3 cps/μl	Plásmido Mut de 7e2 cps/μl	Plásmido Mut de 7e1 cps/μl	Plásmido Mut de 7e0 cps/μl	
JAKR5 100 μM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
JAKR2 100 μM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
JAKR7 100 μM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
JAKR8 100 μM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
JAKR9 100 μM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampón de LAMP 10x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Bst polimerasa 8 U/μl	1	1	1	1	1	1
dNTP 25 mM	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Ddw para 20 μl	14	14	14	14	14	14

25 Dispensar 20 μl de mezcla de reacción en la tira. Mantener las tiras sobre hielo. Mantener siempre la mezcla de reacción en hielo a partir de ahora.

25

30 Preparar diluciones en serie de la diana ("*diluciones diana*") a partir de la solución enviada (plásmido wt y plásmido mut). La solución enviada es de $7 \cdot 10^{10}$ copias/μl. Diluir inicialmente el plásmido mutante hasta $7 \cdot 10^4$ copias/μl en Tris 10 mM, después diluir en serie hasta 7e3 cps/μl, 7e2 cps/μl, 7e1 cps/μl en Tris 10 mM. Diluir el plásmido wt hasta $7 \cdot 10^3$ copias/μl en Tris 10 mM. Añadir 5 μl de diluciones diana a las tiras, por triplicado. Añadir 5 μl de las diluciones diana comenzando por la de menos concentración hasta la de más concentración. Cerrar todos los tubos.

30

Reacción

35 La reacción sigue el esquema de método de la figura 3.

35

Programar el turbidímetro (Teramecs) para incubación a temperatura constante y monitorización en tiempo real de la turbidez para obtener una temperatura de reacción constante a 65°C durante 1 hora.

40 Colocar las tiras en el instrumento inmediatamente antes del inicio de los programas. Iniciar el programa.

40

Análisis de datos

45 Analizar la variación de la absorbancia en términos de u.a. para encontrar el tiempo umbral para cada muestra analizada. El tiempo umbral es el minuto en el que la absorbancia de la muestra, después de restar el valor de referencia, alcanza el valor de unidad arbitraria que representa el valor umbral (en este caso 0,1 u.a.). El tiempo umbral alcanzado por cada muestra se correlaciona con su Log de copias de ADN/μl.

45

Resultados

5 Este enfoque consiste en una amplificación mutante selectiva basada en un cebador de bucle específico mutante (figura 3). Se diseñó un conjunto universal (insensible a mutante) de cebadores que comprende F3, B3, FIP y BIP para obtener una pesa que presenta el nucleótido mutado teórico en la región de bucle comprendida entre B2 y B1c. Por lo tanto, se diseñó un único cebador de un bucle que presenta la última base en el extremo 3' complementaria al nucleótido mutante T en la posición 1849 del gen JAK2. También presenta una base apareada incorrectamente en la tercera base desde el extremo 3'.

10 Si la diana en la reacción es WT, el cebador de bucle específico mutante no se alineará en su extremo 3' dando como resultado que no se produce la amplificación. De manera diferente, si están presentes secuencias mutantes en solución, el cebador de bucle específico mutante se alineará perfectamente, haciéndose extensible por la polimerasa.

15 Se sometió a prueba este ensayo sobre el plásmido mutante desde $7e3$ cps/ μ l hasta $7e1$ cps/ μ l. (35000 y 350 copias de plásmido mutante tot) sobre el plásmido wt inespecífico ($7e3$ cps/ μ l), todos por triplicado. El ensayo amplifica inespecíficamente el plásmido wt de $7e3$ cps/ μ l, sin distinguir las concentraciones de $7e1$ cps/ μ l de plásmido mut de la diana inespecífica. El nivel de selectividad debería ser menor de un 1%, que es el límite mostrado por las otras técnicas en la literatura. Con este enfoque no se tiene ninguna ventaja clara. (Figura 7).

20 **Ejemplo 3 - Materiales, métodos y resultados de la "estrategia de cebador de bucle de autoalineación" de LAMP modificada por JAK2**

Reactivos

25 Se sintetizaron los plásmidos de JAK2 por el proveedor GeneArt (Regensburg, Alemania) para que contuvieran la secuencia de JAK2 natural o la mutante. En detalles:

30 - cuya inserción corresponde a la secuencia 1689-1722 de MN_004972, incluyendo una base G en el nucleótido 1849, denominado como "*plásmido wt*"

- cuya inserción corresponde a la secuencia 1689-1722 de MN_004972, incluyendo una base T en el nucleótido 1849, denominado como "*plásmido mut*"

35 Cebadores: sintetizados por Eurofins MWG Operon, denominados "*cebadores*":

- GA231 (F3) 5' GCATCTTTATTATGGCAGAGAG 3' (Seq Id No. 16)

- GA232 (B3) 5' TGCTCTGAGAAAGGCATTA 3' (Seq Id No. 17)

40 - GA233 (FIP) 5' GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC 3' (Seq Id No. 18)

- GA234 (BIP) 5' GCTTTCTCACAAGCATTGGTTTTAAATTAGCCTGTAGTTTTACTTACTCTC 3' (Seq Id No. 19)

45 - GA235 (LF) 5'GTCTCCACTGGAGTATGTGTCTGTGGAGAddC3' (Seq Id No. 20) la base subrayada es el nucleótido natural en la posición 1849 del gen JAK2. ddC significa didesoxi-citosina no extensible.

- GA236 (LB) 5' GTCTCCACTGGAGTATGTTTCTGTGGAGAC 3' (Seq Id No. 21) la base subrayada es el nucleótido mutante en la posición 1849 del gen JAK2.

50 Tampón de reacción: Tris HCl 100 mM pH 8,8, KCl 50 mM, MgSO₄ 40 mM, (NH₄)₂SO₄ 50 mM, Tween al 0,5%, "*tampón 5x*"

Mezcla de dNTP 25 mM (Fermentas), "*dNTP*"

55 Polimerasa de fragmento grande Bst 8U/ μ l (New England Biolabs), "*Polimerasa*"

Agua apirógena estéril (SALF Spa), "*ddw*"

60 *Procedimiento*

Preparación de la muestra

65 Reservar los cebadores en alícuotas. Es mejor almacenar las soluciones madre a -20°C, mientras que las diluciones de trabajo se deben almacenar a 4 °C.

ES 2 386 514 T3

Preparar la mezcla de reacción como sigue: Cebadores externos 0,2 μM (F3 y B3), cebadores internos 1,6 μM (FIP y BIP), ambos cebadores de bucle autoalineados 0,8 μM (LF y LB no extensibles), 1x solución tampón, mezcla de dNTP 1,4 mM, Bst polimerasa 8 U. El volumen final de la mezcla de reacción debe ser 4/5 del volumen de reacción total (es decir, 20 μl de mezcla de reacción + 5 μl de muestra). Mantener siempre los reactivos en hielo. Preparar la mezcla durante al menos 26 muestras, comprendiendo 3 controles negativos (100% de plásmido natural, $7\text{e}3$ cps/ μl), 21 de control positivo (3 muestras de plásmido mutante al 100% ($7\text{e}3$ cps/ μl), 3 muestras de plásmido mutante al 75% diluido en plásmido wt, 3 muestras de plásmido mutante al 50% diluido en plásmido wt, 3 muestras de plásmido mutante al 25% diluido en plásmido wt, 3 muestras de plásmido mutante al 10% diluido en plásmido wt, 3 muestras de plásmido mutante al 5% diluido en plásmido wt, 3 muestras de plásmido mutante al 1% diluido en plásmido wt, y un control no diana).

Tabla 3 - composición de mezcla de muestra

Tubo de muestra	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-19
Diana que se va a añadir (5 μl)	Plásmido Wt de $7\text{e}3$ cps/ μl	Plásmido Mut de $7\text{e}3$ cps/ μl	Plásmido Mut de $7\text{e}2$ cps/ μl	Plásmido Mut de $7\text{e}1$ cps/ μl	Plásmido Mut de $7\text{e}0$ cps/ μl	
GA231 100 μM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GA232 100 μM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GA233 100 μM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
GA234 100 μM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
GA235 100 μM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
GA236 100 μM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampón de LAMP 10x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Bst polimerasa 8 U/ μl	1	1	1	1	1	1
dNTP 25 mM	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Ddw para 20 μl	13,8	13,8	13,8	13,8	13,8	13,8

Dispensar 20 μl de mezcla de reacción en la tira. Mantener las tiras sobre hielo. Mantener siempre la mezcla de reacción en hielo a partir de ahora.

Preparar diluciones en serie de la diana ("*diluciones diana*") a partir de la solución enviada (plásmido wt y plásmido mut). La solución enviada es de $7 \cdot 10^{10}$ copias/ μl . Diluir inicialmente el plásmido mutante hasta $7 \cdot 10^4$ copias/ μl en Tris 10 mM, después diluir en serie el plásmido mutante en plásmido wt para obtener las siguientes concentraciones de secuencias mutantes en antecedente natural: 75%, 50%, 25%, 10%, 5%, 1% (cantidad total por tubo, $7\text{e}3$ cps/ μl).

Añadir 5 μl de diluciones diana a las tiras, por triplicado. Añadir 5 μl de las diluciones diana comenzando por la de menos concentración hasta la de más concentración. Cerrar todos los tubos.

25 Reacción

La reacción sigue el esquema de método de la figura 4.

Programar el turbidímetro (Teramecs) para una incubación a temperatura constante y monitorización en tiempo real de la turbidez, para obtener una temperatura de reacción constante de 65°C durante 1 hora.

Colocar las tiras en el instrumento inmediatamente antes del inicio de los programas. Iniciar el programa.

35 Análisis de datos

Analizar la variación de la absorbancia en términos de u.a. para encontrar el tiempo umbral para cada muestra analizada. El tiempo umbral es el minuto en el que la absorbancia de la muestra, después de restar el valor de referencia, alcanza el valor de unidad arbitraria que representa el valor umbral (en este caso 0,1 u.a.). El tiempo umbral alcanzado por cada muestra se correlaciona con su Log de copias de ADN/ μl .

40 Resultados

Este enfoque consiste en una amplificación mutante selectiva basada en un diseño de cebador de bucle particular que da como resultado una hibridación selectiva de dicho cebador de bucle a la pesa formada a partir de la secuencia

mutante (figura 4). Se diseñó un conjunto universal (insensible a mutante) de cebadores que comprende F3, B3, FIP y BIP para obtener una pesa que presenta el nucleótido mutado teórico en la región de bucle comprendida entre B1 y B2. Se realizaron otros experimentos que presentaban el nucleótido mutado teórico en la región de bucle en B2 o comprendida entre B2 y B1c, sin diferencias relevantes. Se incluyó en el conjunto de cebadores un cebador de bucle particular que presentaba una región de secuencia de 8 bases en su extremo 5' complementaria a su propia secuencia en el extremo 3'. Por consiguiente, este cebador de bucle especial forma una estructura de horquilla intramolecular en equilibrio con su forma abierta a la temperatura de reacción (65°C).

Cuando está presente la secuencia de JAK2 mutada, este cebador de bucle modificado rompe su estructura interna para alinearse a la diana, gracias al equilibrio termodinámico (T_m entre cebador y diana específica = 65°C). Por consiguiente, el cebador de bucle alineado a la diana mutada específica es extensible por la polimerasa: la amplificación puede avanzar.

Cuando está presente la secuencia wt en la muestra, el mismo cebador de bucle (específico para el gen JAK2 MUT) presenta una T_m con diana inespecífica (59°C) menor que la estructura de horquilla intramolecular (65°C). Esto da como resultado un autosequestro del cebador de bucle modificado que prefiere plegarse en la estructura de horquilla en lugar de formar un dúplex con la diana inespecífica, puesto que las fuerzas intramoleculares son mayores que las intermoleculares. Para limitar la competencia del cebador de bucle descrito previamente por las secuencias naturales que probablemente están presentes en un gran exceso en la muestra clínica, se añadió otro cebador de bucle modificado caracterizado por una estructura similar a la descrita previamente, pero con una secuencia complementaria a la secuencia natural de JAK2 (con la base G en la posición 1489).

El extremo 3' de este cebador de bucle "competidor" no se hace extensible por una modificación (3'didesoxi). La tarea de este competidor es la de "silenciar" la wt y permitir que el cebador mutante específico encuentre esta diana.

Cuando el "competidor" reconoce la secuencia natural específica, rompe su estructura intramolecular para alinearse a la diana WT, gracias a una mayor afinidad (T_m de dúplex diana wt-cebador de bucle modificado wt = 67°C); El cebador de bucle alineado a la diana wt no es extensible, dando como resultado que no se produce la amplificación de las secuencias wt. Puesto que la reacción se lleva a cabo a temperatura constante, el cebador de bucle wt permanecerá alineado a las secuencias wt evitando un alineamiento inespecífico del cebador de bucle MUT.

De otra manera, el "competidor" presenta una T_m con su diana inespecífica (mutante) (62 °C) menor que la de la estructura de horquilla intramolecular que forma consigo mismo (65°C). Esto da como resultado un autosequestro del cebador de bucle modificado que prefiere plegarse en la estructura de horquilla en lugar de formar un dúplex con la diana inespecífica, puesto que las fuerzas intramoleculares son mayores que las intermoleculares.

Se ha evaluado la selectividad de este ensayo, llevando a cabo la reacción en diluciones en serie de plásmido mutante en antecedente natural (figura 8). La selectividad lograda es significativamente menor de un 1% (350 copias de plásmido mutante tot en 34650 copias de plásmido wt). Este enfoque tiene mayor selectividad que los ensayos descritos en la literatura. El ensayo es lineal entre un 100% de mutante (35000 cps) y un 1% de mutante en un 99% natural (350 copias de plásmido mutante tot en 34650 copias de plásmido wt). Esto permite la detección y cuantificación de un porcentaje bajo de secuencias mutantes en una gran cantidad de wt. Esto representa una mejora respecto a los otros enfoques mostrados en muestras anteriores y respecto a los métodos descritos en la literatura.

Ejemplo 4 - Materiales, métodos y resultados de la "estrategia de cebador de bucle de autoalineación con ANP" de LAMP modificada por JAK2

Reactivos

Se sintetizaron los plásmidos de JAK2 por el proveedor GeneArt (Regensburg, Alemania) para que contuvieran la secuencia de JAK2 natural o la mutante. En detalles:

- cuya inserción corresponde a la secuencia 1689-1722 de MN_004972, incluyendo una base G en el nucleótido 1849, denominado como "*plásmido wt*"

- cuya inserción corresponde a la secuencia 1689-1722 de MN_004972, incluyendo una base T en el nucleótido 1849, denominado como "*plásmido mut*"

Cebadores: sintetizados por Eurofins MWG Operon, denominados "*cebadores*":

- GA231 (F3) 5' GCATCTTTATTATGGCAGAGAG 3' (Seq Id No. 16)

- GA232 (B3) 5' TGCTCTGAGAAAGGCATTA 3' (Seq Id No. 17)

- GA233 (FIP) 5' GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC 3' (Seq Id No. 18)

ES 2 386 514 T3

- GA234 (BIP) 5'GCTTTCTCAACAAGCATTGGTTTAAATTAGCCTGTAGTTTACTTACTCTC 3' (Seq Id No. 19)

- GA236 (LB) 5' GTCTCCACTGGAGTATGTTTCTGTGGAGAC 3' (Seq Id No. 22) la base subrayada corresponde al nucleótido mutado en la posición 1849 del gen JAK2.

5 ANP: Eurogentec, denominado "ANP" GM43 ^{NH₂}GAGTATGTGTCTGTGGA^{CONH₂}. La base subrayada corresponde al nucleótido natural en la posición 1849 del gen JAK2.

10 Tampón de reacción: Tris HCl 100 mM pH 8,8, KCl 50 mM, MgSO₄ 40 mM, (NH₄)₂SO₄ 50 mM, Tween al 0,5%, "tampón 5x"

Mezcla de dNTP 25 mM (Fermentas), "dNTP"

15 Polimerasa de fragmento grande Bst 8U/μl (New England Biolabs), "Polimerasa"

Agua apirógena estéril (SALF Spa), "ddw"

Procedimiento

20 Preparación de la muestra

Reservar los cebadores en alícuotas. Es mejor almacenar las soluciones madre a -20°C, mientras que las diluciones de trabajo se deben almacenar a 4 °C.

25 Preparar la mezcla de reacción como sigue: Cebadores externos 0,2 μM (F3 y B3), cebadores internos 1,6 μM (FIP y BIP), cebador de bucle autoalineado específico para mutante JAK2 0,8 uM (LB), ANP 0,8 uM, 1x solución tampón, mezcla de dNTP 1,4 mM, Bst polimerasa 8 U. El volumen final de la mezcla de reacción debe ser 4/5 del volumen de reacción total (es decir, 20 μl de mezcla de reacción + 5 μl de muestra). Mantener siempre los reactivos en hielo. Preparar la mezcla durante al menos 23 muestras, comprendiendo 3 controles negativos (100% de plásmido natural, 30 7e4 cps/μl), 18 de control positivo (3 muestras de plásmido mutante al 100%, 3 muestras de plásmido mutante al 1% diluido en plásmido wt, 3 muestras de plásmido mutante al 0,5% diluido en plásmido wt, 3 muestras de plásmido mutante al 0,1% diluido en plásmido wt, 3 muestras de plásmido mutante al 0,05% diluido en plásmido wt, 3 muestras de plásmido mutante al 0,01% diluido en plásmido wt (cantidad total de ADN de 7e4 cps/μl) y un control no diana.

35 Tabla 4 - composición de mezcla de muestra

Tubo de muestra	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-19
Diana que se va a añadir (5 μl)	Plásmido Wt de 7e4 cps/μl	Plásmido Mut de 7e4 cps/μl	Plásmido Mut de 7e3 cps/μl	Plásmido Mut de 7e2 cps/μl	Plásmido Mut de 7e1 cps/μl	Plásmido Mut de 7e0 cps/μl
GA231 100 μM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GA232 100 μM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GA233 100 μM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
GA234 100 μM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
ANP 100 μM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
GA236 100 μM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampón de LAMP 10x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Bst polimerasa 8 U/μl	1	1	1	1	1	1
dNTP 25 mM	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Ddw para 20 μl	13,8	13,8	13,8	13,8	13,8	13,8

Dispensar 20 μl de mezcla de reacción en la tira. Mantener las tiras sobre hielo. Mantener siempre la mezcla de reacción en hielo a partir de ahora.

40 Preparar diluciones en serie de la diana ("*diluciones diana*") a partir de la solución enviada (plásmido wt y plásmido mut). La solución enviada es de $7 \cdot 10^{10}$ copias/μl. Diluir inicialmente el plásmido mutante hasta $7 \cdot 10^4$ copias/μl en Tris 10 mM, después diluir en serie el plásmido mutante en plásmido wt para obtener las siguientes concentraciones de secuencias mutantes en antecedente natural: 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% (cantidad total por tubo, 7e4 cps/μl).

Añadir 5 µl de diluciones diana a las tiras, por triplicado. Añadir 5 µl de las diluciones diana comenzando por la de menos concentración hasta la de más concentración. Cerrar todos los tubos.

Reacción

5 La reacción sigue el esquema de método de la figura 5.

Programar el turbidímetro (Teramecs) para una incubación a temperatura constante y monitorización en tiempo real de la turbidez para obtener una temperatura de reacción constante de 65°C durante 1 hora.

10 Colocar las tiras en el instrumento inmediatamente antes del inicio de los programas. Iniciar el programa.

Análisis de datos

15 Analizar la variación de la absorbancia en términos de u.a. para encontrar el tiempo umbral para cada muestra analizada. El tiempo umbral es el minuto en el que la absorbancia de la muestra, después de restar el valor de referencia, alcanza el valor de unidad arbitraria que representa el valor umbral (en este caso 0,1 u.a.). El tiempo umbral alcanzado por cada muestra se correlaciona con su Log de copias de ADN/µl.

20 Resultados

Este enfoque consiste en una amplificación mutante selectiva basada en un diseño de cebador de bucle particular que da como resultado una hibridación selectiva de dicho cebador de bucle a la pesa formada a partir de la secuencia mutante (figura 5). Se diseñó un conjunto universal (insensible a mutante) de cebadores que comprende F3, B3, FIP y BIP para obtener una pesa que presenta el nucleótido mutado teórico en la región de bucle comprendida entre B1 y B2. Se realizaron otros experimentos que presentaban el nucleótido mutado teórico en la región de bucle en B2 o comprendida entre B2 y B1c, sin diferencias relevantes. Se incluyó en el conjunto de cebadores un cebador de bucle particular que presentaba una región de secuencia de 8 bases en su extremo 5' complementaria a su propia secuencia en el extremo 3'. Por consiguiente, este cebador de bucle especial forma una estructura de horquilla intramolecular en equilibrio con su forma abierta a la temperatura de reacción (65°C).

30 Cuando está presente la secuencia de JAK2 mutada, este cebador de bucle modificado rompe su estructura interna para alinearse a la diana, gracias al equilibrio termodinámico (T_m entre cebador y diana específica = 65°C). Por consiguiente, el cebador de bucle alineado a la diana mutada específica es extensible por la polimerasa: la amplificación puede avanzar.

40 Cuando está presente la secuencia wt en la muestra, el mismo cebador de bucle (específico para el gen JAK2 MUT) presenta una T_m con diana inespecífica (59°C) menor que la estructura de horquilla intramolecular (65°C). Esto da como resultado un autosecuestro del cebador de bucle modificado que prefiere plegarse en la estructura de horquilla en lugar de formar un dúplex con la diana inespecífica, puesto que las fuerzas intramoleculares son mayores que las intermoleculares. Para incrementar adicionalmente la capacidad de discriminación del sistema de LAMP basada en el cebador de bucle autoalineado selectivo, se añadió a la mezcla de reacción un ácido nucleico péptidico (ANP).

45 Los ANP son oligonucleótidos no extensibles y no desplazables en los que el esqueleto de ribosa-fosfato se reemplazada por unidades (2-aminoetil)-glicina enlazadas por enlaces amida. Cada emparejamiento de bases ADN/ANP contribuye a la estabilidad de la estructura del dúplex más que a un emparejamiento de bases regular ADN/ADN. Por lo tanto, un único apareamiento erróneo en un dúplex ANP/ADN da como resultado una diferencia significativa en la T_m . Una sonda de ANP totalmente complementaria a la secuencia WT del gen JAK2 evita el alineamiento y la extensión del cebador autoalineado mutante, suprimiendo la amplificación. En presencia de un único apareamiento erróneo, el ANP no inhibe la hibridación de cebador de bucle, lo que conduce a la amplificación. Por lo tanto, se puede usar el ANP para bloquear de forma selectiva la secuencia Wt presente en la muestra.

50 El ANP está diseñado para ser complementario a la región de bucle comprendida entre B2 y B1c que presenta el nucleótido WT. Forma un dúplex estable sólo con la secuencia complementaria wt (T_m 65,7°C), evitando la alineación y la extensión del cebador de bucle autoalineado mut y, por lo tanto, suprimiendo la amplificación. No se alinea a la secuencia JAK2 mut gracias a la baja afinidad (T_m = 56°C).

55 Se ha sometido a prueba el principio de ANP realizando la reacción sobre el plásmido natural de 7 e3 cps/ul y sobre el plásmido mutante de 7 e3 cps/ul, en paralelo, en ausencia y presencia de la sonda "bloqueante wt" de ANP (figura 9).
60 En ausencia de ANP, el plásmido WT se amplifica inespecíficamente por el cebador de bucle mutante autoalineado, con un retraso de 5 min respecto a la diana mutada específica. En presencia de APN, el plásmido WT no se amplifica dentro de una hora de reacción por el cebador de bucle mutante autoalineado. La amplificación del plásmido mutante se retrasa aproximadamente 5 minutos. El APN forma un dúplex estable sólo con la secuencia complementaria wt, evitando la alineación y la extensión del cebador de bucle autoalineado mut y, por lo tanto, suprimiendo la amplificación
65 dentro de 1 hora de la reacción.

Se ha evaluado la selectividad de este ensayo, llevando a cabo la reacción en diluciones en serie de plásmido mutante en antecedente natural (figura 10). La selectividad lograda es menor de un 0,01% (35 copias de plásmido mutante tot en 34965 copias de plásmido wt). Este enfoque tiene mayor selectividad que los ensayos descritos en la técnica anterior, aproximadamente 3 Logs más respecto a la secuenciación directa, PLFR y pirosecuenciación y aproximadamente 2 Logs respecto a ARMS, técnicas en tiempo real y análisis de curva de fusión de ADN. Al igual que para el método de pesa de LAMP, no es intrínsecamente útil detectar mutaciones puntuales individuales en un antecedente alto de secuencias naturales.

La muestra WT (plásmido wt de 35000 cps) no se amplifica en una hora de reacción. La diana mutante específica se detecta hasta un 0,01% de secuencias mutantes en wt (35 copias de plásmido mutante tot en 34965 copias de plásmido wt). Este enfoque tiene mayor selectividad que los ensayos descritos en la literatura (aproximadamente 2 Logs). El ensayo es lineal hasta un 0,1% de MUT (350 copias de plásmido mutante tot en 34650 copias de plásmido wt). Esto permite la detección y cuantificación de un porcentaje bajo de secuencias mutantes en una gran cantidad de wt. Esto representa una mejora respecto a las otras estrategias descritas en este informe y respecto a los métodos descritos en la literatura.

Ejemplo 5. "Cebador de bucle autoalineado con ANP" de LAMP en muestras clínicas: comparación con ARMS

Se analizaron 29 muestras de ADN extraído de pacientes en Ospedali Riuniti di Bergamo usando la estrategia de "cebador de bucle autoalineado con ANP" de LAMP de JAK2, como se describe en el EJEMPLO 4. Los resultados obtenidos se han comparado con los obtenidos en el hospital usando la tecnología ARMS. El ARMS aprovecha el hecho de que los cebadores de oligonucleótidos deben estar perfectamente alineados en extremos 3' para que una ADN polimerasa extienda estos cebadores durante la PCR. Al diseñar cebadores de oligonucleótidos que sólo se emparejen con la mutación puntual de JAK2, el ARMS puede distinguir entre alelos naturales y mutantes.

Como se muestra en la tabla 5, se han detectado todas las muestras diagnosticadas como positivas por ARMS como positivas por LAMP. De 15 muestras que resultaron negativas por ARMS, 11 se han diagnosticado como negativas por LAMP y 4 como positivas bajas. Para excluir que las 4 muestras discordantes que resultaron mutadas por LAMP eran falsos positivos y para confirmar que el diagnóstico de mutación se debía a una mayor selectividad del método de LAMP modificado, se sometieron a prueba las muestras usando un tercer ensayo. El ensayo consiste en amplificación por PCR de la región de JAK2 de interés en presencia de la molécula de ANP complementaria a la diana natural. El propósito es enriquecer la base mutada, si está presente, por supresión del natural por medio de fijación de ANP. Si se enriquece la región mutada hasta un nivel de un 20% de la muestra, se puede detectar por secuenciación directa. Los cebadores (GA231 directo y GA232 inverso) y el ANP son los mismos que se describen anteriormente (apartado "Ejemplo 4").

Se realizó la amplificación en presencia de 1x tampón de reacción, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 200 µM, cebadores directos e inversos 500 nM, ANP 1,5M y 0,025U de Taq Gold en un volumen final de 45 µl. Se añadieron 5 µl de diana 20 ng/µl a la mezcla de reacción. Se incubó la solución resultante en un termociclador, siguiendo un programa térmico que consistía en 10 min. a 95°C seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 40 segundos a ciclos de 62 °C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C y terminando con 10 min. a 72°C para la extensión final. Las cuatro muestras clínicas discordantes, una muestra de control no diana y una diana de plásmido positiva y negativa se sometieron a prueba por duplicado. Se separaron los productos de amplificación resultantes en un gel de agarosa que contenía EtBr para visualizar las bandas de amplificación. El control no diana no se amplificó. El control negativo que contenía el plásmido natural se amplificó ligeramente, y una banda débil fue visible en el gel de agarosa. El control positivo que contenía el plásmido mutado se amplificó fuertemente presentando una banda fuerte en el gel de agarosa. Se amplificaron las muestras clínicas. Por consiguiente, los productos de la amplificación se analizaron por medio de secuenciación automática. Todas las muestras clínicas discordantes muestran un pico doble en la posición 1849, correspondiente a la base de Guanina (natural) y a la base de Timina (mutada). Este resultado confirma que las cuatro muestras discordantes se han diagnosticado correctamente como mutadas por LAMP, mientras que resultan como falso negativo por ARMS.

Tabla 5

muestra	ARMS	Cebador de bucle autoalineado con ANP de LAMP
PIGI	-	+ (baja)
PEVI	-	-
ACGI	+	+
BEMA	+	+
BILU	+	+
PAAN	-	+ (baja)
BOMA	-	-

OLIN	-	-
PALO	+	+
BOED	+	+
SAGE	+	+
BAGI	+	+
FEGI	+	+
BEAL	+	+
TALU	+	+
CAP I	+	+
SAGI	+	+
SAVGI	+	+
PECA	+	+
SCLU	-	-
BILU2	-	+ (baja)
NAGI	-	-
MAST	-	-
COSA	-	-
GUAL	-	-
COCL	-	-
PEMG	-	-
SABA	-	+ (baja)
ANPI	-	-

Ejemplo 6 - "Estrategia de cebador de bucle de autoalineación" de LAMP modificada por JAK2 fluorescente

Reactivos

- 5 Se sintetizaron los plásmidos de JAK2 por el proveedor GeneArt (Regensburg, Alemania) para que contuvieran la secuencia de JAK2 natural o la mutante. En detalles:
- 10 - cuya inserción corresponde a la secuencia 1689-1722 de MN_004972, incluyendo una base G en el nucleótido 1849, denominado como "*plásmido wt*"
- cuya inserción corresponde a la secuencia 1689-1722 de MN_004972, incluyendo una base T en el nucleótido 1849, denominado como "*plásmido mut*"
- 15 Cebadores: sintetizados por Eurofins MWG Operon, denominados "*cebadores*":
- GA231 (F3) 5' GCATCTTTATTATGGCAGAGAG 3' (Seq Id No. 16)
- GA232 (B3) 5' TGCTCTGAGAAAGGCATTA 3' (Seq Id No. 17)
- 20 - GA233 (FIP) 5' GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC 3' (Seq Id No. 18)
- GA234 (BIP) 5'GCTTTCTCACAAGCATTGTTTAAATTAGCCTGTAGTTTACTTACTCTC 3' (Seq Id No. 19)
- 25 GA236 (LB) 5TAMRA-TGTCTCCACTGGAGTATGTTTCTGTGGAGAC 3' (Seq Id No. 21) la base subrayada corresponde al nucleótido mutado en la posición 1849 del gen JAK2. La base Timina en negrita en el extremo 5' no es complementaria a la secuencia diana. Se ha añadido para separar el fluoróforo de la base de Guanina corriente abajo, lo que tiene un efecto de desactivación.
- 30 - GA235 (LF) 5'-5'GTCTCCACTGGAGTATGTGTCTGTGGAGAddC3' (Seq Id No. 20) la base subrayada es el nucleótido natural en la posición 1849 del gen JAK2. ddC significa didesoxi-citosina no extensible.

ES 2 386 514 T3

Tampón de reacción: Tris HCl 100 mM pH 8,8, KCl 50 mM, MgSO₄ 40 mM, (NH₄)₂SO₄ 50 mM, Tween al 0,5%, "tampón 5x"

5 Mezcla de dNTP 25 mM (Fermentas), "dNTP"

Polimerasa de fragmento grande Bst 8U/μl (New England Biolabs), "Polimerasa"

Agua apirógena estéril (SALF Spa), "ddw"

10

Procedimiento

Preparación de la muestra

15 Reservar los cebadores en alícuotas. Es mejor almacenar las soluciones madre a -20°C, mientras que las diluciones de trabajo se deben almacenar a 4 °C.

Preparar la mezcla de reacción como sigue: Cebadores externos 0,2 μM (F3 y B3), cebadores internos 1,6 μM (FIP y BIP), cebador de bucle autoalineado fluorescente específico para mutante JAK2 0,8 μM (LB), cebador de bucle no extensible autoalineado para JAK2 natural 0,8 μM (LF), 1x solución tampón, mezcla de dNTP 1,4 mM, Bst polimerasa 8 U. El volumen final de la mezcla de reacción debe ser 4/5 del volumen de reacción total (es decir, 20 μl de mezcla de reacción + 5 μl de muestra). Mantener siempre los reactivos en hielo. Preparar la mezcla durante al menos 23 muestras, comprendiendo 3 controles negativos (100% de plásmido natural, 7e3 cps/μl), 18 de control positivo (3 muestras de plásmido mutante al 100%, 3 muestras de plásmido mutante al 1% diluido en plásmido wt, 3 muestras de plásmido mutante al 0,5% diluido en plásmido wt, 3 muestras de plásmido mutante al 0,1% diluido en plásmido wt, 3 muestras de plásmido mutante al 0,05% diluido en plásmido wt, 3 muestras de plásmido mutante al 0,01% diluido en plásmido wt (cantidad total de ADN de 7e3 cps/μl) y un control no diana.

20

25

Tabla 6 - composición de mezcla de muestra

Tubo de muestra	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-19
Diana que se va a añadir (5 μl)	Plásmido Wt de 7e3 cps/μl	Plásmido Mut de 7e3 cps/μl	Plásmido Mut de 7e2 cps/μl	Plásmido Mut de 7e1 cps/μl	Plásmido Mut de 7e0 cps/μl	
GA231 100 μM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GA232 100 μM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GA233 100 μM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
GA234 100 μM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
GA235 100 μM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
GA236 100 μM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampón de LAMP 10x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Bst polimerasa 8 U/μl	1	1	1	1	1	1
dNTP 25 mM	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Ddw para 20 μl	13,8	13,8	13,8	13,8	13,8	13,8

30

Dispensar 20 μl de mezcla de reacción en la tira. Mantener las tiras sobre hielo. Mantener siempre la mezcla de reacción en hielo a partir de ahora.

35

Preparar diluciones en serie de la diana ("*diluciones diana*") a partir de la solución enviada (plásmido wt y plásmido mut). La solución enviada es de $7 \cdot 10^{10}$ copias/μl. Diluir inicialmente el plásmido mutante hasta $7 \cdot 10^4$ copias/μl en Tris 10 mM, después diluir en serie el plásmido mutante en plásmido wt para obtener las siguientes concentraciones de secuencias mutantes en antecedente natural: 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% (cantidad total por tubo, 7e3 cps/μl).

40

Añadir 5 μl de diluciones diana a las tiras, por triplicado. Añadir 5 μl de las diluciones diana comenzando por la de menos concentración hasta la de más concentración. Cerrar todos los tubos.

Reacción

La reacción sigue el esquema de método de la figura 4.

Programar el instrumento en tiempo real para una incubación a temperatura constante para obtener una temperatura de reacción constante de 65°C durante 1 hora. Programar el instrumento en tiempo real para obtener una lectura de fluorescencia por minuto.

5

Colocar las tiras en el instrumento inmediatamente antes del inicio de los programas. Iniciar el programa.

Análisis de datos

10 El cebador de bucle autoalineado fluorescente en reacción produce una señal fluorescente, una vez se excita por una emisión de luz de longitud de onda apropiada. Cuando la reacción de LAMP continúa, el cebador de bucle autoalineado fluorescente se incorpora en los productos de amplificación, alineándose por tanto a una secuencia de nucleótidos complementaria. El cebador de bucle autoalineado fluorescente está diseñado para ser complementario a una secuencia que contenga al menos un nucleótido de Guanina cercana a su extremo 5'. La base de Guanina puede
15 absorber la longitud de onda emitida por el fluoróforo (TAMRA en este caso), provocando una desactivación de señal fluorescente. En consecuencia, la reacción de LAMP se puede detectar por análisis de la variación de la fluorescencia en términos de desactivación de señal, para hallar el tiempo umbral relativo a cada muestra analizada. El tiempo umbral es el minuto en el que la señal de fluorescencia en la reacción alcanza un 50% de desactivación. El tiempo umbral alcanzado por cada muestra se correlaciona con su Log de copias de ADN/ μ l.

20

Resultados

Este enfoque consiste en una amplificación mutante selectiva basada en un diseño de cebador de bucle particular que da como resultado una hibridación selectiva de dicho cebador de bucle a la pesa formada a partir de la secuencia mutante (figura 4). Se diseñó un conjunto universal (insensible a mutante) de cebadores que comprende F3, B3, FIP y
25 BIP para obtener una pesa que presenta el nucleótido mutado teórico en la región de bucle comprendida entre B1 y B2. Se realizaron otros experimentos que presentaban el nucleótido mutado teórico en la región de bucle en B2 o comprendida entre B2 y B1c, sin diferencias relevantes. Se incluyó en el conjunto de cebadores un cebador de bucle particular que presentaba una región de secuencia de 8 bases en su extremo 5' complementaria a su propia secuencia en el extremo 3'.

30

Por consiguiente, este cebador de bucle especial forma una estructura de horquilla intramolecular en equilibrio con su forma abierta a la temperatura de reacción (65°C).

35 Cuando está presente la secuencia de JAK2 mutada, este cebador de bucle modificado rompe su estructura interna para alinearse a la diana, gracias al equilibrio termodinámico (T_m entre cebador y diana específica = 65°C). Por consiguiente, el cebador de bucle alineado a la diana mutada específica es extensible por la polimerasa: la amplificación puede avanzar.

40 Cuando está presente la secuencia wt en la muestra, el mismo cebador de bucle (específico para el gen JAK2 MUT) presenta una T_m con diana inespecífica (59°C) menor que la estructura de horquilla intramolecular (65°C). Esto da como resultado un autosequestro del cebador de bucle modificado que prefiere plegarse en la estructura de horquilla en lugar de formar un dúplex con la diana inespecífica, puesto que las fuerzas intramoleculares son mayores que las intermoleculares. Para limitar la competencia del cebador de bucle descrito previamente por las secuencias naturales
45 que probablemente están presentes en un gran exceso en la muestra clínica, se añadió otro cebador de bucle modificado caracterizado por una estructura similar a la descrita previamente, pero con una secuencia complementaria a la secuencia natural de JAK2 (con la base G en la posición 1489).

El extremo 3' de este cebador de bucle "competidor" no se hace extensible por una modificación (3'didesoxi). La tarea de este competidor es la de "silenciar" la wt y permitir que el cebador mutante específico encuentre esta diana.

50

55 Cuando el "competidor" reconoce la secuencia natural específica, rompe su estructura intramolecular para alinearse a la diana WT, gracias a una mayor afinidad (T_m de dúplex diana wt-cebador de bucle modificado wt = 67°C); El cebador de bucle alineado a la diana wt no es extensible, dando como resultado que no se produce la amplificación de las secuencias wt. Puesto que la reacción se lleva a cabo a temperatura constante, el cebador de bucle wt permanecerá alineado a las secuencias wt evitando un alineamiento inespecífico del cebador de bucle MUT.

55

De otra manera, el "competidor" presenta una T_m con su diana inespecífica (mutante) (62 °C) menor que la de la estructura de horquilla intramolecular que forma consigo mismo (65°C). Esto da como resultado un autosequestro del cebador de bucle modificado que prefiere plegarse en la estructura de horquilla en lugar de formar un dúplex con la diana inespecífica, puesto que las fuerzas intramoleculares son mayores que las intermoleculares.

60

Para seguir la reacción en un instrumento en tiempo real, se marcó el extremo 5' del cebador de bucle modificado mutante con un tinte FAM. Para evitar la unión del fluoróforo a la base de guanina presente en el extremo 5' del
65 cebador de bucle modificado, que tiene un efecto de desactivación, se añadió una base de Timina a la extremidad de la sonda. El cebador marcado modificado, cuando está presente en solución, emite una señal fluorescente si se excita

por una luz de longitud de onda apropiada. Cuando la reacción de LAMP se inicia y continúa, el cebador de bucle autoalineado fluorescente se incorpora en los productos de amplificación, alineándose por tanto a una secuencia de nucleótidos complementaria, que contiene varios residuos de Guanina. Las bases de Guanina pueden absorber la longitud de onda emitida por el fluoróforo, provocando una desactivación de señal fluorescente visible en tiempo real.

5 En consecuencia, la reacción de LAMP se puede monitorizar durante el análisis de la disminución de la señal de fluorescencia debido al "efecto de desactivación" determinado por la generación del producto de LAMP.

Referencias

- 10 1. Levine, R. L. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387-397 (2005).
2. James, C. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144-1148 (2005).
- 15 3. Baxter, E. J. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365, 1054-1061 (2005).
4. Kralovics, R. et al. A gain of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 352, 1779-1790 (2005).
5. Nelson ME, Steensma DP: JAK2 V617F in myeloid disorders: what do we know now, and where are we headed? *Leuk Lymphoma* 2006, 47:177-194
- 25 6. James C, Ugo V, Le Couedic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W: A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005, 434:1144-1148
7. De Keersmaecker K, Cools J: Chronic myeloproliferative disorders: a tyrosine kinase tale. *Leukemia* 2005, 20:200-205
- 30 8. Kaushansky K: On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood* 2005, 105:4187-4190
9. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR: Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet* 2005, 365:1054-1061
- 35 10. Smith TA, Whelan J, Parry PJ: Detection of single-base mutations in a mixed population of cells: a comparison of SSCP and direct sequencing. *Genet Anal Tech Appl* 1992,9:143-145
11. James C, Delhommeau F, Marzac C, Teyssandier I, Couedic JP, Giraudier S, Roy L, Saulnier P, Lacroix L, Maury S, Tulliez M, Vainchenker W, Ugo V, Casadevall N: Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia* 2006, 20:350-353
- 45 12. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF: Analysis of any point mutation in DNA: the amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989,17:2503-2516
- 50 13. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC: Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005,106:2162-2168
- 55 14. James C, Delhommeau F, Marzac C, Teyssandier I, Couedic JP, Giraudier S, Roy L, Saulnier P, Lacroix L, Maury S, Tulliez M, Vainchenker W, Ugo V, Casadevall N: Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia* 2006, 20:350-353
- 60 15. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR: Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet* 2005, 365:1054-1061
16. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM: Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2005,19:1847-1849
- 65 17. Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S, Beran M, Estey E, Kantarjian HM, Issa

JP: JAK2 mutation 1849G_T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocyte leukemia. Blood 2005,106:3370-3373

5 18. Jones AV: Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. Blood 2005,106: 2162-2168.

19. Steensma D: JAK2 V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility. Journal of Molecular Diagnostics 2006, 8:397-411.

10 20. Iwasaki M. et al. Genome Letters 2003, 2:119-126.

21. Fukuta S. et al. J Appl Genet 2006, 47:303-308.

15 22. Ikeda S. et al. Pathol. Intern. 2007, 57: 594-599.

Listado de secuencias

<110> DIASORIN SpA

20 <120> MÉTODO ISOTÉRMICO RÁPIDO ALTAMENTE SENSIBLE PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES Y SNP

<130> BE106814

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> oligonucleótido sintético

<400> 1

gcacctttat tatggcagag ag

22

<210> 2

35 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

40 <400> 2

tgctctgaga aaggcatta

19

<210> 3

45 <211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

50 <400> 3

gctgcttcaa agaaagacta aggaaatgga caacagtcaa acaac

45

<210> 4

55 <211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

60 <400> 4

gctttctcac aagcatttgg tttaaatta gcctgtagtt ttacttactic tc

52

<210> 5

65 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

ES 2 386 514 T3

	<400> 5 gtcaaacaac aattcttgt act	23
5	<210> 6 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido sintético	
10	<400> 6 agctgtgatc ctgaaactg	19
15	<210> 7 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido sintético	
20	<400> 7 aatatactcc ataatttaa accaaatgct ttcttcttt gaagcagcaa gt	52
25	<210> 8 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido sintético	
30	<400> 8 tttgtggag acgagagtaa gtaaaactac ataaacaaaa acagatgctc tga	53
35	<210> 9 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido sintético	
40	<400> 9 gtgagaaagc ttgctcatca t	21
45	<210> 10 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido sintético	
50	<400> 10 aggcttcta atgccttc	19
55	<210> 11 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido sintético	
60	<400> 11 tctatagtca tgctgaaagt aggag	25
65	<210> 12 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido sintético	
65	<400> 12 aaggcattag aaagcctgta gt	22

ES 2 386 514 T3

5	<210> 13 <211> 55 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido sintético <400> 13 acaaagaatt gttgttgac tgggtccat tgcacttta ttatggcaga gagaa	55
10	<210> 14 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
15	<223> oligonucleótido sintético <400> 14 agtcttctt tgaagcagca agtatgatgt tactactct cgtctccaca ga	52
20	<210> 15 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
25	<223> oligonucleótido sintético <400> 15 agcattggg tttaaattat ggagtaggt	30
30	<210> 16 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
35	<223> oligonucleótido sintético <400> 16 gcatctttat tatggcagag ag	22
40	<210> 17 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
45	<223> oligonucleótido sintético <400> 17 tgctctgaga aaggcata	19
50	<210> 18 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
55	<223> oligonucleótido sintético <400> 18 gctgctcaa agaaagacta aggaaatgga caacagtcaa acaac	45
60	<210> 19 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
65	<223> oligonucleótido sintético <400> 19 gcttctcac aagcattgg tttaaatta gcctgtagtt ttacttactic tc	52
65	<210> 20 <211> 30 <212> ADN	

ES 2 386 514 T3

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> oligonucleótido sintético
<220>
5 <221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> didesoxi-citosina no extensible
<400> 20
gtctccactg gagtatgtgt ctgtggagac 30
10
<210> 21
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
15 <220>
<223> oligonucleótido sintético
<400> 21
gtctccactg gagtatgttt ctgtggagac 30
20 <210> 22
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <223> oligonucleótido sintético
<400> 22
gtctccactg gagtatgttt ctgtggagac 30

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar la presencia de una mutación puntual de una molécula de ácido nucleico diana en un antecedente de moléculas naturales de ácido nucleico, que comprende las etapas de:
- 5 a. obtener una muestra de ácido nucleico;
- b. poner en contacto dicha muestra de ácido nucleico, en condiciones de reacción apropiadas, con una solución que comprende una mezcla de oligonucleótidos y una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena bajo condiciones de hibridación, en el que dicha mezcla de oligonucleótidos consiste en cebadores adecuados para una amplificación isotérmica mediada por bucle de la región de la molécula de ácido nucleico incluyendo teóricamente la mutación puntual, comprendiendo dichos cebadores:
- 10 i) dos cebadores externos F3 y B3;
- 15 ii) dos cebadores internos FIP y BIP, en el que FIP incluye dos secuencias de oligonucleótidos F2 y F1c, y BIP incluye dos secuencias de oligonucleótidos, B2 y B1c, en el que dichos cebadores internos FIP y BIP pueden reconocer e hibridarse a dos regiones diferentes y opuestas, F2c y B2c respectivamente, de la molécula de ácido nucleico diana, en el que el cebador BIP está diseñado para hibridarse corriente abajo de la mutación puntual, o bien el cebador FIP está diseñado para hibridarse corriente arriba de la mutación puntual, y en el caso de que el cebador BIP esté diseñado para hibridarse corriente abajo de la mutación puntual, entonces el cebador FIP está diseñado para hibridarse a la secuencia diana de modo que la mutación puntual se sitúe en o corriente abajo de la secuencia de F2c y corriente arriba de F1c, o en el caso de que el cebador FIP esté diseñado para hibridarse corriente arriba de la mutación puntual, entonces el cebador BIP está diseñado para hibridarse a la secuencia diana de modo que la mutación puntual se sitúe en o corriente arriba de la secuencia de B2c y corriente abajo de B1c;
- 20 iii) un cebador extensible autoalineado LB o LF respectivamente, que comprende:
- 30 - una secuencia de bucle central que puede reconocer selectivamente e hibridarse a la región que comprende la mutación puntual teórica de la molécula de ácido nucleico sólo si está presente la mutación puntual,
- una secuencia de extremo 5', y
- 35 - una secuencia de extremo 3', siendo dichas secuencias de extremo 5' y de extremo 3' complementarias entre sí para formar un tallo, de modo que dicha secuencia de bucle central tenga una afinidad de hibridación mayor para la región que comprende la mutación puntual teórica de la molécula de ácido nucleico que la afinidad de hibridación de la secuencia de extremo 5' con respecto a la secuencia de extremo 3', de modo que de como resultado un alineamiento y amplificación de la región que comprende la mutación puntual teórica de la molécula de ácido nucleico;
- 40 iv) un resto no extensible para reconocer e hibridarse selectivamente a la secuencia WT (natural) de la molécula de ácido nucleico;
- c. incubar la mezcla resultante a una temperatura constante;
- 45 d. detectar una señal indicativa de amplificación de la molécula de nucleótido que comprende la mutación puntual.
2. El método de la reivindicación 1 en el que la mutación puntual está situada en la región entre F2 y F1c o B2 y B1c.
3. El método de la reivindicación 1 en el que la mutación puntual está situada en la región detectada por B2 o F2.
- 50 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia en el extremo 5' y la secuencia en el extremo 3' de dicho cebador extensible autoalineado es de al menos 3 nucleótidos.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el resto no extensible es un ácido nucleico peptídico (ANP).
- 55 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho ácido nucleico peptídico (ANP) tiene al menos 10 nucleótidos.
- 60 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho ácido nucleico peptídico (ANP) comprende una secuencia de bases que se pueden hibridar con la región que incluye la mutación puntual teórica dando como resultado estructuras bicatenarias que tienen respectivamente una temperatura de fusión (Tm) = X con la secuencia natural y una temperatura de fusión (Tm) = Y con la secuencia mutante, donde Y < temperatura de incubación ≤ X y X es al menos 5°C mayor que Y.
- 65 8. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en el que el resto no extensible es un cebador no extensible

- autoalineable, que comprende una secuencia de bucle central que puede reconocer selectivamente e hibridarse a la región que comprende la secuencia natural de la molécula de ácido nucleico, una secuencia de extremo 5' y una secuencia de extremo 3', siendo dichas secuencias de extremo 5' y de extremo 3' complementarias entre sí para formar un tallo, de modo que dicha secuencia de bucle central tenga una afinidad de hibridación mayor para la región que comprende la secuencia natural de la molécula de ácido nucleico que la afinidad de hibridación de la secuencia de extremo 5' con respecto a la secuencia de extremo 3', de modo que de como resultado un alineamiento y bloqueo de la secuencia wt;
- 5
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena es la polimerasa de fragmento grande Bst.
- 10
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 8, en el que dicha ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena es una o una combinación de: fragmento Bca (exo-), Vent, Vent (exo-), Deep Vent, Deep Vent (exo-), fago Φ29, fago MS-2, Z-Taq, KOD, Klenow.
- 15
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la temperatura constante está comprendida entre 62 y 67 °C.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la señal indicativa de amplificación de la molécula de nucleótido que comprende la mutación puntual se detecta por turbidimetría.
- 20
13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 11, en el que la señal indicativa de amplificación de la molécula de nucleótido que comprende la mutación puntual se detecta por fluorescencia.
- 25
14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula de ácido nucleico comprende la región del gen JAK2 humano (n.º de acceso al GenBank NM_004972 ilustrado en la figura 11a,b,c), que tiene teóricamente la mutación puntual, sustitución de guanina-a-timidina en la base 1849 (G1849T).
- 30
15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que F2 y F1c están en la posición 1730-1750 y 1770-1795 respectivamente de la secuencia génica NM_004972; B2 está en la posición 1862-1884 de la secuencia génica NM_004972 y B1c está en la posición 1810-1840 de la secuencia génica NM_004972 ilustrada en la figura 11a,b,c.
16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que los cebadores tienen las siguientes secuencias:
- 35
- F3 5'-GCATCTTTATTATGGCAGAGAG- 3' (Seq Id No. 1); B3 5'-TGCTCTGAGAAAGGCATTA- 3' (Seq Id No. 2);
- FIP 5'-GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC-3' (Seq Id No. 3);
- 40
- BIP S'-GCTTTCTCACMGCATTTGGTTTTAMTTAGCCTGTAGTTTTACTTACTCTC-S' (Seq Id No. 4).
17. El método de acuerdo con las reivindicaciones 15 ó 16, en el que dicho resto no extensible es una molécula de ANP.
- 45
18. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicha molécula de ANP tiene la estructura:
- ^{NH₂}GAGTATGTGTCTGTGGA^{CONH₂}.

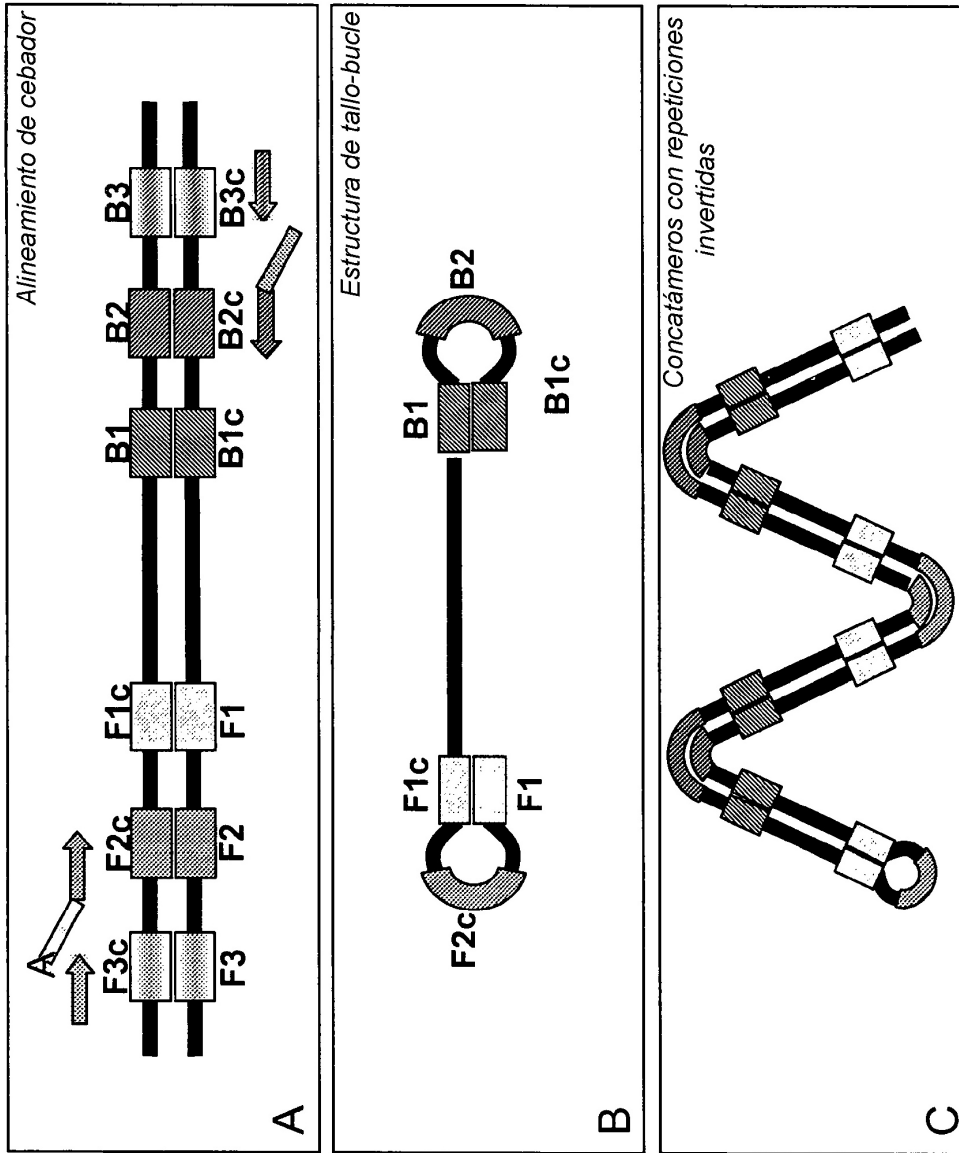


Figura 1

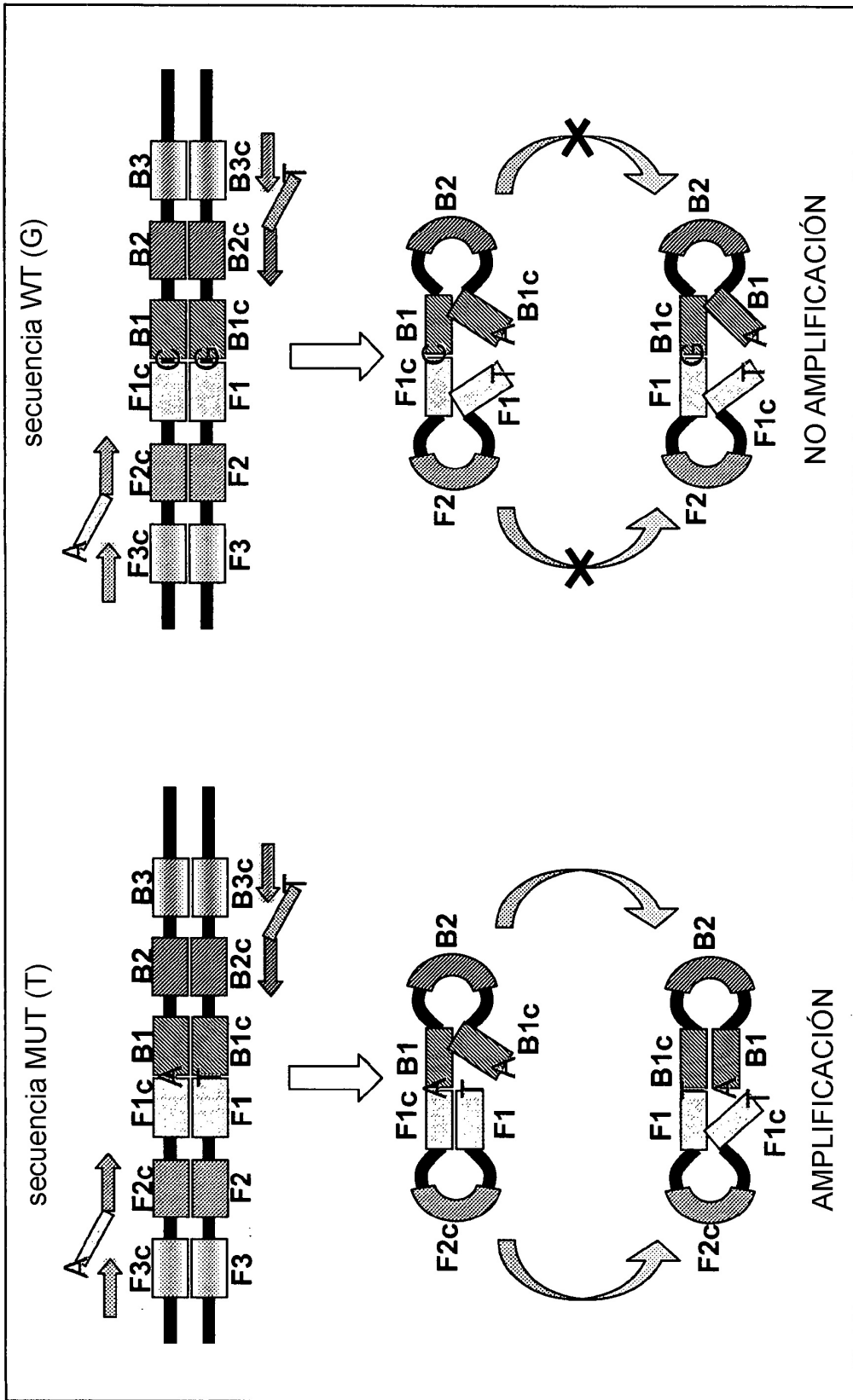


Figura 2

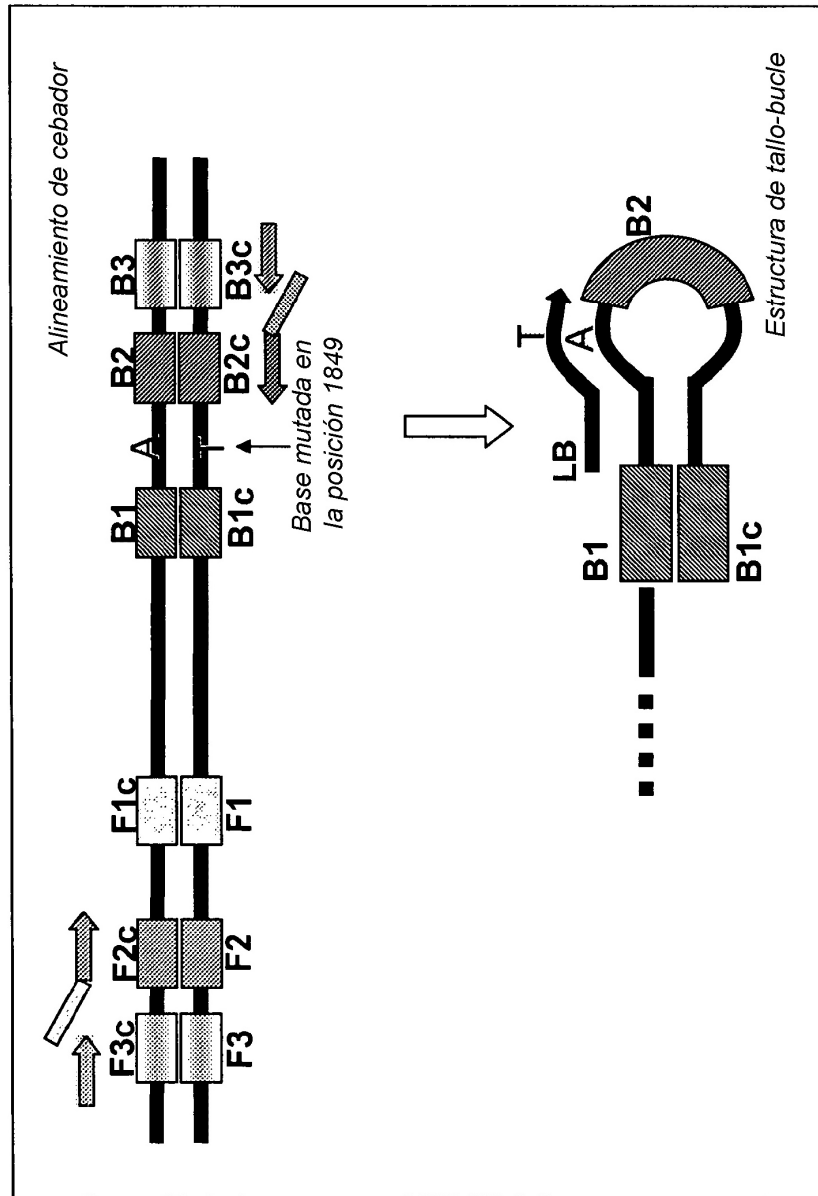


Figura 3

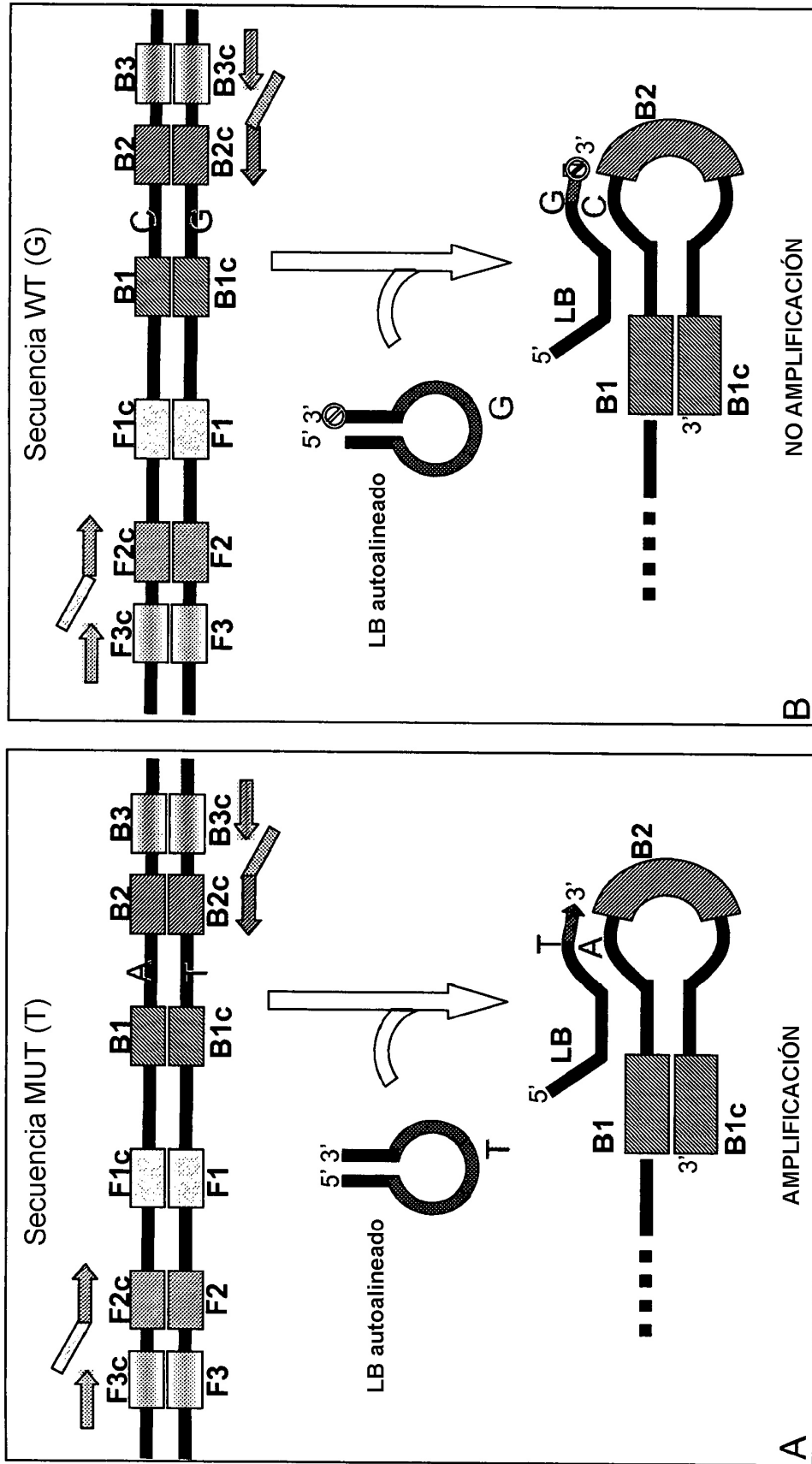


Figura 4

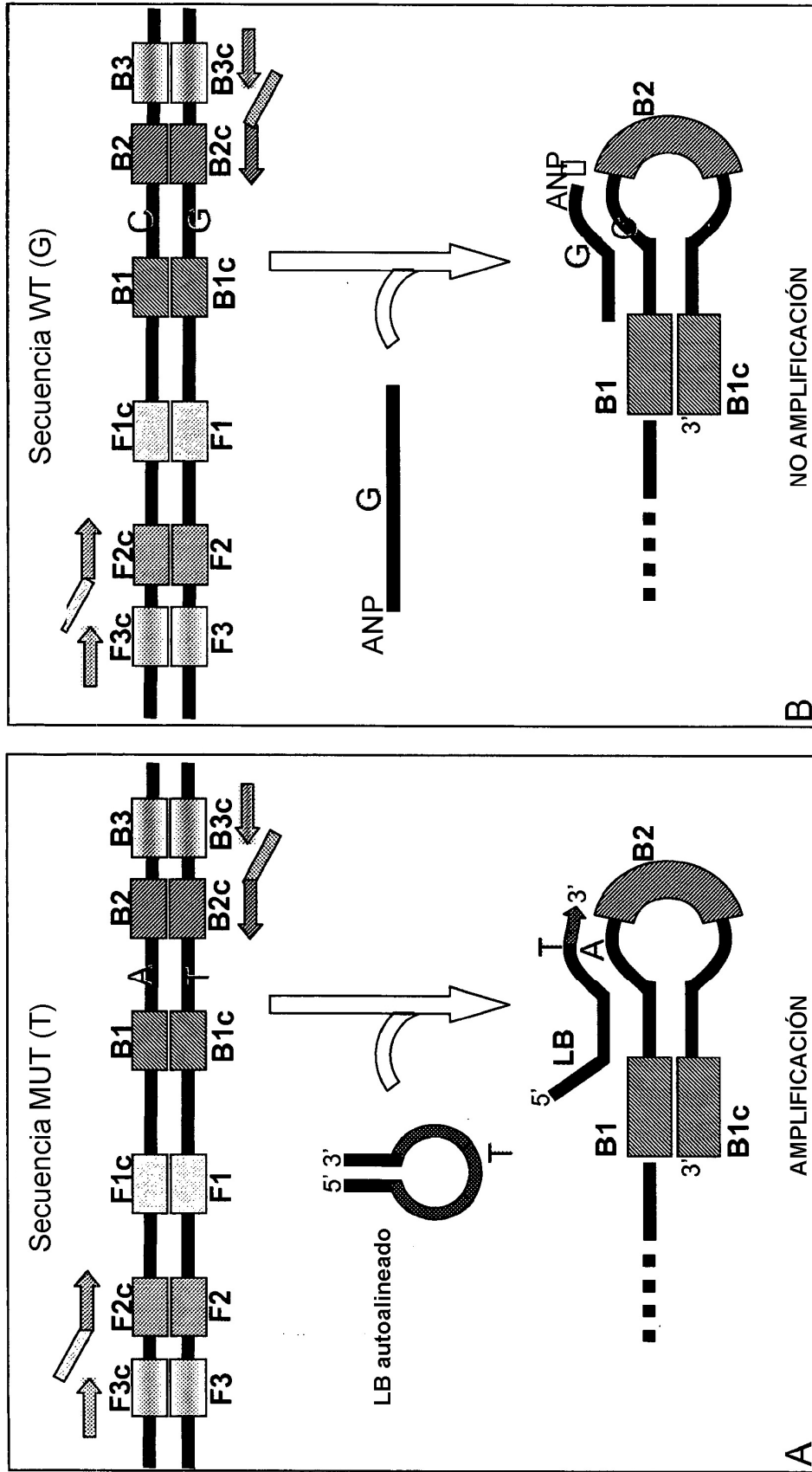


Figura 5

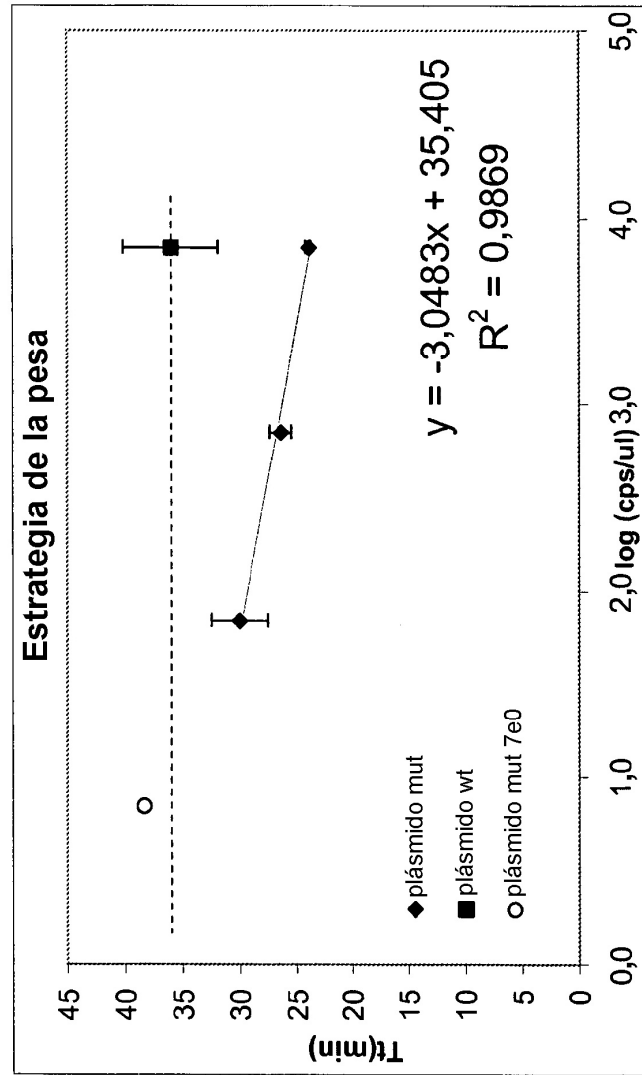


Figura 6

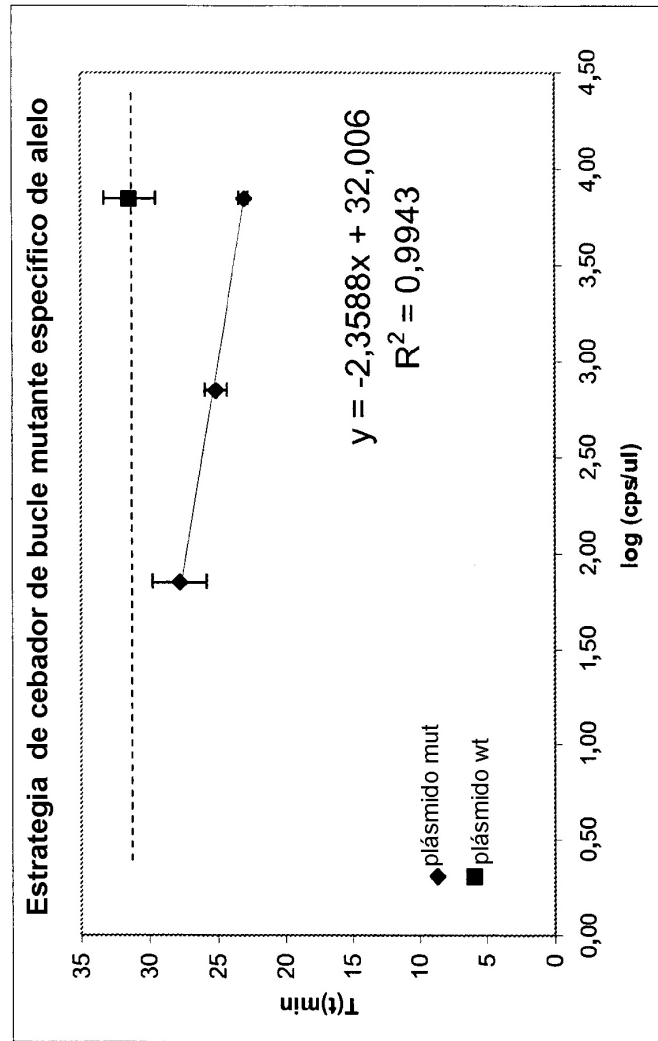


Figura 7

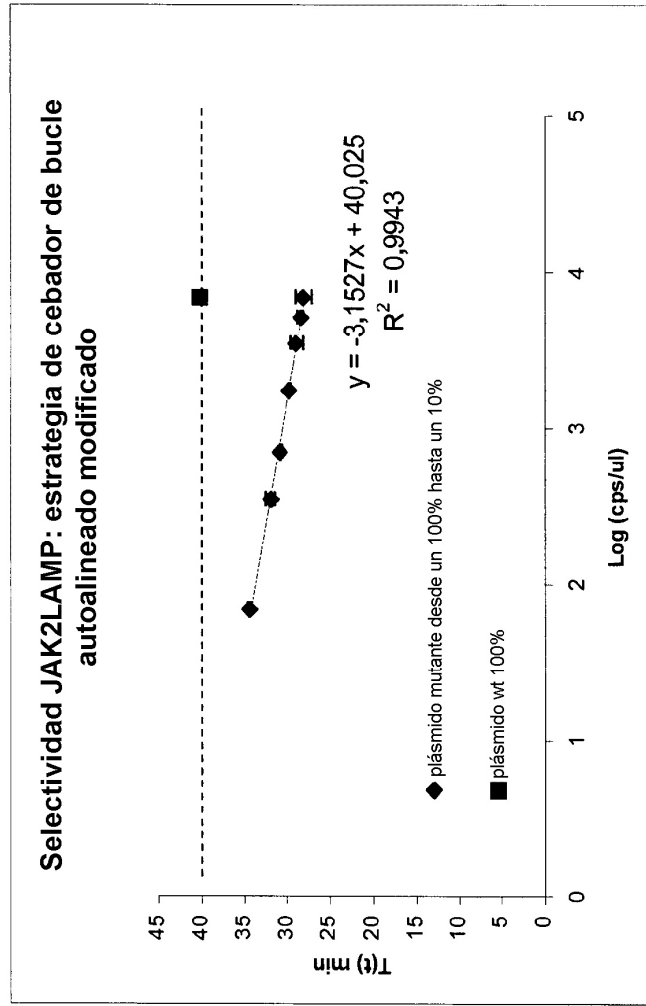


Figura 8

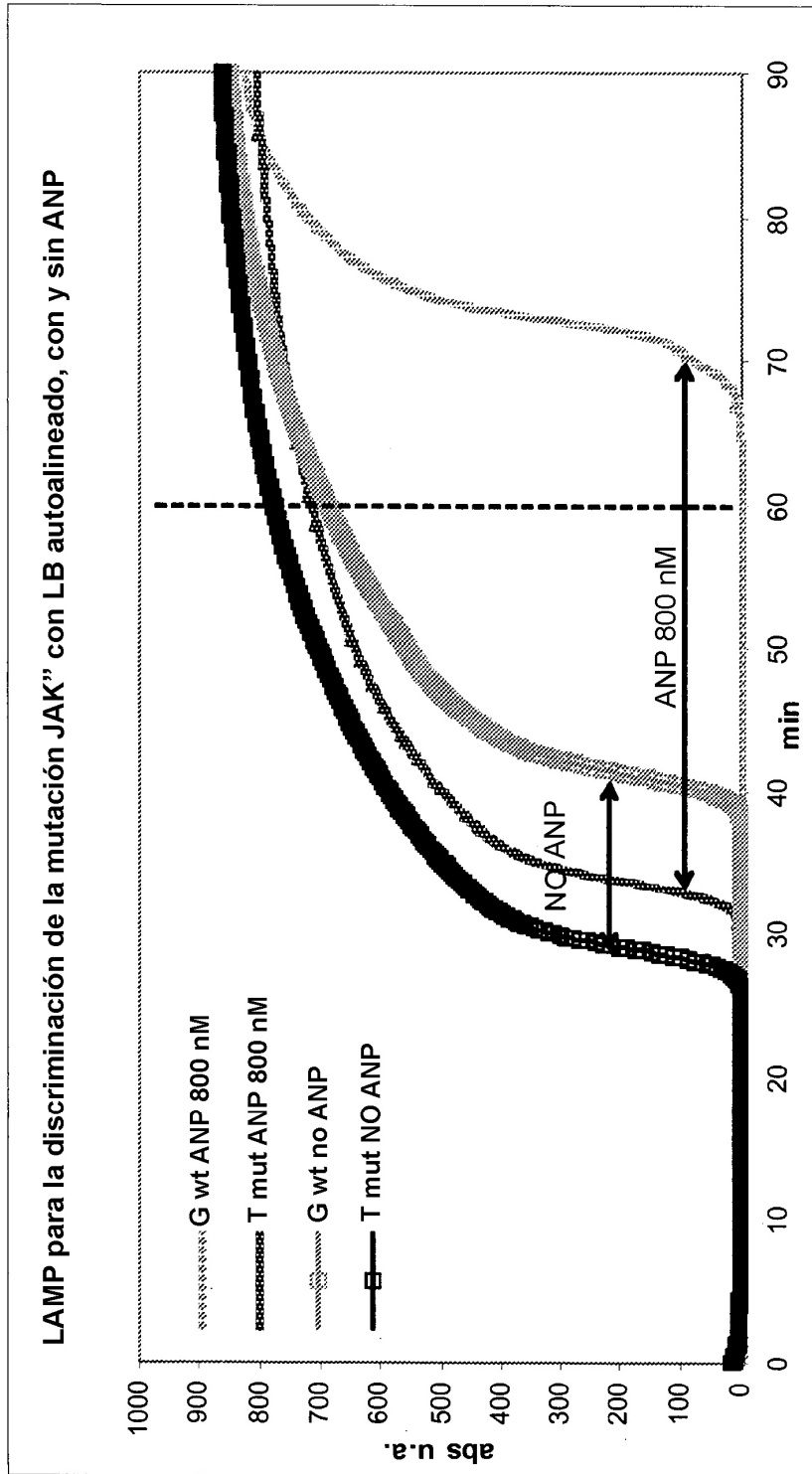


Figura 9

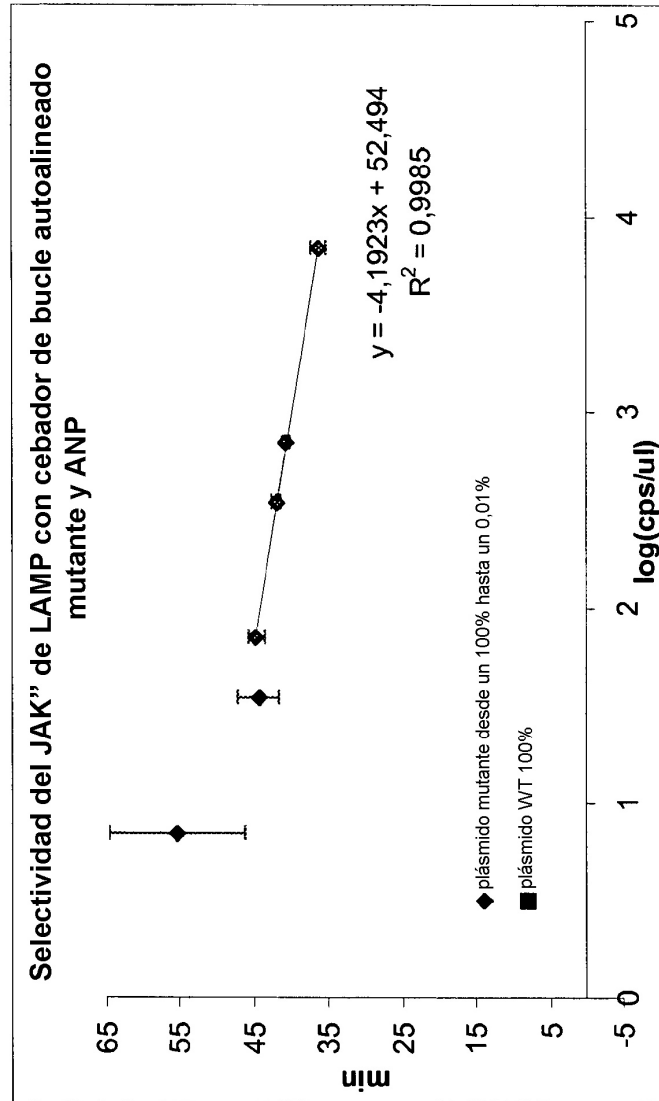


Figura 10

ctgcaggaag gagagaggaa gaggagcaga agggggcagc agcggacgcc gctaacggcc	60
tccctcggcg ctgacaggct gggccggcgc ccggctcgcg tgggtgttcg cgtcgccact	120
tcggcttctc ggccggtcgg gccctcggc ccgggcttgc ggcgcgcgtc ggggctgagg	180
gctgctgcgg cgcagggaga ggcctggtcc tcgctgccga gggatgtgag tgggagctga	240
gcccacactg gagggcccc gagggcccag cctggaggtc gttcagagcc gtgcccgtcc	300
cggggcttcg cagacctga cccgccgggt aggagccgcc cctgcccggct cgagggcgcg	360
ctctggtcgc ccgatctgtg tagccggttt cagaagcagg caacaggaac aagatgtgaa	420
ctgtttctct tctgcagaaa aagaggctct tcctcctctt cccgcgacgg caaatgttct	480
gaaaaagact ctgcatggga atggcctgcc ttacgatgac agaaatggag ggaacatcca	540
cctcttctat atatcagaat ggtgatattt ctggaaatgc caattctatg aagcaaatag	600
atccagttct tcagggtgat ctttaccatt cccttgggaa atctgaggca gattatctga	660
cctttccatc tggggagtat gttgcagaag aaatctgtat tgctgcttct aaagcttgtg	720
gtatcacacc tgtgtatcat aatatgtttg ctttaatgag tgaaacagaa aggatctggt	780
atccaccaa ccatgtcttc catatagatg agtcaaccag gcataatgta ctctacagaa	840
taagatttta ctttctcgt tggattgca gtggcagcaa cagagcctat cggcatggaa	900
tatctcgagg tgctgaagct cctcttcttg atgactttgt catgtcttac ctctttgctc	960
agtggcggca tgattttgtg cacggatgga taaaagtacc tgtgactcat gaaacacagg	1020
aagaatgtct tgggatggca gtgttagata tgatgagaat agccaaagaa aacgatcaaa	1080
ccccactggc catctataac tctatcagct acaagacatt cttacaaaa tgtattcgag	1140
caaagatcca agactatcat attttgacaa ggaagcgaat aaggtagaga tttcgcagat	1200
ttattcagca attcagcaa tgcaaagcca ctgccagaaa cttgaaactt aagtatctta	1260
taaatctgga aactctgcag tctgccttct acacagagaa atttgaagta aaagaacctg	1320
gaagtgtcc ttcagggtgag gagatTTTTG caaccattat aataactgga aacggtggaa	1380
ttcagtggtc aagagggaaa cataaagaaa gtgagacact gacagaacag gatttacagt	1440
tatattgcca ttttccaat attattgatg tcagtattaa gcaagcaaac caagagggtt	1500
caaatgaaag ccgagttgta actatccata agcaagatgg taaaaatctg gaaattgaac	1560
ttagctcatt aagggagct ttgtcttctg tgcattaat tgatggatat tatagattaa	1620
ctgcagatgc acatcattac ctctgtaaag aagtagcacc tccagccgtg cttgaaaata	1680

Figura 11a

ES 2 386 514 T3

tacaaagcaa	ctgcatggc	ccaatttcga	tggattttgc	cattagtaaa	ctgaagaaa	1740
caggtaatca	gactggactg	tatgtacttc	gatgcagtcc	taaggacttt	aataaatatt	1800
ttttgacttt	tgctgtcgag	cgagaaaatg	tcattgaata	taaacactgt	ttgattacaa	1860
aaaatgagaa	tgaagagtac	aacctcagtg	ggacaaaagaa	gaacttcagc	agtcttaaag	1920
atcttttgaa	ttgttaccag	atggaaactg	ttcgtcaga	caatataatt	ttccagttta	1980
ctaaatgctg	tccccaag	ccaaaagata	aatcaaact	tctagtcttc	agaacgaatg	2040
gtgtttctga	tgtaccaacc	tcaccaacat	tacagaggcc	tactcatatg	aaccaaagtg	2100
tgtttcacaa	aatcagaaat	gaagatttga	tatttaatga	aagccttggc	caaggcactt	2160
ttacaaagat	tttaaaggc	gtacgaagag	aagtaggaga	ctacgggcaa	ctgcatgaaa	2220
cagaagtctt	tttaaagtt	ctggataaag	cacacagaaa	ctattcagag	tctttctttg	2280
aagcagcaag	tatgatgagc	aagctttctc	acaagcattt	ggttttaaat	tatggagtat	2340
gtgtctgtgg	agacgagaat	attctggttc	aggagtttgt	aaaatttggg	tcactagata	2400
catatctgaa	aaagaataaa	aattgtataa	atatattatg	gaaacttgaa	gttgctaaac	2460
agttggcatg	ggccatgcat	tttctagaag	aaaacacct	tattcatggg	aatgtatgtg	2520
ccaaaaatat	tctgcttctc	agagaagaag	acaggaagac	aggaaatcct	cctttcatca	2580
aacttagtga	tcctggcatt	agtattacag	ttttgccaaa	ggacattctt	caggagagaa	2640
taccatgggt	accacctgaa	tgcatgaaa	atcctaaaa	tttaaatttg	gcaacagaca	2700
aatggagttt	tggtaacct	ttgtgggaaa	tctgcagtgg	aggagataaa	cctctaagtg	2760
ctctggattc	tcaaagaaa	ctacaatttt	atgaagatag	gcatcagctt	cctgcaccaa	2820
agtgggcaga	attagcaaac	cttataaata	attgtatgga	ttatgaacca	gatttcaggc	2880
cttctttcag	agccatcata	cgagatctta	acagtttgtt	tactccagat	tatgaactat	2940
taacagaaaa	tgacatgtta	ccaaatatga	ggataggtgc	cctggggttt	tctggtgcct	3000
ttgaagaccg	ggatcctaca	cagtttgaag	agagacattt	gaaatttcta	cagcaacttg	3060
gcaagggtaa	ttttgggagt	gtggagatgt	gccggtatga	ccctctacag	gacaacactg	3120
gggaggtggt	cgctgtaaaa	aagcttcagc	atagtactga	agagcaccta	agagactttg	3180
aaagggaaat	tgaatcctg	aatccctac	agcatgacaa	cattgtaaag	tacaagggag	3240
tgtgctacag	tgctggctcg	cgtaatctaa	aattaattat	ggaatattta	ccatattgaa	3300
gtttacgaga	ctatcttcaa	aaacataaag	aacggataga	tcacataaaa	cttctgcagt	3360
acacatctca	gatatgcaag	ggtatggagt	atcttggtag	aaaaaggtag	atccacaggg	3420
atctggcaac	gagaaatata	ttggtggaga	acgagaacag	agttaaaatt	ggagattttg	3480
ggttaaccaa	agtcttgcca	caagacaaag	aatactataa	agtaaaagaa	cctggtgaaa	3540
gtcccatatt	ctggtatgct	ccagaatcac	tgacagagag	caagttttct	gtggcctcag	3600
atgtttggag	ctttggagtg	gttctgtatg	aacttttcac	atacattgag	aagagtaaaa	3660
gtccaccagc	ggaatttatg	cgtatgattg	gcaatgacaa	acaaggacag	atgatcgtgt	3720
tccatttgat	agaacttttg	aagaataatg	gaagattacc	aagaccagat	ggatgcccag	3780

Figura 11b

atgagatcta	tatgatcatg	acagaatgct	ggaacaataa	tgtaaatcaa	cgccccctct	3840
ttagggatct	agctcttcga	gtggatcaaa	taagggataa	catggctgga	tgaaagaaat	3900
gaccttcatt	ctgagaccaa	agtagattta	cagaacaaag	ttttatattt	cacattgctg	3960
tggactatta	ttacatatat	cattattata	taaatscatga	tgctagccag	caaagatgtg	4020
aaaatatctg	ctcaaaactt	tcaaagttta	gtaagttttt	cttcatgagg	ccaccagtaa	4080
aagacattaa	tgagaattcc	ttagcaagga	ttttgtaaga	agtttcttaa	acattgtcag	4140
ttaacatcac	tcttgtctgg	caaaagaaaa	aaaatagact	ttttcaactc	agctttttga	4200
gacctgaaaa	aattattatg	taaattttgc	aatgttaaag	atgcacagaa	tatgtatgta	4260
tagtttttac	cacagtggat	gtataatacc	ttggcatcct	gtgtgatgtt	ttacacacat	4320
gagggtctgt	gttcattaat	actgttttct	aatttttcca	tagttaatct	ataattaatt	4380
acttcactat	acaaacaaat	taagatgttc	agataattga	ataagtacct	ttgtgtcctt	4440
gttcatttat	atcgctggcc	agcattataa	gcagggtgat	acttttagct	tgtagttcca	4500
tgtactgtaa	atatttttca	cataaagggg	acaaatgtct	agttttattt	gtataggaaa	4560
tttcctgac	cctaaataat	acattttgaa	atgaaacaag	cttacaaga	tataatctat	4620
tttattatgg	tttccttgt	atctatttgt	ggtgaatgtg	ttttttaaat	ggaactatct	4680
ccaaattttt	ctaagactac	tatgaacagt	tttcttttaa	aattttgaga	ttaagaatgc	4740
caggaatatt	gtcatccttt	gagctgctga	ctgccaataa	cattcttcga	tctctgggat	4800
ttatgctcat	gaactaaatt	taagcttaag	ccataaaata	gattagattg	tttttataaa	4860
atggatagct	cattaagaag	tgacagcagg	taagaatttt	ttcctaaaga	ctgtatattt	4920
gaggggtttc	agaattttgc	attgcagtca	tagaagagat	ttatttcctt	tttagagggg	4980
aaatgaggta	aataagtaaa	aaagtatgct	tgtaattttt	attcaagaat	gccagtagaa	5040
aattcataac	gtgtatcttt	aagaaaaatg	agcatacatc	ttaaactctt	tcaattaagt	5100
ataaggggtt	gttcgttggt	gtcatttggt	atagtgctac	tccactttag	acacatagc	5160
taaaataaaa	tatggtgggt	tttgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	5220
tgttatttat	acaaaactta	aaatacttgc	tgttttgatt	aaaaagaaaa	tagtttctta	5280
cttta						5285

Figura 11c