

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 553**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2006** **E 06788713 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013** **EP 1907588**

54 Título: **Análisis de resistencia a fármacos de tipo equinocandinas**

30 Prioridad:

26.07.2005 US 702756 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2013

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY
OF NEW JERSEY (50.0%)
65 Bergen Street
Newark NJ 07107-3001, US y
MERCK SHARP & DOHME CORP. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PERLIN, DAVID S.;
PARK, STEVEN;
DOUGLAS, CAMERON M.;
KAHN, JENNIFER NIELSEN;
PARENT, STEPHEN A. y
KELLY, ROSEMARIE**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 430 553 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

Análisis de resistencia a fármacos de tipo equinocandinas

5 [0001] La presente invención describe ensayos de ácido nucleico en hongos.

10 [0002] Las infecciones fúngicas son una causa significativa de morbilidad y mortalidad en numerosos pacientes enfermos; y su impacto resulta exacerbado debido a la falta de diagnóstico rápido y de tratamiento efectivo de estas infecciones. El uso generalizado de agentes antifúngicos ha sido el resultado de la selección de especies naturalmente resistentes a los hongos, así como de la aparición de resistencia en especies susceptibles. El tratamiento de las enfermedades fúngicas se ve obstaculizado por la escasa disponibilidad de fármacos antifúngicos. Recientemente se ha presentado Caspofungin como el primer fármaco de una nueva clase de equinocandinas que se dirige a la pared celular fúngica inhibiendo la síntesis de β - (1 $\rightarrow$ 3) - D - glucano. La utilización de Caspofungin se está expandiendo rápidamente, y se están presentando aislados clínicos de especies de *Candida* con susceptibilidad *in vitro* reducida que muestran una correlación muy alta entre la falta de tratamiento y los altos niveles de concentración inhibitoria mínima *in vitro*, o CMI. Puesto que la exposición del paciente a Caspofungin aumenta y que las demás equinocandinas, incluyendo Micafungin y Anidulafungin, se encuentran comercialmente disponibles, se prevé un aumento del número de aislados clínicos con valores elevados de CMI.

20 [0003] Un aspecto de la presente invención son los ensayos de ácido nucleico que detectan las mutaciones genéticas asociadas a hongos resistentes a las equinocandinas, incluyendo de manera no limitante los hongos del género *Candida*.

25 [0004] Otro aspecto de la presente invención son dicho ensayos de ácido nucleico que emplean la amplificación de ácido nucleico exponencial de regiones específicas que codifican la proteína FKS1, preferiblemente acoplados por secuenciación o detección utilizando sondas marcadas discriminantes de alelos.

30 [0005] Otro aspecto de la presente invención son los kits de reactivos y los conjuntos de oligonucleótidos de cebadores y sondas para llevar a cabo los ensayos anteriores.

35 [0006] Se han realizado trabajos previos que consideran aspectos de las regiones específicas que codifican FKS1, como THOMPSON ET AL., "A Glucan Synthase FKS1 Homolog in *Cryptococcus neoformans* Is Single Copy and Encodes an Essential Function" [J. OF BACTERIOLOGY vol. 181, nº 2, Enero 1999, página 452], y la patente EP931834; sin embargo, ninguno ha presentado un ensayo efectivo sobre la resistencia a los fármacos de tipo equinocandinas como se propone en este documento.

RESUMEN DE LA INVENCION

40 [0007] Según la presente invención, se presenta un ensayo de ácidos nucleicos para determinar la resistencia a fármacos de tipo equinocandinas en hongos susceptibles a fármacos de tipo equinocandinas y que contienen el gen *FKS1* correspondiente a la subunidad de Fks1p 1 - 3 β - D - glucano sintetasa que comprende la amplificación de una primera secuencia diana de ácido nucleico del gen *FKS1* correspondiente a los aminoácidos 636 a 654 de CaFks1p o a cualquier área de esa secuencia que incluya los aminoácidos 641 a 649 para generar una primera secuencia diana amplificada, poniendo en contacto la primera secuencia diana amplificada con sondas de hibridación específica marcadas para las mutaciones aminoácidas S645P, S645Y y S645F de CaFks1p; y para detectar la presencia de cualquiera de estas mutaciones en dicha primera secuencia diana amplificada.

50 [0008] Según la presente invención, también se presenta un conjunto de oligonucleótidos que incluye un primer par de cebadores hacia adelante e inversos que amplifican una primera secuencia diana del gen *FKS1* correspondiente a la subunidad de Fks1p 1 - 3 β - D - glucano sintetasa, correspondiente a su vez a, al menos, parte de la secuencia que incluye los aminoácidos 641 a 649, y sondas marcadas de hibridación discriminantes de alelos que se hibridan selectivamente a las mutaciones T1933C, C1934A y C1934T.

55 [0009] Las equinocandinas son los primeros y más importantes fármacos antifúngicos en estar disponibles comercialmente en décadas. El mantenimiento de la integridad de la pared celular fúngica es esencial, ya que un hongo no puede sobrevivir sin esta estructura, o incluso si esta se encuentra notablemente alterada de alguna manera. La pared es una matriz extracelular de estructura en capas consistente en una capa externa de glicoproteínas y una capa interna de polímeros de hidratos de carbono que incluyen glucano, quitina y galactomanano. En los hongos saprófitos y patógenos, la capa de carbohidratos se compone en su mayoría de β (1 $\rightarrow$ 3) - glucano y α (1 $\rightarrow$ 3) - glucano, pero también contiene algunos β (1 $\rightarrow$ 6) - glucanos y quitina. Los glucanos también se liberan a la sangre a través de la pared celular fúngica como exopolímeros en pacientes con infecciones fúngicas, y se sabe que activan un amplio rango de respuestas autoinmunes innatas. La pared celular fúngica es una estructura dinámica, puesto que los polímeros que la constituyen son químicamente modificados constantemente y se reorganizan durante la biosíntesis de la pared celular. Por ejemplo, es bien conocido que Fks1p, la presunta subunidad catalítica del complejo glucano sintetasa responsable de la formación de β (1 - 3) - glucano, se localiza en acúmulos de actina cortical. Se mueve sobre la superficie de la célula a las zonas de

remodelación de la pared celular, y las células con Fks1p inmovilizada muestran la estructura y la función defectuosas de la pared celular. Fks1p es el producto del gen *FKS1*. Las equinocandinas son hexapéptidos cíclicos N - acilados con cadena de ácidos grasos e inhiben la β (1 $\rightarrow$ 3) - D - glucano sintetasa, responsable de la biosíntesis del biopolímero principal de la pared celular. Los fármacos de tipo equinocandinas, caspofungin, micafungin y anidulafungin son los primeros de una nueva clase de componentes antifúngicos que se dirigen a la pared celular fúngica inhibiendo la β (1 - 3) - glucano sintetasa. La seguridad y la tolerabilidad de caspofungin, el primer fármaco aprobado, en el tratamiento de infecciones fúngicas se ha analizado en ciertos estudios recientes, sin que la mayoría de los pacientes sufrieran efectos adversos clínicos o de laboratorio graves.

[0010] Estos fármacos tienen un amplio espectro de actividad antifúngica contra las especies de *Candida* y *Aspergillus* sin resistencia cruzada a agentes antifúngicos existentes y, por lo tanto, son efectivos contra las levaduras y los mohos resistentes a los azoles. Más importante es que, debido a su influencia crítica en la pared celular, las equinocandinas actúan como fungicidas contra las levaduras. Son activas contra los mohos, pero solo parecen inhibir las puntas de crecimiento de las hifas. Sin embargo, son menos activas contra las especies invasivas de *Zygomycetes*, *Cryptococcus neoformans* o *Fusarium*. No obstante, son altamente efectivas clínicamente contra las especies de *Aspergillus*. Caspofungin ha sido aprobado en E.E.U.U. y otros países para el tratamiento de numerosas infecciones fúngicas graves, incluyendo la aspergillosis invasiva en pacientes refractarios o intolerantes a otras terapias, candidiasis esofágica, candidemia y otras infecciones por *Candida* (incluyendo abscesos intraabdominales, peritonitis e infecciones en el espacio pleural). Caspofungin también está indicado en terapias empíricas de posibles infecciones fúngicas en pacientes con fiebre persistente y neutropenia. En la actualidad, caspofungin se utiliza frecuentemente junto a triazoles, como el voriconazol, en terapias antifúngicas primarias contra levaduras y mohos. La aparición de fármacos similares a micafungin y anidulafungin ampliará el alcance de esta nueva clase de fármacos altamente eficaces en la comunidad clínica.

[0011] Desde que la primera equinocandina aprobada entrara en el mercado en 2002, el uso de caspofungin en clínicas ha crecido rápidamente, especialmente como etiqueta para caspofungin en E.E.U.U., donde se expandió recientemente para incluir la candidiasis esofágica, fungemia y otras infecciones por *Candida*, así como en la terapia empírica. Se han descrito aislados clínicos de *Candida* con susceptibilidad reducida *in vitro* a caspofungin y se ha comprobado la correlación entre el fracaso *in vivo* y el aumento *in vitro* de los valores de CMI de caspofungin, aunque la estricta correlación entre los valores de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) y el resultado clínico no se ha establecido todavía. Cuando la exposición de un paciente a caspofungin aumenta y micafungin (junio 2005) y anidulafungin entran en el mercado, se anticipa que el número de aislados clínicos con valores elevados de CMI se incrementará y que un número creciente de pacientes fracasará en la terapia debido a la reducida susceptibilidad a los fármacos.

[0012] La presente invención incluye ensayos de ácido nucleico para detectar mutaciones en hongos como las levaduras de las especies de *Candida* y los mohos de las especies de *Aspergillus*, que confieren resistencia a los fármacos pertenecientes a la clase de las equinocandinas, incluyendo caspofungin, micafungin y anidulafungin. Los ensayos son adecuados para cualquier muestra que contenga o sea susceptible de contener el hongo, incluyendo de manera no limitante las muestras obtenidas de humanos, como, por ejemplo, sangre, orina o muestras de tejido. Las especies de *Candida* incluyen *C. albicans*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, y *C. parapsilosis*. Las especies de *Aspergillus* incluyen *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* y *A. terreus*. Las dianas para los ensayos son secuencias de ácido nucleico (ADN o ARN) que corresponden a una o, preferiblemente, a ambas regiones conservadas en la familia de proteínas FKS1p. La región referida como primera región, o HS1, corresponde a la secuencia aminoácida de CaFKs1p que va desde Phe₆₄₁ hasta Pro₆₄₉. Las secuencias diana de ácido nucleico para los ensayos de la presente invención corresponden a esa región conservada, pero pueden corresponder a uno, dos o más, hasta cinco, aminoácidos adicionales en uno o ambos extremos de cada región conservada. La región referida como segunda región, o HS2, corresponde a la secuencia aminoácida de CaFKs1p que va desde Asp₁₃₅₇ hasta Leu₁₃₆₄. Las secuencias diana de ácido nucleico para los ensayos de la presente invención corresponden a esa región conservada, pero pueden corresponder a aminoácidos adicionales en los extremos, desde el aminoácido 1345 hasta el aminoácido de CaFKs1p que está a una distancia de uno, dos o hasta cinco aminoácidos de Leu₁₃₆₄, como, por ejemplo, los aminoácidos 1345 - 1369. Utilizando cepas de laboratorio y aislados clínicos se han podido identificar ciertas mutaciones que confieren resistencia a las equinocandinas en esas regiones. Entre las cepas de laboratorio utilizadas están CAI4 y M70 (véase el Ejemplo 2) y los mutantes de laboratorio generados (referidos en el presente documento como cepas "NR", por ejemplo NR2). A partir de las cepas de laboratorio y los aislados clínicos se han podido identificar ciertos cambios en aminoácidos simples que confieren resistencia, incluyendo F641L, F641S, S645P, S645Y, S645F, P649H, R1361H y R1361G, y algunos SNPs responsables de los cambios en los aminoácidos.

[0013] Los ensayos de la presente invención incluyen la amplificación de las secuencias de ácido nucleico que incluyen las secuencias diana anteriores, es decir, las secuencias diana de ácido nucleico, ya sea ADN o ARN, que corresponden a, o codifican, las secuencias aminoácidas anteriormente descritas. Se puede utilizar cualquier método de amplificación exponencial, incluyendo, por ejemplo, PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (véase la patente U.S. 4,965,188 y la solicitud de patente publicada WO 03/054233A1), LCR (reacción en cadena de la ligasa), NABSA (amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico), SDA (amplificación por desplazamiento de la hebra), 3SR (amplificación de secuencia autosostenida), TMA (amplificación de transcripción mediada) y

amplificación de Q - beta replicasa - mediada, todas ellas ya conocidas en la disciplina.

[0014] La detección de mutaciones en secuencias diana amplificadas puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento, incluyendo de manera no limitante los procedimientos de secuenciación y detección mediante sondas de hibridación marcadas. Los procedimientos de secuenciación incluyen, por ejemplo, la secuenciación dideoxi y la pirosecuenciación, ambas conocidas en la disciplina. La detección mediante sondas de hibridación puede llevarse a cabo siguiendo la amplificación, es decir, la detección en punto final; o en tiempo a real, es decir, durante la amplificación. Los procedimientos en tiempo real mediante sondas de hibridación incluyen el método de detección de la nucleasa 5' descrito en las patentes U.S. 5,487,972 y U.S. 5,538,848; la detección mediante sondas de baliza molecular se describe en la patente U.S. 5,925,517; la detección mediante parejas de sondas FRET; la detección mediante sondas de doble cadena, descrita en Li, Q. Et al., (2002) "A New Class of Homogeneous Nucleic Acid Probes Based On Specific Displacement Hybridization" Nuc. Acid Res. 30: (2) c5; y sondas para ligando de unión al surco menor (MGB), descritas en Afonia et al., (2002) "Minor Groove Binder - Conjugated DNA Probes for Quantitative DNA Detection by Hybridization - Triggered Fluorescence", Biotechniques 32: 946 - 9.

[0015] Los procedimientos de detección por sonda de la presente invención utilizan, al menos, una sonda discriminante de alelos, es decir, una sonda que se hibridará a, y generará una señal de, un alelo (por ejemplo, la secuencia de tipo salvaje) pero no otro alelo (por ejemplo, un alelo mutado) en las condiciones de detección empleadas. Las sondas discriminantes de alelos tienen, normalmente, una secuencia de unión bastante corta, típicamente no más de 25 nucleótidos de longitud y, a menudo, de 5 a 10 nucleótidos más cortas. La detección de mutaciones resistentes a los fármacos según la presente invención puede llevarse a cabo utilizando más de una sonda para analizar una secuencia diana completa. También se pueden utilizar sondas múltiples para identificar una mutación en particular, es decir, una sonda específica para cada mutación conocida o sospechosa de encontrarse en una posición nucleotídica particular. Los ensayos de sondas múltiples pueden incluir amplificaciones paralelas, cada una conteniendo una sonda además de ensayos multiplexados parcial o totalmente, en los que cada recipiente de reacción incluye dos o más sondas diferentes.

[0016] El conjunto de ensayos según la presente invención incluye sondas y cebadores de amplificación. Generalmente, los cebadores no sirven como sondas indicadoras, aunque no por ello están desautorizadas a hacerlo. Por ejemplo, los cebadores llamados "Scorpion" incluyen sondas de horquilla o de baliza molecular. Whitcombe et al., (1994) "Detection of PCR Products Using Self - Probing Amplicons and Fluorescence", Nat. Biotechnol. 11:804 - 807. Los kits para ensayo incluyen, en su forma preferente, todos los reactivos necesarios para la amplificación y la detección de, al menos, los cebadores, sondas, enzimas de polimerización y sNTPs. Los kits para ensayo pueden también incluir cebadores y sondas con otros objetivos, por ejemplo, la amplificación de oligonucleótidos de control. También pueden incluir muestras de preparación de reactivos.

[0017] La presente invención también incluye conjuntos de oligonucleótidos que incluyen, al menos, cebadores y sondas para un ensayo. También pueden incluirse oligonucleótidos de control.

[0018] Los detalles de una o más realizaciones de la presente invención se exponen en lo sucesivo junto a las figuras que se acompañan y la descripción descrita a continuación. Otras características, objetivos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, así como de las reivindicaciones.

[0019] Tal como se utilizan en la presente solicitud, se utilizan ciertas abreviaturas.

[0020] "GS" es una abreviatura para "glucano sintetasa".

[0021] Fks1p es la abreviatura para la proteína Fks1, asignada, a menudo, a la subunidad catalítica de complejos de glucano sintetasa responsable de la formación de β (1 - 3) - glucano.

[0022] *FKS1* es el gen que codifica Fks1p.

[0023] CaFks1p es la proteína Fks1 de *C. albicans*.

[0024] CaFKS1 es el gen FKS1 de *C. albicans*.

[0025] Ser₆₄₅ es la nomenclatura convencional para designar un aminoácido, en este caso serina y su posición en una proteína. En CaFks1p, la serina es el aminoácido número 645.

[0026] S645P designa una mutación, indicando primero el aminoácido de la proteína de tipo salvaje (en este caso "S", serina); después la posición aminoácida (en este caso "645", indicando Ser₆₄₅ como el tipo salvaje); y, por último, el aminoácido mutado (en este caso "P", prolina).

[0027] T1933C designa una mutación genética en la posición nucleotídica 1933 de T a C. En el gen CaFKS1, la posición nucleotídica 1933 se da en el triplete que codifica a Ser₆₄₅ de CaFks1p, y de la mutación resulta un cambio de aminoácido.

[0028] “SNP” es la abreviatura de “polimorfismo de nucleótido simple”.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 [0029]

Las figuras 1A y 1B exponen en lo sucesivo la secuencia genética CaFKS1 (número de acceso del GenBank: D88815), con regiones en las que las mutaciones que confieren susceptibilidad reducida a las equinocandinas están subrayadas.

10 La Figura 2 es la secuencia aminoácida CaFks1p (número de acceso del GenBank: BAA21535), con regiones en las que las mutaciones que confieren susceptibilidad reducida a las equinocandinas están subrayadas.

15 La Figura 3 representa la alineación de la secuencia aminoácida de *Saccharomyces cerevisiae* Fks1p con la secuencia aminoácida de *Candida albicans* Fks1p.

20 La Figura 4 expone en lo sucesivo secuencias de cebadores, sondas y sondas diana utilizados en los Ejemplos.

La Figura 5 es un gráfico de curvas de fluorescencia de ensayos de PCR en tiempo real a partir de muestras heterocigotas.

25 Las figuras 6A - 6D son gráficos de curvas de fluorescencia de ensayos de PCR en tiempo real a partir de muestras homocigotas.

La Figura 7 representa la organización de los resultados de la detección de ensayos multiplexados en tiempo real.

30 DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0030] El gen *FKS1* de las especies fúngicas transcribe al correspondiente ARN mensajero (ARNm), que se traslada a la subunidad Fks1p del 1, 3 – β – D - glucano sintetasa (GS). Los ensayos según la presente invención están designados para detectar mutaciones en una o ambas regiones genéticas cortas que se conservan entre las especies fúngicas. Se conocen tanto las secuencias aminoácidas de *Candida* como las especies de *Aspergillus* y sus correspondientes secuencias genéticas.

40 [0031] Se encuentran disponibles numerosas secuencias de *CaFKS1*. Para el diseño de cebadores y sondas de amplificación, se pueden utilizar tres, cuyos números de acceso del GenBank son: D88815, F027295 y CA2043. Las figuras 1A y 1B presentan la secuencia nucleótida D88815. La Figura 2 presenta la secuencia aminoácida de CaFks1p. En las figuras 1A y 1B, están subrayadas las dos secuencias de ADN corto incluidas en las dianas para los ensayos de la presente invención. Estas secuencias de *CaFKS1* abarcan los nucleótidos desde T1921 hasta T1947 y desde G4069 hasta G4092. En la Figura 2, están subrayadas las correspondientes secuencias de aminoácidos cortos de CaFks1p. Estas secuencias abarcan desde F (Phe) 641 hasta P649 y desde D1357 hasta L1364.

50 [0032] Para la localización de aminoácidos en diferentes hongos que producen la proteína Fks1, el análisis de alineación indica la posición. La Figura 3 ilustra la alineación de *C. albicans* y de *S. cerevisiae*. Sobre la línea se encuentra la proteína de tipo salvaje de *C. albicans*, CaFks1p, para el área de la secuencia desde el aminoácido 641 (Phe₆₄₁) hasta el aminoácido 649 (Pro₆₄₉). Esta secuencia se asemeja bastante a las series aminoácidas de Fks1p de *S. cerevisiae*, pero para los aminoácidos 639 (Phe₆₃₉) hasta 647 (Pro₆₄₆). Bajo la línea se encuentra la proteína de tipo salvaje de *C. albicans*, CaFks1p, para la parte de la secuencia desde el aminoácido 1357 (APS₁₃₅₇) hasta 1364 (Leu₁₃₆₄). Esta secuencia se asemeja bastante a las series aminoácidas de Fks1p de *S. cerevisiae*, pero para los aminoácidos 1353 (APS₁₃₅₃) hasta 1360 (Leu₁₃₆₀). Pueden llevarse a cabo alineaciones similares para las proteínas Fks1 de otras especies de hongos.

60 [0033] Una descripción de la secuencia aminoácida relevante de una especie es suficiente para permitir a los expertos en la disciplina determinar la secuencia genética correspondiente a esa secuencia aminoácida, y viceversa. Además, una descripción de la localización de la secuencia aminoácida relevante de una especie es suficiente para permitir a los expertos en la disciplina determinar la localización de la correspondiente secuencia aminoácida de otra especie y, por lo tanto, la localización de sus correspondientes secuencias genéticas; y una descripción de la localización de la secuencia genética relevante de una especie es suficiente para permitir a los expertos en la disciplina determinar la localización de la secuencia genética en otra especie y, a partir de ella, la localización de las secuencias aminoácidas correspondientes. Debido a que se ha trabajado principalmente con *C. albicans* y *C. krusei*, la descripción del presente documento se basa en las secuencias aminoácidas y genéticas de *C. albicans*. La secuencia del gen *FKS1* de *C. albicans* (*CaFKS1*) es el número de acceso del GenBank D88815. La

correspondiente secuencia aminoácida de *C. albicans* (CaFkSlp) es el número de acceso del GenBank BAA21535. Las secuencias de otras especies son: *Aspergillus fumigatus* U79728; *Aspergillus nidulans*, AACD01000061; *Candida glabrata*, CR380953; *Candida krusei*, DQ017894; *Cryptococcus neoformans*, AAAY01000070; *Paracoccidioides brasiliensis*, AF148715; *Neurospora crassa*, XM327156; *Pneumocystis carinii*, AF191096; *Saccharomyces cerevisiae* U08459; *Yarrowia lipolytica*, CR382131.

[0034] Los ensayos de la presente invención están dirigidos a las secuencias de ácido nucleico, preferiblemente secuencias de ADN, correspondientes a las dos secuencias de aminoácidos cortos subrayados en la Figura 2. Al observar la primera secuencia subrayada, la primera secuencia diana incluye ADN o ARN que codifica mínimamente Phe₆₄₁ hacia Pro₆₄₉, (utilizando CaFks1p como referencia) y, opcionalmente, de uno a cinco aminoácidos adicionales en uno o ambos extremos, preferiblemente uno o dos. En cuanto a la segunda secuencia subrayada, la segunda secuencia diana incluye ADN o ARN que codifica mínimamente Asp₁₃₅₇ hacia Leu₁₃₆₄, y, opcionalmente, de uno a cinco aminoácidos adicionales en uno o ambos extremos, preferiblemente uno o dos.

[0035] Los ensayos según la presente invención incluyen la amplificación de una primera región de ácido nucleico que incluye la primera secuencia diana. En la forma preferente, los ensayos según la presente invención también incluyen la amplificación de una segunda región de ácido nucleico que incluye la segunda secuencia diana. Tanto la primera como la segunda región pueden ser amplificadas mediante un par de cebadores únicos que abarquen ambas regiones. De manera alternativa, se pueden utilizar dos pares de cebadores, un primer par que abarque la primera región y un segundo par que abarque la segunda región. Particularmente, si se utiliza la secuenciación para la detección de mutaciones en secuencias diana, son preferibles los amplicones cortos y, por consiguiente, la utilización de dos pares de cebadores. Como se ha indicado anteriormente, los ensayos de la presente invención no están limitados a una amplificación particular. Hasta la fecha se ha utilizado la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como muestran los Ejemplos, pero pueden emplearse, del mismo modo, otros procedimientos.

[0036] Se puede realizar la detección de mutaciones en secuencias diana mediante secuenciación. Como muestran los Ejemplos, se ha utilizado secuenciación de ciclo, pero pueden utilizarse, del mismo modo, otros procedimientos. También puede llevarse a cabo la detección de mutaciones en secuencias diana mediante sondas de hibridación que, durante el ensayo, discriminan la secuencia diana de tipo salvaje de las secuencias que incluyen una mutación. Las sondas de hibridación pueden ser ADN, ARN o una combinación de los mismos. Pueden incluir nucleótidos artificiales, por ejemplo 2'O - metil ribonucleótidos. Pueden también incluir enlaces internucleótidos artificiales, por ejemplo, enlaces de fosforotioato. Pueden ser PNA. Las sondas de hibridación adecuadas para los ensayos de la presente invención incluyen sondas cuya hibridación a un alelo de una secuencia diana genera una señal detectable. En la forma preferente, las sondas están marcadas con fluorescencia y generan una señal fluorescente detectable. La detección mediante sondas de hibridación puede ser de detección en punto final, es decir, detección tras la amplificación. En la forma preferente, los ensayos con sondas de la presente invención son ensayos homogéneos, es decir, ensayos que no requieren separación de sondas unidas a partir de sondas no unidas. Más preferiblemente, los ensayos homogéneos incluyen la detección en tiempo real, más preferiblemente la detección en tiempo real por fluorescencia, es decir, detección múltiple durante el proceso de amplificación. Para los ensayos de amplificación en tiempo real, es preferible la utilización de sondas marcadas con fluorescencia dual, más preferiblemente sondas marcadas con un fluorocromo y también con un inhibidor de la fluorescencia no fluorescente como un 4 - (4' - dimetilaminofenilazo) ácido benzoico (DABCYL).

[0037] Se puede utilizar cualquier procedimiento de sondeo apropiado para los ensayos en tiempo real, incluyendo procedimientos que utilizan sondas de hibridación combinadas con tintes fluorescentes de ADN, como los tintes SYBR, que emiten fluorescencia en presencia de ADN de doble hebra. Por ejemplo, el tinte SYBR verde puede emplearse para detectar amplificación, y se puede utilizar, también, una sonda de hibridación fluorescente discriminante de alelos para detectar la amplificación de una secuencia diana de tipo salvaje, con la pendiente de fluorescencia de la sonda indicando la presencia de dianas homocigotas de tipo salvaje, dianas heterocigóticas mutadas y de tipo salvaje o dianas homocigotas mutadas. Otro enfoque sería utilizar una sonda tolerantes al apareamiento erróneo para detectar una cadena de una secuencia diana (ya sea de tipo salvaje o mutada) y una o unas sondas de alelos específicos que se pueden hibridar a la otra cadena con el fin de determinar si la secuencia diana está o no mutada. De manera alternativa, pueden utilizarse múltiples sondas para señalar la presencia de una secuencia de tipo salvaje y las mutaciones específicas como se ha demostrado en los Ejemplos. Se han identificado numerosas mutaciones en la primera y la segunda secuencia diana que han dado como resultado una susceptibilidad reducida a caspofungin. En la primera secuencia estas son (utilizando CaFks1 como referencia) T1921C, T1922C, G1932T, T1933C, C1934A, C1934T, C1934G, G1942T y C1946A. En la segunda secuencia diana estas son (utilizando CaFks1 como referencia) C4081G y G4082A.

[0038] Se encuentra disponible un amplio rango de procedimientos moleculares para el análisis de mutaciones y el genotipo de SNP. Entre estos, la PCR en tiempo real con detección mediante autoinforme de sondas de baliza molecular representa un enfoque importante. Debido a su estructura de horquilla, en equilibrio condicionado termodinámicamente entre intra e intermolecular, la hibridación permite a las sondas de baliza molecular distinguir cuidadosamente las secuencias diana relacionadas con alta especificidad y en un rango de temperaturas más amplio en comparación a las sondas lineales correspondientes. El poder discriminante de las balizas moleculares se

ha aplicado satisfactoriamente en el análisis de mutaciones, dando como resultado resistencia a antibióticos, diferenciación de alelos, SNPs tanto homocigotos como heterocigotos, así como un gran número de aplicaciones diferentes.

[0039] La selectividad de las sondas de baliza molecular ha sido útil en el análisis de alelos de CaFKS1 que confiere susceptibilidad reducida a caspofungin. El ensayo para la primera secuencia diana, designada como secuencia "HS1", centrada en las mutaciones del codón 645 de CaFKS1 T1933C, C1934A y C1934T, que se han identificado con aislados clínicos de *C. albicans* con susceptibilidad reducida a caspofungin. El diseño de las sondas de alelos específicos para detectar la resistencia de alelos en la región diana se complicó debido a que se encontró un SNP, T1929A, en la zona. Para acomodar este SNP, que se encuentra en gran parte de aislados clínicos, las sondas se diseñaron con una base de oscilación en la posición que corresponde al SNP. La introducción de la base de oscilación en la sonda disminuyó la emisión de fluorescencia global, ya que en las condiciones dadas sólo la mitad del conjunto de sondas moleculares se uniría específicamente al ADN diana complementario. Sin embargo, el obtener una mayor versatilidad de las sondas degeneradas superó con creces la pérdida de intensidad de fluorescencia absoluta ya que tales sondas eran reactivas para todos los *C. albicans* independientemente de la presencia o ausencia del SNP T1929A en CaFKS1.

[0040] Se sintetizaron cuatro balizas moleculares degeneradas correspondientes a un alelo de tipo salvaje y tres mutantes de CaFKS1 y las cuatro sondas mostraron excelentes características de discriminación con una señal de ratio de ajuste/desajuste de casi el 100% en todas las dianas. Se observó únicamente hibridación específica con ADN complementario en las cuatro sondas. La única excepción fue una hibridación menor de una baliza molecular CaFKS1 - WT con el alelo T1922C. Este resultado se puede explicar por la localización lateral del desajuste en la zona de la sonda, así como por la energía al formar el desajuste T•G, conocido como un par de desajuste ADN - ADN relativamente estable. En el caso de la heterocigosidad del alelo, las sondas de baliza molecular (reconociendo secuencias de tipo salvaje y mutadas) emitieron señales fluorescentes con la mitad de la magnitud en comparación al patrón homocigoto.

[0041] La generación de mutantes con susceptibilidad reducida a caspofungin fue un hecho excepcional y tuvo una frecuencia de mutación $<10^{-8}$ mutantes por célula viable. La formación de mutantes resistentes requirió una incubación prolongada (< 7 días) en un medio sólido que contuviera caspofungin en el que tuviera lugar el crecimiento residual de las células. No se han observado hasta la fecha células resistentes a caspofungin entre los cultivos de *C. albicans* que no han sido previamente expuestos al fármaco. Se analizaron ochenta y cinco mutantes espontáneos con susceptibilidad reducida de dos cepas diferentes mediante balizas moleculares de alelos específicos. Las mutaciones encontradas en 35 aislados de la cepa CA14 resultaron idénticas a las sustituciones anteriormente descritas que afectaban al codón de Ser₆₄₅. Dichas mutaciones también contenían gran parte de las 50 derivadas resistentes a caspofungin de la cepa M70. Se detectaron tres nuevas mutaciones, llamadas T1922C, G1932T y C1934G, que afectaban a los codones de Phe₆₄₁, Leu₆₄₄ y Ser₆₄₅ en 6 cepas de los mutantes espontáneos derivados de M70. Estos resultados son coherentes con un reciente análisis mutacional de laboratorio y las cepas clínicas de *C. albicans* con susceptibilidad reducida a caspofungin. La gran mayoría de las sustituciones nucleótidas se encontraron en el codón 645 de CaFKS1. Las mutaciones descubiertas recientemente en otros sitios de CaFKS1 se encontraron en la descendencia de la cepa única M70, y su frecuencia relativa no excedió el 12%.

[0042] De manera global, la aplicación de balizas moleculares individuales permitió el genotipo de los 85 derivados resistentes a caspofungin. Los tres alelos marcados con balizas moleculares se identificaron correctamente en 79 cepas, confirmadas mediante el análisis de la secuencia de ADN. El multiplexado de las cuatro balizas moleculares en una única reacción produjo un ensayo de tubo cerrado para la detección de las mutaciones resistentes a caspofungin en la primera secuencia diana de CaFKS1. En dicho ensayo, la señal FAM mostró la presencia del alelo de tipo salvaje CaFKS1, mientras que la fluorescencia HEX informó de la presencia de una de las mutaciones de CaFKS1 T1933C, C1934A o C1934T en una muestra de ADN. El ADN extraído de las cepas heterocigotas de *C. albicans* de cualquiera de las tres cepas anteriores emitió las señales FAM y HEX. Además, el ensayo permitió la detección segura de mutaciones conocidas en el gen CaFKS1 de *C. albicans* que conferían susceptibilidad reducida a caspofungin tanto en estado homocigoto como heterocigoto. El ensayo fue tan preciso que también permitió identificar otras mutaciones en la región que pueden influir en la susceptibilidad a fármacos.

[0043] Como se ha mencionado anteriormente, se han mostrado mutaciones relacionadas con la susceptibilidad reducida a caspofungin en regiones cortas conservadas de CaFKS1. El locus más prominente es Ser₆₄₅ e incluye las sustituciones S645P, S645Y y S645F, que se han encontrado en aislados tanto clínicos como de laboratorio de *C. albicans*. Las mutaciones parecían ser dominantes y conferían una resistencia muy alta a caspofungin en estado homocigoto y heterocigoto. Las sondas de diagnóstico que se dirigen a dichas mutaciones pueden presentar un mecanismo rápido y preciso para la evaluación de la resistencia a caspofungin de *C. albicans*.

[0044] El diagnóstico rápido de resistencia a caspofungin basado en el análisis de las mutaciones de *FKS1* debe tener habilidad para discriminar los alelos heterocigotos y homocigotos diferenciando en los nucleótidos simple así como la habilidad de detección simultánea de esos alelos en formato multiplex. La tecnología de balizas moleculares representa una técnica excelente para la discriminación de alelos y la detección multiplex.

[0045] El análisis de secuencia de ADN de CaFKS1 a partir de más de cincuenta aislados clínicos y de laboratorio de *C. albicans* con susceptibilidad reducida a caspofungin reveló tres mutaciones: T1933C, C1934A y C1934T, que dieron como resultado cambios en los aminoácidos S645P, S645Y y S645F, respectivamente. Además de estas sustituciones nucleótidas, la alineación de las secuencias reveló otro punto de variabilidad en esta región. En, aproximadamente, el 25 % de todas las cepas de *C. albicans* analizadas, se observó una sustitución del nucleótido simple T1929A, que también tuvo lugar en la cepa SC5314, como parte del proyecto de secuenciación genética de *Candida albicans*. Esta observación es significativa puesto que tiene el potencial de alterar la hibridación sonda - amplicón necesaria para la discriminación mediante sondas de alelos específicos que cubren esta región. Con base en el consenso de datos de las secuencias de CaFKS1, se diseñaron cuatro sondas de baliza molecular de alelos específicos que cubrieran los nucleótidos 1920 - 1944. Este trabajo se explica con detalle en los Ejemplos. Una sonda fue complementaria al alelo de tipo salvaje (WT) de CaFKS1 encontrado en las cepas de *C. albicans* susceptibles a caspofungin, mientras que tres sondas fueron complementarias a los alelos mutados de CaFKS1 (C1934A, C1934T, T1933C) observados en aislados resistentes a caspofungin. Todas las balizas tuvieron regiones de tallo largo de 6 nucleótidos idénticos 5'CGCGAG y CTCGCG3' y se sintetizaron con una base oscilante A / T 50:50 en la posición correspondiente al SNP de CaFKS1 en la posición 1929 para asegurar su alineación a las secuencias diana. La baliza molecular de tipo salvaje CaFKS1 - WT se marcó con FAM en su extremo 5', mientras que tres balizas mutadas se marcaron con HEX en su extremo 5'. Los extremos 3' de todas las balizas moleculares se modificaron con inhibidor de fluorescencia DABCYL. El diseño específico de los cebadores y las sondas se describen en el Ejemplo 3. La ventana de temperaturas de discriminación para las sondas se describe en el Ejemplo 4. La detección se llevó a cabo en la ventana.

[0046] Los mutantes espontáneos de las cepas de *C. albicans* CAI4 y M70 resistentes a caspofungin se aislaron mediante la selección en un medio de crecimiento sólido compuesto de 4 µg / ml (cuarenta veces el CMI) de caspofungin. La frecuencia de la formación de derivados espontáneos resistentes a caspofungin para ambas cepas fue $<10^{-8}$ mutantes por célula viable. En ambas cepas, se observó la formación de colonias reducidas de crecimiento lento en las placas con caspofungin. Las colonias se sembraron en placas frescas con la misma cantidad de caspofungin y no hubo crecimiento alguno. Tras una incubación prolongada de más de 10 días, una pequeña fracción de pequeñas colonias reducidas dio lugar a derivados de crecimiento rápido lisos capaces de propagarse en el medio con caspofungin tras la reinoculación. Solo se conservó y utilizó para un posterior análisis uno de estos derivados por placa / cultivo individual. En total, se aislaron 35 y 50 aislados con susceptibilidad reducida a caspofungin de las cepas CAI4 y M70, respectivamente. Las pruebas de susceptibilidad a caspofungin *in vitro* revelaron valores de CMI < 16 µg / ml de caspofungin para todos los aislados derivados de laboratorio. Los detalles del procedimiento de aislamiento se describen en el Ejemplo 2.

[0047] La secuenciación preliminar del gen CaFKS1 de las cepas CAI4 y M70 (véase el Ejemplo 2) revelaron la existencia del SNP T1929A en el gen CaFKS1 en CAI4 y su ausencia en M70. Se extrajo ADN cromosómico de las cepas madre CAI4 y M70 y sus derivados resistentes a caspofungin y se utilizaron como patrones para los experimentos de PCR en tiempo real con balizas moleculares de CaFKS1. La Figura 4 muestra la secuencia nucleótida de varias dianas, tanto de tipo salvaje como mutadas, y los cebadores y sondas de baliza molecular utilizados. En la Figura 4 se subraya las regiones de la sonda de las sondas y las secuencias diana de las hebras diana. Las bases de las sondas y las secuencias diana que corresponden a las mutaciones en las regiones HS1 de CaFKS1 están en negrita. Las posiciones de base designada W indican una mezcla equimolar de dos balizas moleculares degeneradas diferentes solo por A o T en esa posición. Se sometió cada muestra de ADN cromosómico a cuatro reacciones PCR separadas con sondas de baliza molecular individuales que representaban diferentes alelos con susceptibilidad reducida. El protocolo de PCR en tiempo real se describe en el Ejemplo 5. Se aplicó una temperatura de hibridación de 61 °C en todas las reacciones, lo que permitió una excelente discriminación entre los diferentes alelos de CaFKS1 (véase el Ejemplo 4). Se encontraron alelos mutados de CaFKS1 en los 35 derivados resistentes a caspofungin de la cepa CAI4. La mayoría de ellos (20 aislados) tenían la mutación heterocigota WT / T1933C, mientras que 15 mutantes contenían las mutaciones homocigotas T1933C, C1934A o C1934T. En el caso de la heterocigosidad en T1934C, se emitieron dos señales de magnitud similar de las balizas moleculares CaFKS1 - WT y CaFKS1 - T1933C (véase la Figura 5). La Figura 5 es el resultado de cuatro PCRs separadas con balizas moleculares individuales y dianas de ADN. La baliza de CaFKS1 - T1933  + el alelo del ADN de CaFKS1 con mutación homocigota T1933C, la baliza de CaFKS1 - WT  + el alelo del ADN de CaFKS1 con mutación homocigota T1933C, la baliza de CaFKS1 - T1933C  + el alelo del ADN de CaFKS1 con mutación heterocigota T1933C, la baliza de CaFKS1 - WT  + el alelo del ADN de CaFKS1 con mutación heterocigota T1933C.

[0048] Las figuras 6A - 6D muestran la discriminación de diez alelos homocigotos de CaFKS1 mediante cuatro balizas moleculares CaFKS1 - WT (véase la Figura 6A), CaFKS1 - T1933C (véase la Figura 6B), CaFKS1 - C1934A (véase la Figura 6C) y CaFKS1 - C1934T (véase la Figura 6D). Cada conjunto resume los resultados de once PCRs individuales con alelos individuales de ADN con mutaciones:  de tipo salvaje (sin mutaciones ni SNP),  T1933C,  C1934A,  C1934T,  T1929A SNP,  T1933C + T1929A SNP,  C1934A + T1929A SNP,  C1934T + T1929 SNP,  T1922C,  G1932T + C1934G,  vacío (sin ADN).

[0049] Las muestras de ADN con mutaciones homocigotas de CaFKS1 ofrecieron respuestas distintas mediante las balizas moleculares correspondientes a los mutantes, sin emisión alguna de señal de CaFKS1 - WT (Figuras 6B – 6D). En cambio, el ADN cromosómico de la cepa madre CAI4 interactuó solo con la sonda CaFKS1 mientras que no se detectó fluorescencia alguna de las balizas mutadas (Figura 6A).

[0050] El genotipo de los alelos de CaFKS1 resistentes a caspofungin derivados de la cepa M70 revelaron las mutaciones ya conocidas T1933C, C1934A o C1934T en 44 de las 50 muestras. Tal y como ocurrió en el caso de los mutantes de CAI4, la mayoría de los derivados de M70 adquirieron mutaciones heterocigotas de T1933C. Se descubrió que 25 de las 50 cepas con susceptibilidad reducida albergaban la sustitución de T1933C en una copia de CaFKS1. Se detectaron las mutaciones heterocigotas C1934A y C1934T en 6 cepas. Todas las PCRs en tiempo real que involucraban muestras de ADN con las mutaciones heterocigotas T1933C, C1934A o C1934T emitieron dos tipos de señales fluorescentes en las balizas moleculares de CaFKS1 - WT y una de las tres balizas moleculares mutadas de CaFKS1 - T1933C, CaFKS1 - C1934A o CaFKS1 - C1934T. Además de las mutaciones heterocigotas en las posiciones 1933 y 1934 de CaFKS1, se detectaron sustituciones homocigotas en esos sitios en 13 cepas, que se identificaron mediante hibridación con las correspondientes balizas moleculares mutadas CaFKS1 - T1933C, CaFKS1 - C1934A o CaFKS1 - C1934T (Figuras 6B – 6D).

[0051] En 6 de las 50 cepas, la amplificación de PCR del ADN cromosómico se detectó muy débilmente con la baliza molecular de tipo salvaje y no en todas las balizas moleculares mutadas (5 cepas) y una cepa no se detectó ni con la baliza molecular de tipo salvaje ni con la mutada. Dada la especificidad de los alelos de las sondas, los datos sugieren que la secuencia patrón se alteró de manera desconocida.

[0052] Se utilizó la secuenciación de ADN de CaFKS1 de todas las cepas de CAI4 y M70 resistentes a caspofungin para confirmar los resultados de la PCR en tiempo real y para aclarar los problemas no resueltos de los seis derivados de M70. Se encontró un 100% de correlación entre los resultados de la PCR en tiempo real y los de la secuenciación para las 35 derivadas de CAI4 y las 44 derivadas de M70. Gracias a la secuenciación de ADN se confirmaron todas las mutaciones heterocigotas y homocigotas detectadas en las posiciones 1933 y 1934 de CaFKS1 en los experimentos de PCR en tiempo real mediante la hibridación con las balizas moleculares CaFKS1 - T1933C, CaFKS1 - C1934A o CaFKS1 - C1934T. Se descubrió la existencia de una nueva mutación homocigota T1922C en el gen CaFKS1 de los 5 derivados de M70 que mostraron resultados ambiguos en los experimentos de PCR en tiempo real. Además, la secuenciación de ADN reveló dos nuevas mutaciones homocigotas, G1932T y C1934G, en el gen CaFKS1 de uno de los derivados resistentes a caspofungin de M70 que no emitió ninguna respuesta fluorescente en la PCR en tiempo real. Como era de esperar, todos los derivados de la cepa CAI4 tenían SNP T1929A, mientras que los derivados de la cepa M70 carecían de esta según reveló la secuenciación.

[0053] La aplicación separada de balizas moleculares de CaFKS1 hizo posible el genotipo de tres mutaciones conocidas en el gen CaFKS1 de *C. albicans*. Se investigó también la posibilidad de combinar las cuatro balizas moleculares derivadas de CaFKS1 en PCRs multiplexadas en tiempo real adecuadas para valorar simultáneamente dichas mutaciones en una muestra de ADN dada. Véase el Ejemplo 5. Se agruparon las cuatro balizas moleculares de CaFKS1, marcadas con diferentes fluorocromos para las de tipo salvaje y mutadas, en una mezcla de sondas agregada que se añadió a las PCRs de manera individual. Se utilizaron como patrones de las PCRs multiplexadas en tiempo real los ADNs cromosómicos de las cepas de tipo salvaje CAI4 y M70 y 12 derivados resistentes a caspofungin de esas cepas que representaban 12 genotipos diferentes de CaFKS1. Las condiciones de los experimentos de las PCRs multiplexadas en tiempo real fueron idénticas a las de las PCRs en tiempo real con balizas moleculares individuales con la única excepción de una temperatura de hibridación de 60 °C. La baliza molecular de tipo salvaje de CaFKS1 - WT se marcó con FAM y las balizas moleculares mutadas CaFKS1 - T1933C, CaFKS1 - C1934A o CaFKS1 - C1934T con HEX. Utilizando estas sondas, se pudieron identificar cepas susceptibles a caspofungin y cepas resistentes a caspofungin dependiendo de la naturaleza de la emisión fluorescente.

[0054] La Figura 7 ilustra la gráfica de las emisiones del software Stratagene MX4000 para los ensayos de PCR multiplexada en tiempo real de las mutaciones de CaFKS1. El semicírculo superior se destaca cuando se observan señales de FAM, informando de la presencia de ADN de tipo salvaje de CaFKS1. El semicírculo inferior se destaca cuando se observan señales de HEX, informando de la presencia de cualquiera de las tres mutaciones mostradas en el ADN de CaFKS1. Los alelos homocigotos de CaFKS1 emitieron señales FAM o HEX, mientras que los alelos heterocigotos de CaFKS1 emitieron ambas señales.

[0055] Solo se observó fluorescencia de FAM cuando el ADN de las cepas susceptibles CAI4 y M70 fueron sometidas a PCRs multiplexadas en tiempo real. Solo se observó fluorescencia de HEX en las PCRs multiplexadas en tiempo real con ADN compuesto de las mutaciones homocigotas T1933C, C1934A o C1934T de CaFKS1 (Figura 7). Se detectaron tanto las señales FAM como HEX de magnitud similar cuando el ADN analizado procedía de cepas con las mutaciones heterocigotas T1933C, C1934A o C1934T del gen CaFKS1 (Figura 7). Las PCRs multiplexadas en tiempo real con ADN cromosómico procedente de cepas con dos de las nuevas mutaciones G1932T y C1934G de CaFKS1 no mostraron ninguna emisión fluorescente FAM ni HEX. Se observaron señales menores de FAM en la reacción con ADN cromosómico procedente de la cepa con la mutación homocigota T1922C.

[0056] También se han diseñado cebadores y sondas para la segunda región diana, denominada “HS2”, específicamente para un mutante, G4082A. Esto se describe en el Ejemplo 6. Una sonda mutada podría diseñarse de manera similar para el mutante C4081G o cualquier otro mutante de los ensayos de diseño que incluyen la segunda región diana, ya sea separada o multiplexada, ya sea para HS2 o para HS1 y HS2 como se describe en los ejemplos anteriores.

Ejemplo 1

[0057] La amplificación de ácido nucleico de los fragmentos pertinentes del gen CaFKS1 asociados a la secuenciación cíclica para la identificación de mutantes se ha demostrado utilizando cuatro cepas diferentes. Se amplificaron fragmentos de CaFKS1 (ca. 450 bp) a partir del ADN genómico de las cepas CAI4 - R1, NR2, NR3 y NR4. Los cebadores de sentido y antisentido utilizados para la PCR, basada en la secuencia de CaFKS1 (número de acceso del GenBank D88815), fueron 5' - GAAATCGGCATATGCTGTGTC - 3' y 5' - AATGAACGACCAATGGAGAAG - 3', respectivamente. Los productos de la PCR se copiaron en la pCR2.1 (Invitrogen) y se determinó la secuencia de ADN. Para los aislados clínicos de *Candida* se amplificó una parte más amplia de CaFKS1 ORF (ca 2.6 kb) para el análisis de la secuencia de ADN utilizando 5' - CATTGCTGTGGCCACTTTAG - 3' y 5' - GGTCAAATCAGTGAAAACCG - 3' como cebadores hacia adelante e inversos, respectivamente. Además de la primera región diana de CaFKS1 descrita anteriormente (correspondiente a los nucleótidos 1921 – 1947), este fragmento incluye los segundos nucleótidos diana 4069 – 4092. Se purificaron los productos de la PCR, cuantificados por marcaje de fluorescencia (Pico Green, Sondas Moleculares), y secuenciados en las direcciones 5' y 3' utilizando el DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter).

Ejemplo 2

[0058] El análisis de la secuencia de ADN utilizando la amplificación de ácido nucleico y la secuenciación cíclica puede utilizarse como técnica de ensayo en sí misma y como control para evaluar los ensayos basados en sondas.

[0059] Se extrajo el ADN cromosómico de *C. albicans* de células cultivadas durante una noche en medio líquido YPD con Q - Biogene FastDNA (Q - Biogene, Irvine, CA). Los experimentos de PCR se llevaron a cabo en un termociclador iCycler (Bio - Rad Laboratories, Hercules, CA). Se amplificó la región HS1 de CaFKS1 utilizando cebadores CaFKS1 - F1719 y CaFKS1 - R2212 (Figura 4). Cada 100 µl de reacción de PCR contenía 0,25 µM de cada cebador, 2,5 U de polimerasa de ADN iTaq (Bio - Rad Laboratories, Hercules, CA), 0,5 mM de dNTPs, 50 mM de KCL, 4 mM de MgCl₂, 20 mM de Tris - HCL, pH = 8,4 y aproximadamente 50 ng de ADN cromosómico de *C. albicans*. Las condiciones del ciclo fueron de 1 ciclo de 3 min a 95 °C, 35 ciclos de 30 seg a 95 °C, 30 seg a 55 °C, 1 min a 72 °C y 1 ciclo de 3 min a 72 °C. Los productos de la PCR se purificaron mediante el kit de purificación Montage PCR (Millipore, Bedford, MA). Los productos de la PCR para la secuenciación se obtuvieron y purificaron mediante el kit CEQTM Dye Terminator Cycle Sequencing – Quick Start (Beckman Coulter, Fullerton, CA) según las instrucciones del fabricante en el termociclador iCycler. Se utilizaron los cebadores CaFKS1 - F1719 o CaFKS1 - R2212 para la reacción de secuenciación. Las condiciones del ciclo para la PCR fueron de 1 ciclo de 3 min a 95 °C, 30 ciclos de 20 seg a 96 °C, 20 seg a 50 °C y 1 min a 60 °C. La secuenciación de ADN al completo se llevó a cabo en el CEQTM 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Se utilizó CEQTM 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA) para el control del hardware así como para registrar el análisis de los resultados de la secuenciación.

[0060] La cepa CAI4 de *C. albicans* se adquirió de ATCC (ATCC, Manassas, VA). La cepa M70 de *C. albicans* se adquirió de la colección de cultivos de Merck (MRL, Rahway, NJ). Las cepas crecieron en un medio de levadura de extracto de peptona - dextrosa (YPD) (1% de extracto de levadura, 2% de Bacto Peptone, 2% de dextrosa). Para el crecimiento de la cepa CAI4, se añadió uridina (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) al medio de YPD a 25 mg / ml. El caspofungin (Merck, Rahway, NJ) se añadió directamente al YPD a 4 µg / ml. Las placas de agar se incubaron a 30 °C y los cultivos líquidos crecieron en tubos de cultivo de 12 ml con 3 ml de YPD en el agitador rotativo (100 rpm) a 30 °C. Se estimó la susceptibilidad a caspofungin en un ensayo de dilución de microcaldo líquido en un medio de RPMI - 1640 (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO), como se resume en el documento M27 - A2 del NCCLS.

[0061] Los mutantes espontáneos resistentes a caspofungin de las cepas CAI4 y M70 de *C. albicans* se aislaron disponiendo en placas 100 µl (~ 10⁸ células) de un cultivo líquido de YPD durante 18 h en placas de YPD con 4 µg / ml de caspofungin. Las diluciones en serie de los cultivos de la noche anterior se colocaron en las placas de YPD sin selección antibiótica para determinar con precisión los recuentos de colonias. Las placas seleccionadas se incubaron durante 10 - 14 días a 30 °C. Para cada placa de la selección, al menos 4 colonias resistentes al fármaco se reinocularon en placas frescas con caspofungin para confirmar el fenotipo resistente.

Ejemplo 3

[0062] Las tres secuencias de ADN de CaFKS1 con números de acceso del GenBank D88815, AF027295 y CA2043 se utilizaron para las balizas moleculares de FKS1 y el diseño de los cebadores. Es ya conocido en la disciplina el diseño de cebadores y sondas para ensayos. Existen numerosas publicaciones disponibles para asistir a los investigadores. Además, también están disponibles paquetes de software para ordenador que aceleran el

proceso y reducen los ajustes que se necesitan hacer por ensayo de prueba y error (véase el Ejemplo 4). En el presente caso se utilizaron dichos paquetes de software. Las balizas moleculares y los cebadores de ADN (Figura 4) se diseñaron utilizando el software Beacon Designer 3.0 (PREMIER Biosoft, Palo Alto, CA). Se aplicaron los parámetros por defecto del software en la construcción de todas las balizas moleculares y los cebadores. Las balizas moleculares se marcaron con fluorocromos 5 - carboxifluorescina (FAM) y 6 - carboxi - 2', 4, 4', 4', 7, 7' - hexaclorofluorescina (HEX) en el extremo 5' y con DABCYL en el extremo 3'. Tanto las balizas moleculares como los cebadores fueron adquiridos de Biosearch Technologies (Biosearch Technologies, Novato, CA). Las propiedades de hibridación para las balizas moleculares de alelos específicos de CaFKS1 se analizaron en toda la ventana de temperaturas, entre 25 °C y 95 °C, con oligonucleótidos de cadena simple (Figura 4). La hibridación mediante balizas diana moleculares se llevó a cabo con el sistema Stratagene MX4000 Multiplex Quantitative PCR (Stratagene, La Jolla, CA). Se eligió el experimento "Molecular Beacon Melting Curve" en el software MX4000 para monitorizar y analizar los datos. Cada 50 µl de mezcla de reacción de hibridación contenía 1 x solución amortiguadora Stratagene Core PCR, 4 mM MgCl₂, 100 pmol de oligonucleótido diana individual y 5 pmol de baliza molecular. Las condiciones térmicas del experimento incluyen el calentamiento a 95 °C durante 3 min y el enfriamiento a 80 °C, descendiendo después a 25 °C en 112 pasos de 30 segundos cada uno con un gradiente de temperatura de - 0,5 °C. La emisión fluorescente de cada reacción individual se midió al término de la etapa de enfriado. Los datos finales del experimento de la "Molecular Beacon Melting Curve" se convirtieron en un experimento de tipo "SYBR Green (con Dissociation Curve)". La temperatura de fusión (T_m) de cada par de balizas diana moleculares se determinó con el software MX4000 con una temperatura correspondiente al valor máximo del primer derivado de la emisión fluorescente - $R' (T)$. Cada experimento de perfiles térmicos se realizó por triplicado.

Ejemplo 4

[0063] Se analizó la capacidad discriminatoria de los alelos de las sondas como parte del diseño de la sonda y del ensayo. Los perfiles de hibridación se determinaron mediante sondas de baliza moleculares contra ocho patrones de ADN nucleótido que representaban el CaFKS1 de tipo salvaje y sus diferentes alelos mutados resistentes a caspofungin en las posiciones 1933 y 1934, así como el SNP en la posición 1929 (Figura 4). Se emplearon los oligonucleótidos descritos como "diana" en la Figura 4 para el análisis de la curva de fusión de las sondas. En numerosas secuencias diana, las partes subrayadas son complementarias a una sonda; como se indica, las adenosinas repetitivas terminales adicionales se añadieron para reducir la formación de estructuras secundarias durante el análisis de la curva de fusión. En primer lugar, la hibridación de cada una de las sondas de baliza molecular fue analizada con dos ADNs diana complementarios a la secuencia de la sonda, que difería en la base nucleotídica equivalente al SNP en la posición 1929. Cada sonda de baliza molecular degenerada dio lugar a dos tipos de híbridos moleculares con dianas de ADN. Los híbridos estables se formaron debido al nucleótido diana y a una sonda de baliza molecular con secuencia complementaria. Otra subpoblación de sondas de baliza moleculares con un único nucleótido desaparejado en la posición 1929 dio lugar a un híbrido menos estable con la misma diana de ADN. En consecuencia, las curvas de fusión para las sondas mezcladas representada como primer derivado de la emisión fluorescente [- $R' (T)$] mostraron dos picos distintos correspondientes a las T_m para los híbridos de baliza molecular diana más y menos estables. A continuación se investigó la hibridación de cada baliza molecular con oligonucleótidos de ADN no complementario (Figura 4). Mientras que los híbridos desaparejados eran, en general, menos estables que el complemento, la degeneración de las balizas moleculares produjo la misma tendencia para las dos subpoblaciones híbridas. Los híbridos intermoleculares más estables tuvieron lugar gracias al oligonucleótido diana y a la subpoblación de baliza con un solo apareamiento erróneo, mientras que los híbridos menos estables contenían oligonucleótidos y la subpoblación con apareamiento erróneo doble. Sin tener en cuenta los valores de las dos T_m obtenidas para cada uno de los ocho pares de balizas moleculares y oligonucleótidos diana, solo se tuvo en cuenta el valor de T_m más alto correspondiente al híbrido de baliza diana más estable con un o ningún apareamiento erróneo. Los valores de la T_m de las balizas moleculares de CaFKS1 y sus dianas de ADN complementario estaban bastante próximos unos de otros y la temperatura descendió a unos 62,7 °C - 64 °C. Los correspondientes rangos de discriminación ocupan, de la misma forma, el diapason térmico similar. Tal uniformidad se consiguió variando la longitud de la secuencia en que se encuentra la sonda en las balizas individuales. Las balizas moleculares CaFKS1 - WT, CaFKS1 - T1933C, CaFKS1 - C1934A y CaFKS1 - C1934T tenían regiones de sonda de 14, 23, 25 y 25 nucleótidos respectivamente.

Ejemplo 5

[0065] Un ensayo de amplificación en tiempo real demostró los cebadores y sondas descritos en la Figura 4. El ensayo incluyó la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con detección en tiempo real utilizando sondas de baliza molecular.

[0066] Para los ensayos que utilizaban sondas simples (Figura 4), el procedimiento fue el siguiente. Los experimentos de PCR en tiempo real se realizaron en un sistema Stratagene MX4000 Multiplex Quantitative PCR, utilizando la configuración "Quantitative PCR (Multiple Standards)". Se emplearon los reactivos del kit Brilliant® QPCR Core Reagent (Stratagene, La Jolla, CA) para todas las reacciones. Cada 50 µl de mezcla de reacción de PCR contenía 1 x solución amortiguadora Stratagene Core PCR, 0,2 µM de baliza molecular, 0,25 µM de cada cebador de HS1AN2 y HS1SN2 (Figura 4), 2,5 U de polimerasa de ADN SureStart® Taq (Stratagene, La Jolla, CA), 0,4 mM de dNTPs, 4mM de MgCl₂ y, aproximadamente, 50 ng de ADN cromosómico de *C. albicans*. En los

experimentos de PCR multiplexadas, la concentración de cada una de las cuatro balizas moleculares (Figura 4) era de 0,2 µM. Los parámetros del termociclador para PCR en tiempo real fueron: 1 ciclo de 10 min a 95 °C, 45 ciclos de 30 seg a 95 °C, 30 seg a 61 °C y 30 seg a 72 °C. Se utilizó una temperatura de hibridación de 60 °C cuando se realizaron los experimentos de PCR mutiplexadas. Se cambió el filtro establecido para el sistema MX400 a FAM - 960 y HEX - 720 con el objetivo de ecualizar las magnitudes de la señal fluorescente de diferentes balizas moleculares. La fluorescencia se midió 3 veces durante la etapa de hibridación.

[0067] Las señales fluorescentes emitidas por Stratagene MX4000 durante la amplificación mediante PCR se monitorizaron utilizando el software MX4000 en tiempo real. Al término de cada serie, el conjunto de datos de amplificación se convirtieron a formato gráfico y se conservaron como archivos de imagen o se exportaron a Microsoft Office Excel y se conservaron como hojas de cálculo. En el caso de las reacciones de PCR multiplexadas, los resultados finales de las amplificaciones de PCR se convirtieron del experimento tipo "Quantitative PCR (Multiple Standards)" al tipo "Quantitative Plate Read". Los cambios totales de la fluorescencia para los fluorocromos individuales (Rpost - Rpre) se tomaron como valores para análisis. Los resultados se convirtieron a formato numérico y se conservaron como archivos de imagen u hojas de cálculo.

[0068] Para los ensayos multiplexados se utilizó la amplificación mediante PCR como se describe anteriormente, excepto porque la temperatura de hibridación de los termocicladores fue de 60 °C en lugar de 61 °C. Se utilizaron sondas multiplexadas en la misma reacción.

Ejemplo 6

[0069] Las sondas de baliza molecular para los ensayos de amplificación por PCR se han diseñado para la segunda secuencia de ADN, denominada HS2. Los cebadores tienen las secuencias mostradas a continuación:

CCATTTGGTTGTTACAATATTGC - 3'

CCAATGGAATGAAAGAAATGAAG - 3'

[0070] Para distinguir la secuencia genética de tipo salvaje del mutante G4082A resistente a las equinocandinas, se diseñaron secuencias nucleótidas para un par de sondas moleculares discriminantes de alelos. Cada una sería marcada en uno de sus extremos con un fluorocromo y el otro extremo se marcaría con un inhibidor de fluorescencia no fluorescente como DABCYL. Por supuesto, se utilizarían fluorocromos diferenciables de manera que la sonda de tipo salvaje solo hibridara la secuencia de tipo salvaje y, acto seguido, se emitiría la fluorescencia, y la sonda mutada hibridaría solamente la secuencia mutada y, acto seguido, se emitiría la fluorescencia en el punto final de los ensayos y las amplificaciones en tiempo real que contengan una de estas sondas, o en ensayos multiplexados que contengan ambas sondas, con o sin cebadores y sondas para la primera secuencia diana.

[0071] Las sondas de baliza molecular tienen lazos de cadena sencilla de 24 nucleótidos de longitud flanqueados por secuencias de brazo complementarias 3' y 5' que forman un tallo de 6 nucleótidos. Ambas sondas tienen una T_m calculada de 61,5 °C. Sus secuencias son:

Sonda de tipo salvaje: CGCGAGGATTGGATTAGACGTTATACTTTGCTCGCG

[0072] Sonda mutada:

CGCGAGGATTGGATTAGACATTATACTTTGCTCGCG

[0073] Los brazos complementarios están subrayados y el nucleótido simple mutado está en negrita.

[0074] Se han descrito numerosas realizaciones de la presente invención. Sin embargo, se comprenderá que pueden llevarse a cabo diferentes modificaciones sin alejarse del espíritu y el alcance de la invención. Por ejemplo, se pueden emplear procedimientos de amplificación diferentes a la PCR, como NABSA, y sondas discriminantes de alelos diferentes a las sondas de baliza molecular. En consecuencia, otras realizaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.-** Un ensayo de ácido nucleico para la resistencia a fármacos del tipo equinocandinas en hongos susceptibles a los fármacos del tipo equinocandinas que contienen el gen *FKS1* correspondientes a la subunidad 1 – 3 β – D - glucano sintetasa de Fks1p que se compone de una primera secuencia diana de ácido nucleico del gen *FKS1* correspondiente a los aminoácidos 636 a 654 de CaFks1p o cualquier área más pequeña de esa secuencia que incluya los aminoácidos 641 a 649 para generar una primera secuencia diana amplificada con sondas de hibridación marcadas específicas para las mutaciones aminoácidas S645P, S645Y y S645F de CaFks1p, y detectar la presencia de cualquiera de estas mutaciones en dicha primera secuencia diana amplificada.
- 10 **2.-** El ensayo de la reivindicación 1 en el que el hongo es una especie de *Candida*.
- 15 **3.-** El ensayo según las reivindicaciones 1 o 2 en el que la etapa de amplificación incluye una segunda secuencia diana de ácido nucleico del gen *FKS1* correspondiente a la subunidad 1 – 3 – β – D - glucano sintetasa de Fks1p correspondiente a los aminoácidos 1345 a 1369 de CaFks1p o a cualquier área más pequeña de esa secuencia que incluye los aminoácidos 1357 a 1364 y en la que la etapa de detección incluye la detección de cualquier alelo de tipo salvaje en dicha segunda secuencia diana amplificada.
- 20 **4.-** El ensayo de la reivindicación 3 que es capaz de detectar al menos un cambio aminoácido seleccionado del grupo consistente en R1361H y R1361G de CaFks1p.
- 5.-** El ensayo de las reivindicaciones 3 o 4 en el que la amplificación de la primera secuencia diana y la segunda secuencia diana se lleva a cabo en la misma mezcla de reacción.
- 25 **6.-** El ensayo de la reivindicación 1 en el que la detección es detección homogénea en tiempo real o en punto final.
- 7.-** El ensayo según la reivindicación 6 en el que la detección es detección en tiempo real.
- 30 **8.-** El ensayo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la etapa de amplificación incluye un procedimiento de amplificación seleccionado del grupo consistente en PCR, NABSA y TMA.
- 35 **9.-** Un conjunto de oligonucleótidos que incluye un primer par de cebadores hacia adelante e inversos para amplificar una primera secuencia diana del gen *FKS1* correspondiente a la subunidad 1 – 3 – β – D - glucano sintetasa de Fks1p correspondiente a los aminoácidos 636 - 654 de CaFks1p o a cualquier área más pequeña de esa secuencia que incluya los aminoácidos 641 - 649 y sondas de hibridación discriminantes de alelos marcadas que hibriden las mutaciones T1933C, C1934A y C1934T.
- 40 **10.-** El conjunto de oligonucleótidos de la reivindicación 9 que incluye un segundo par de cebadores hacia adelante e inversos para amplificar una segunda secuencia diana del gen *FKS1* correspondiente a la subunidad 1 – 3 – β – D - glucano sintetasa de Fks1p correspondiente a los aminoácidos 1345 - 1369 de CaFks1p o a cualquier área de esa secuencia que incluya los aminoácidos 1357 – 1364.
- 45 **11.-** El conjunto de oligonucleótidos de la reivindicación 9 en el que dicho primer par de cebadores hacia adelante e inversos también abarca los aminoácidos 1357 – 1364 correspondientes a CaFks1p.
- 12.-** El conjunto de oligonucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 que incluyen, además, sondas de hibridación discriminantes de alelos marcadas que hibridan selectivamente al menos una mutación seleccionada del grupo formado por T1921C, T1922C, G1932T, C1934G, C1942T, y C1946A de CaFKS1.
- 50 **13.-** El conjunto de oligonucleótidos de la reivindicación 9 en el que las sondas son sondas de baliza molecular.
- 14.-** Un kit de reactivos de amplificación que incluye polimerasa de ADN, dNTPs y un conjunto de oligonucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13.
- 55 **15.-** El kit de reactivos según la reivindicación 14 incluye, además, reactivos para la preparación de muestras y la extracción de ADN.
- 60 **16.-** El ensayo de la reivindicación 1 que incluye la entrada en contacto de la primera secuencia diana amplificada con sondas de hibridación marcadas específicas para al menos una de las mutaciones aminoácidas seleccionadas del grupo formado por F641L y F641S de CaFks1p, y la detección de la presencia de dicha al menos una mutación.
- 17.-** El ensayo de las reivindicaciones 1 o 16 en el que la primera secuencia diana es amplificada en reacciones paralelas, conteniendo cada una de ellas una sonda específica a un mutante y una sonda específica para el correspondiente alelo de tipo salvaje.
- 65 **18.-** El ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 16 o 17 en el que las sondas son sondas de baliza molecular.

19.- El ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 16 a 18 el que la amplificación se realiza mediante PCR y la detección es detección en tiempo real.

FIGURA 1A

GAATTCCTAAATTAGCAAAAAAAATTTGTGTGTGCGTGTGAGTTGGTAAAAGAAACGAAAAAAAGCAATT
 TTTACATTTGCTATCTTCAGTTTAAAGGCATTTGATTACCCAATTTGAAATAAGTCCAAAAGATATCCATT
 TAAAACAAACAGTATTTCTGTATTTATCAATTTATCAAAGAATCTAGCATTCATATATAATCAATCTAAC
 TTCCTTGGTGTTTAAGAAATCCTCTACTACTCACAATCTCGAGCAAAATTTTGTGTGTGATCTCAT
 ACGATTTTCAGGTACAATTTTAAAGGAAAAAGTTTGCAATATCTTACATAATTTGGATTGCTGTTTTT
 ATTATAGGGTCAGATTCACATTTCCAGATCTCAATAGAAACCCAGTTTCCCATTAATTTAAGAGATATCAG
 TTTATTTTCGATTACAAATTGAGTTGTCACTACGTTTACATATACTATTATTTCAATTTCCCATCATT
 GCAACAACAAACGAAAAATTAATTCCTGATTTTGCTGTTTTTTTTTGTGAACAAAAAGCACACAACATAC
 ACACAATACATTTAATAACAACAATTTTCAAATAATAATAACTTTTCTTTTCTTTTAATTTCCCCCT
 TCTTTTTTTTTTAAATATTAAAAACCAACACCCAAGTATATACTAACTTATCTTTTTTTTCAAATTAGATG
 TCGTATAACGATAATAATAATCATTATTACGACCCTAATCAACAGGGCGGTATGCCACCTCATCAAGGAGG
 AGAAGGGTATTACCAACAACAGTATGATGATATGGGTCAACAACCACCAACAAGATTATTACGATCCAA
 ATGCTCAATATCAACAACAACCATATGACATGGATGGATATCAAGACCAAGCCAACATATGGTGGTCAACCA
 ATGAATGCCAGGGTTATAATGCTGACCCAGAAGCCTTTTCTGACTTTAGTTATGGTGGTCAAACCTCCTGG
 AACTCCTGGTTATGATCAATACGGTACTCAATACACCCCATCTCAAATGAGTTATGGTGGTGTATCCAAGAT
 CTTCTGGTGTCTCAACACCAATTTATGGTGGTCAAGGTCAAGGTACGATCCAACCTCAATTCATATGTCA
 TCGAATTTGCCATATCCAGCTTGGTCTGCTGATCCTCAAGCTCCAATTAAGATTGAACACATCGAAGATAT
 TTTCAATTGATTTGACTAATAAATTTGGTTTCCAAAGAGATTCTATGAGAAACATGTTTGATTACTTTATGA
 CATTGTTGGACTCGAGATCTTCCCGTATGTCACCACTCAGGCTTGTGAGTTTACATGCTGATTATATT
 GGTGGTGACAATGCCAATATAGAAAATGGTATTTTCTTCAACAAGATTGGATGATTCCTTAGGTTT
 TGCTAATATGACTTTAGGTAAAATTTGGTAGAAAAGCCAGAAAAGCTTCCAAGAAATCCAAAAAGCTAGAA
 AAGCTGCTGAAGAACATGGTCAAGATGTGATGCTCTTGCTAATGAATTAGAAGGTGATTATTCATTGGAA
 GCCGCTGAAATCAGATGGAAAGCCAAGATGAACCTTTGACTCCAGAAGAAAAGAGTAAGAGACCTTGCTCT
 TTATTTGTTGATATGGGGTGAAGCCAATCAAGTTCGTTTTACTCCTGAATGTTTGTGTTACATTTACAAAT
 CTGCCACTGATTATTTAAATCTCCATTGTGTCAACAAGACAAGAACCAGTGCCGTAAGGTGATTACTTG
 AACCGTGTGATCACTCCACTTTACAGATTTCATCAGATCTCAAGTTTATGAAATTTATGATGGAAGATTTGT
 CAAGCGTGAAAAAGACCACAACAAGGTCAATGGTTATGATGATGTCAATCAATTGTTTTGGTACCCAGAAG
 GTATTTCCAGAATTATTTTGAAGATGGAACCAGATTGGTTGATATCCCTCAAGAAGAACGTTTCTTGAAA
 TTAGGTGAAGTTGAATGGAAGAATGTTTTCTTCAAACTTATAAGGAAATCAGAACCCTGGTTGCATTTTCGT
 TACCAATTTAATAGAATCTGGATTATCCATGGTACCATCTACTGGATGTACACTGCTTACAACCTCCCCAA
 CCTTGATATACTAAACATATGTCCAAACCATAAATCAACAACCACCTTGCTTCGTCAAGATGGGCTGCTTGT
 GCCATTGGTGGTGTCTTGCTTCATTTATTCAAATCTTGCCACACTTTTCGAATGGATTTTCGTGCCTAG
 AGAATGGGCCGGTGCTCAACATTTGAGTCGTGATGCTATTTTTGGTGTAAATTTCTTACTCAATTTGG
 TTCCACCAAGTTTATACATTTCAAATTACCAATTTGGTGATTTATTCGAAATCGGCATATGCTGTGTGAT
 GTTGGATTTTTCATGCTGTGGCCACTTTAGTATTTCTTGCCGTCATGCCATTGGGTGGTTTATTCACCTC
 ATACATGAACAAGAGATCAAGAAGATATATTGCATCACAACATTTACTGCCAACTACATTAATTTGAAG
 GTTTAGATATGTGGATGTCTTATTTGTTATGGTTTTTGGTTTTCTTGCCAAATTGGTTGAATCTTATTTT
 TTCTCGACTTTGTCTTTAAGAGATCCTATTAGAACTTGTGACCATGACAATGAGATGTGTTGGTGAAGT
 TTGGTACAAAGATATTGTTTGTAGAAACCAAGCCAAGATTGTCTTGGGGTTGATGTATCTTGTGATTGT
 TATTGTTCTTTTGGATACTTATATGTGGTACATTATTTGTAAGTGTATCTTCTCCATTGGTTCGTTTATTC
 TATTTGGGTATTTCCATTTGACTCCTTTGGAGAAACATTTTACCAGATTGCCAAAGAGAATTTATTCCAA
 GATTTTAGCTACCACGAAATGGAATCAAATATAAACCTAAAGTTTGTATTTACAAATTTGGAATGCCA
 TTGTTATTTCCATGTACAGAGAACATTTGTTAGCCATTGATCAGTTCAAAAATTTATTGTATCATCAAGTT
 CCATCTGAAATGAAGGCAAGAGAACCTTTGAGAGCTCCAACCTTTCTTTGTTTCTCAAGATGACAACAATTT
 TGAAACGGAATTTTCCCAAGAAATCTGAAGCTGAAAGAAGAATTTCAATTTTTCGCTCAATCTTTGGCTA
 CACCAATGCCAGAACCATTACCAGTTGATAATATGCCAACTTTTACTGTTTTCTACTCCTCATTATTCCGAA
 AAGATTTTGTATCTTTGAGAGAAATCATTAGAGAAGATGATCAATTTCTCAAGAGTGACATTATTGGAATA
 TTTGAAACAATTACATCCAGTTGAATGGGATTGTTTTGTTAAGGACACCAAGATTTTGGCTGAAGAACTG
 CTGCTTATGAAATGGTGTATCTGAAAAATTATCTGAAGATGGATTGAAATCCAAGATTGATGATTTA
 CCATTCTATTGTATTGGTTCAAGTCTGCCGCCCTGAATATACTTTAAGAACAAGAATTTGGGCTTCATT
 GAGATCCCAAACCTTTGTACAGAACTGTATCTGGGTTTATGAATTATGCCAGAGCCATTAAATTGTTATACA
 GAGTGGAACCAAGAAATTTGGTTCAATATTTGGTGGTGACCTGAAGGATTAGAATTAGCTTTAGAAAGA
 ATGGCCAGAAGAAAGTTTAGATTTTGGTTTTCTATGCAAGATTGTCTAAATTCAGAGATGATGAAATGGA

FIGURA 1B

AAATGCTGAGTTCTTATTGCGTGCTTACCCTGATTTGCAAATTGCTTACTTGGATGAAGAACCGGCTTTGA
 ATGAGGACGAGGAACCAAGAGTATACTCTGCCTTGATTGATGGTCATTGTGAAATGTTAGAAAATGGTAGA
 CGTCGTCCTAAATTCAGAGTTCAATTGTCTGGTAATCCAATTTTGGGTGATGGTAAATCTGATAATCAAAA
 TCATGCGGTTATTTTCCATAGAGGTGAATATATTCAATTGATTGATGCTAATCAAGATAATTATTTGGAAG
 AATGTTTGAAGATTAGATCAGTTTGGCTGAATTTGAAGAAATGAATGTTGAACATGTTAATCCATATGCA
 CCAAATTTGAAATCTGAAGATAATAACACCAAGAAGGATCCAGTGGCATTTTTGGGTGCTAGAGAATATAT
 TTTCTCAGAAAATCTGGTGTTTTGGGTGATGTTGCTGCTGGTAAAGAACAACCTTTTGGTACATTGTTTG
 CAAGAACTTTGGCACAATTTGGAGGTAAATTCATTATGGTCATCCGGATTTTTTGAATGCTACATTTATG
 TTAAGTAGAGGTGGTGTTTTCTAAAGCACAAAAGGGTTTACATTTGAATGAAGATATTTATGCTGGTATGAA
 TGCCATGATGAGAGGTGGTAAATCAAGCATTGTGAATATTATCAATGTGGTAAAGGTAGAGATTTAGGTT
 TTGGATCCATTTGAATTTCAACCAAGATTGGTGCTGGTATGGGAGAACAAATGCTTTCAAGAGAATAT
 TTCTATTTGGGTACTCAACTTCCATTGGATGATATTTTGTCTATTTACTATGGTCATCCAGGTTTCCATAT
 TAATAACTTGTATTATTCAATTGTCTTTACAAGTGTTTATTTTGGTGTTGGGTAAATGCAATTCAGCTC
 ATGAAGCTATCATGTGTTCTTACAACAAAGATGTCCAGTTACTGATGTTTTGTATCCATTTGGTTGTTAC
 AATATTGCTCCTGCCGTTGATTGGATTAGACGTTATACCTTGTCTATTTTCATTGTTTTCTTCATTTCTTT
 CATTCCATTGGTTGTACAAGAATTGATTGAAAGAGGGGTATGGAAGCGTTCCAAAGATTTGTTAGACATT
 TTATTTCCATGTCACCATTTTTCGAAGTTTTCGTTGCCCAAATTTATTCATCATCGGTTTTCACTGATTTG
 ACCGTTGGTGCTAGATATATTTCCACTGGTAGAGGTTTTGCCACTTCAAGAATTCATTTTCAATCTT
 GTATTCACGTTTTGCTGATTATCCATTTATATGGGAGCAAGATTGATGTTGATTTTATTATTTGGTACAG
 TTTCTCATTGGCAAGCACCATTATTATGGTTCTGGGCTTCATTATCGGCTTTAATGTTCTCCCCATTCTAT
 TTCAATCCTCATCAATTTGCTTGGGAAGACTTTTTCTTGATTACAGAGATTTTATTAGATGGTTATCTAG
 AGGTAACACTAAATGGCACAGAACTCATGGATTGGTTATGTTAGACTTTCTAGATCACGTATCACTGGTT
 TCAAACGTAAGTTGACTGGTGATGTTTCTGAAAAAGCTGCTGGTGATGCTTCAAGAGCTCATAGATCCAAT
 GTTTTGTGTTGCTGATTTCTTACCAACATTGATTTATACTGCTGGTCTTTATGTTGCTTATACTTTTATTAA
 TGCTCAAACCTGGGGTTACTAGTTATCCATATGAAATCAATGGATCTACTGATCCACAACCAGTTAATTCTA
 CTTTGAGACTTATTATTTGTGCTTTAGCTCCAGTTGTTATTGATATGGGATGTTTAGGTGTTTGTCTTGCC
 ATGGCATGTTGTGCTGGTCCAATGTTAGGATTATGTTGTAAAAAGACTGGTGCTGTTATTGCTGGTGTTGC
 CCATGGTGTTGCCGTCATTGTTTCATATTATTTCTTTATTGTTATGTGGGTCACTGAAGGTTTTCAATTTG
 CCAGATTAATGTTGGGTATTGCCACCATGATTTATGTTCAAAGATTATTATTCAAGTTTTTGACATTATGT
 TTCTTGACTAGAGAATTTAAGAATGATAAAGCCAATACTGCTTTCTGGACTGGTAAATGGTATAAATACTGG
 TATGGGATGGATGGCTTTTACTCAACCATCTCGTGAATTTGTTGCTAAAATCATTGAAATGTCGGAATTTG
 CTGGTGATTTCTGTTTTGGCACATATTATATTCTGTCAATTACCATTATTGTTTATTCCATTAGTTGAT
 AGATGGCATTCAATGATGTTATTCTGGTTGAAACCATCAAGATTGATTAGACCACCAATTTATCTTTGAA
 ACAAGCCAGATTAAGAAAGAGAATGGTGAGAAAAATATTGTGTTTTATATTTTGGCGTGTTGATATTATTTA
 TTGTCATTATTGTTGACCAGCAGTTGCTTCGGGACAAATTGCTGTTGATCAATTTGCCAATATTGGTGGA
 TCTGGTTCTATTGCTGATGGATTATTCCAACCAAGAAATGTCAGTAATAATGATACTGGTAATCATAGACC
 AAAAACCTACACTTGGAGTTATTTGAGTACTCGTTTTACTGGAAGTACCACCCTTATTCTACAAATCCAT
 TCAGAGTTTAAGAGTTTAAGAGATTAAGCGGGGGCGGAAGTGGTTTATTCATTTATAATTATTTCAATTA
 TTCATAAATGGT

FIGURA 2

MSYNDNNHHYYDPNQGGMPPHQGGEGYYQQQYDDMGQQPHQDDYYDPNAQYQQQPYDMDGYQDQANYGGQ
 PMNAQGYNADPEAFSDFSYGGQTPGTPGYDQYGTQYTPSQMSYGGDPRSSGASTPIYGGQGGYDPTQFNM
 SSNLPYPAWSADPQAPIKIEHIEDIFIDLTNKFQFQORDSMRNMFDYFMTLLDSRSSRMSPAQALLSLHADY
 IGGDNANYRKWYFSSQQDLDDSLGFANMTLGKIGRKARKASKKSKKARKAAEEHGQDQVDALANELEGDYSL
 EAAEIRWKAKMNSLTPEERVRLALYLLIWGEANQVRFTPECLCYIYKSATDYLNPLCQQRQEPVPEGDY
 LNRVITPLYRFIRSQVYEIYDGRFVKREKDHNVIGYDDVNQLFWYPEGISRIIFEDGTRLVDIPQEERFL
 KLGEVEWKNVFFKTYKEIRTWLHFVTNPNRIWIIHGTYWMYTAYNSPTLYTKHYVQTINQQPLASSRWAA
 CAIGGVLASFQILATLFEWIFVPREWAGAHLSSRRMLFVLIFLLNLVPPVYTFQITKLVIYSKAYAVS
 IVGFFIAVATLVFFAVMPLGGLFTSYMNKRSRRYIASQTFTANYIKLKGLDMWMSYLLWFLVFLAKLVESY
 FFSTLSLRDPIRNLSTMTMRCVGEVWYKDIVCRNQAKIVLGLMYLVDLLLFFLDTYMWYIICNCIFSIGRS
 FYLGISILTPWRNIFTRLPKRIYSKILATTEMEIKYKPKVLISQIWNNAIVISMYREHLLAIDHVQKLLYHQ
 VPSEIEGKRTLRAPTFFVSQDDNNFETEFFPRNSEAERRISFFAQSLATPMPEPLPVDNMPTFTVFTPHYS
 EKILLSLREIIREDDQFSRVTLLEYLKLHPVEWDCFKDTKILAEETAAYENGDDSEKLSGLKSKIDD
 LPFYCIGFKSAAPEYTLRTRIWASLRSQTLRYTVSGFMNYARAIKLLYRVENPELVQYFGGDPEGLELAL
 RMARRKFRFLVSMQRLSKFKDDEMENAEFLRAYPDLQIAYLDEEPALNEDEEPRVYSALIDGHCEMLENG
 RRRPKFRVQLSGNPILGDGKSDNQNHAVIFHRGEYIQLIDANQDNYLEECLKIRSVLAEFEEMNVEHVNPY
 APNLKSEDNNTKKDPVAFLGAREYIFSENSGVLGDVAAGKEQTFGTLPARTLAQIGGKLHYGHPDFLNATF
 MLTRGGVSKAQKGLHLNEDIYAGMNAMMRGKIKHCEYYQCGKGRDLGPGSILNFTTKIGAGMGEQMLSRE
 YFYLGTQLPLDRFLSFYYGHPGFHINNLFIQLSLQVFILVLGNLNSLAHEAIMCSYNKDVPTDVLYPFGC
 YNIAPAVDWIRRYTLSIFIVFFISFIPLVVQELIERGVWKAQRFVRHFIISMSPFFEVEFVAQIYSSSVFTD
 LTVGGARYISTGRGFATSRIPFSILYSRFADSSIYMGARLMLILLFGTVSHWQAPLLWFWASLSALMFSPF
 IFNPHQFAWEDFFLDYRDFIRWLSRGNTKWHRSWIGYVRLSRSRITGFKRKLTDGVSEKAAGDASRAHRS
 NVLFADFLPTLIYTAGLYVAYTFINAQTGVTSYPYEINGSTDPQPVNSTLRLLIICALAPVVIDMGCLGVCL
 AMACCAGPMLGLCCKKTGAVIAGVAHVAVIVHIIFFIVMWVTEGFNFARMLGLIATMIYVQRLLFKFLTL
 CFLTREFKNDKANTAFWTGKMYNTGMGWMAFTQPSREFVAKIEMSEFAGDFVLAHIIILFCQLPLLFIPLV
 DRWHSMMFLWLKPSRLIRPPIYSLKQARLRKRMVRKYCVLYFAVLILFIVIIIVAPAVASQIAVDQFANIG
 GSGSIADGLFQPRNVSNNDTGNHRPKTYTWSYLSLSTRFTGSTTPYSTNPFVR

FIGURA 3

ScFks1p: Phe₆₃₉ Leu Val Leu Ser Leu Arg Asp₆₄₆
CaFKS1p: Phe₆₄₁ Leu Thr Leu Ser Leu Arg Asp₆₄₈

FIGURA 4

Oligonucleótido	Secuencia ^{ab}	5' Modificación	3' Modificación	Objetivo
CAFKS1-F1719	CATTGCTGGGCCACTTTAG	Ninguna	Ninguna	Cebador de secuenciación
CAFKS1-R2212	GATTTCCATTTCCGTGGTAGC	Ninguna	Ninguna	Cebador de secuenciación
HS1SN2	GCCAAATTGGTTGAATCTTA	Ninguna	Ninguna	Cebador de PCR en tiempo real
HS1AN2	GTCATGGTCGACAAGTTTCT	Ninguna	Ninguna	Cebador de PCR en tiempo real
T-WT	AAAAATCTCTTAAAGACAAAGTCAAGAAAAA	Ninguna	Ninguna	Diana de tipo salvaje
T-T1933C	AAAAATCTCTTAAAGGCAAAGTCAAGAAAAA	Ninguna	Ninguna	Diana de la mutación de T1933C
T-C1934A	AAAAATCTCTTAAATACAAAGTCAAGAAGAAAA	Ninguna	Ninguna	Diana de la mutación de C1934A
T-C1934T	AAAAATCTCTTAAAAACAAAGTCAAGAAGAAAA	Ninguna	Ninguna	Diana de la mutación de C1934T
T-T1929A	AAAAATCTCTTAAAGACAATGTCAAGAAAAA	Ninguna	Ninguna	Diana de SNP de T1929A
T-T1929A-T1933C	AAAAATCTCTTAAAGGCAATGTCAAGAAAAA	Ninguna	Ninguna	Diana de la mutaciones de T1929A y T1933C
T-T1929A-C1934A	AAAAATCTCTTAAATACAATGTCAAGAAGAAAA	Ninguna	Ninguna	Diana de la mutaciones de T1929A y C1934A
T-T1929A-C1934T	AAAAATCTCTTAAAAACAATGTCAAGAAGAAAA	Ninguna	Ninguna	Diana de la mutaciones de T1929A y C1934T
HS1-WT	CGCGAGTCTTGACWTTGTCTTTAAGAGATCTCGC G	FAM	Dabcyl	Sonda de tipo salvaje
HS1-T1933C	CGCGAGTCTTGACWTTGCCTTTAAGAGATCTCGC G	HEX	Dabcyl	Sonda de mutación T1933C
HS1-C1934A	CGCGAGCTTCTTGACWTTGTATTTAAGAGATCTCG CG	HEX	Dabcyl	Sonda de mutación C1934A
HS1-C1934T	CGCGAGCTTCTTGACWTTGTTTTAAGAGATCTCG CG	HEX	Dabcyl	Sonda de mutación C1934T

FIGURA 5

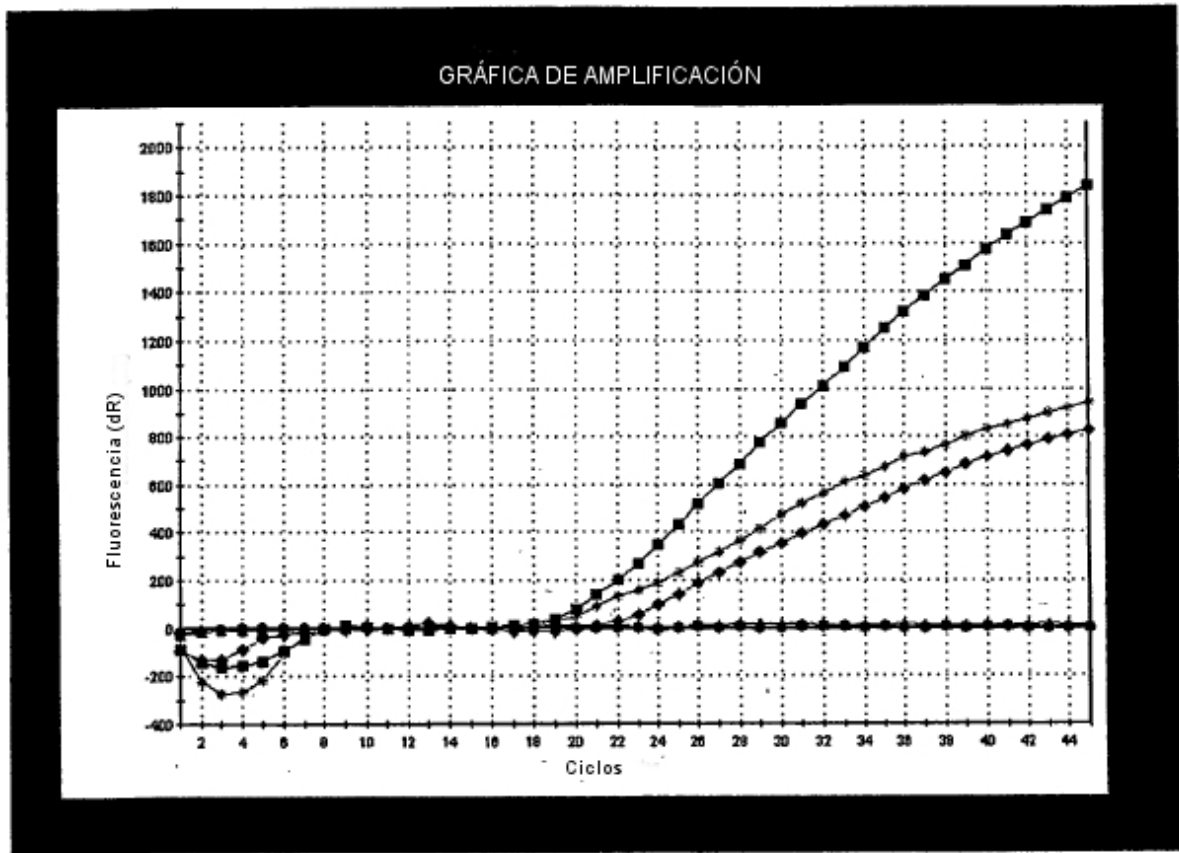


FIGURA 6A

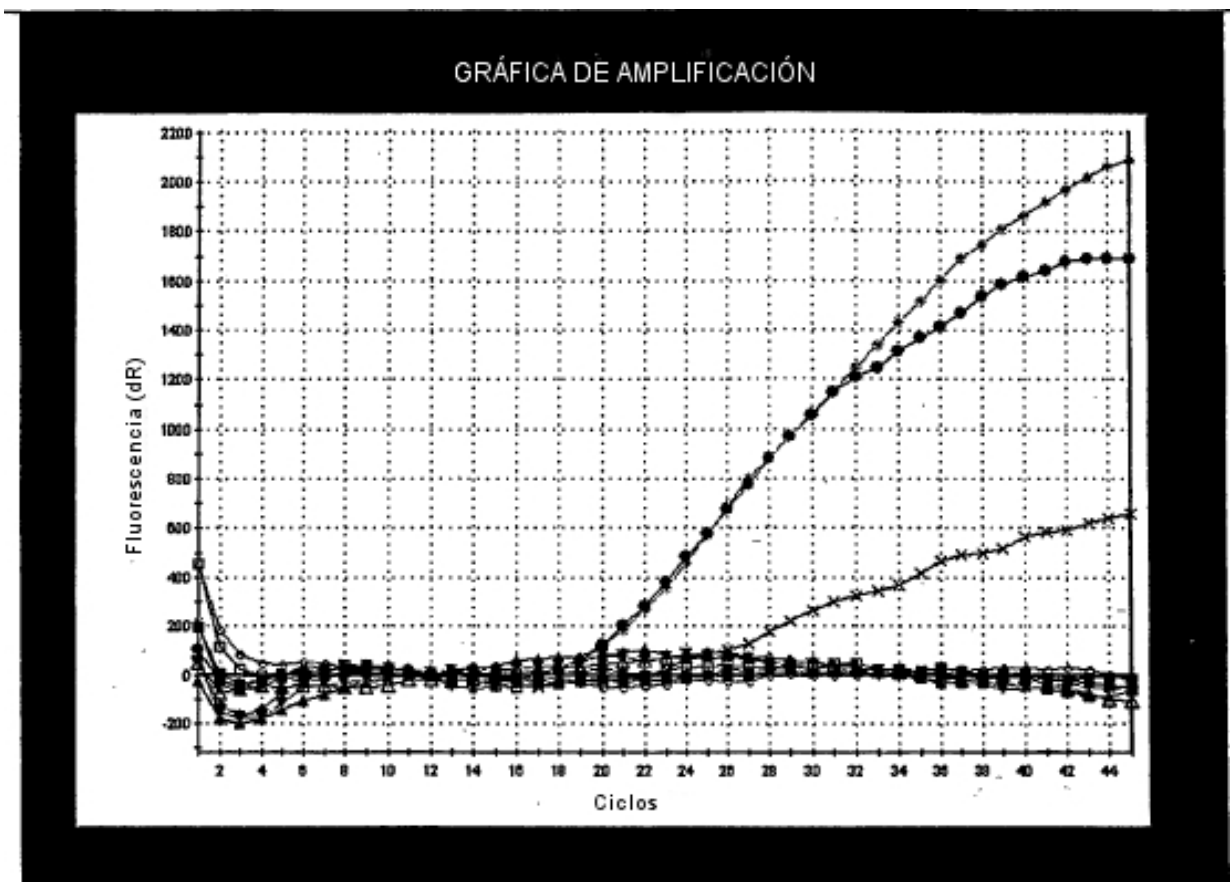


FIGURA 6B

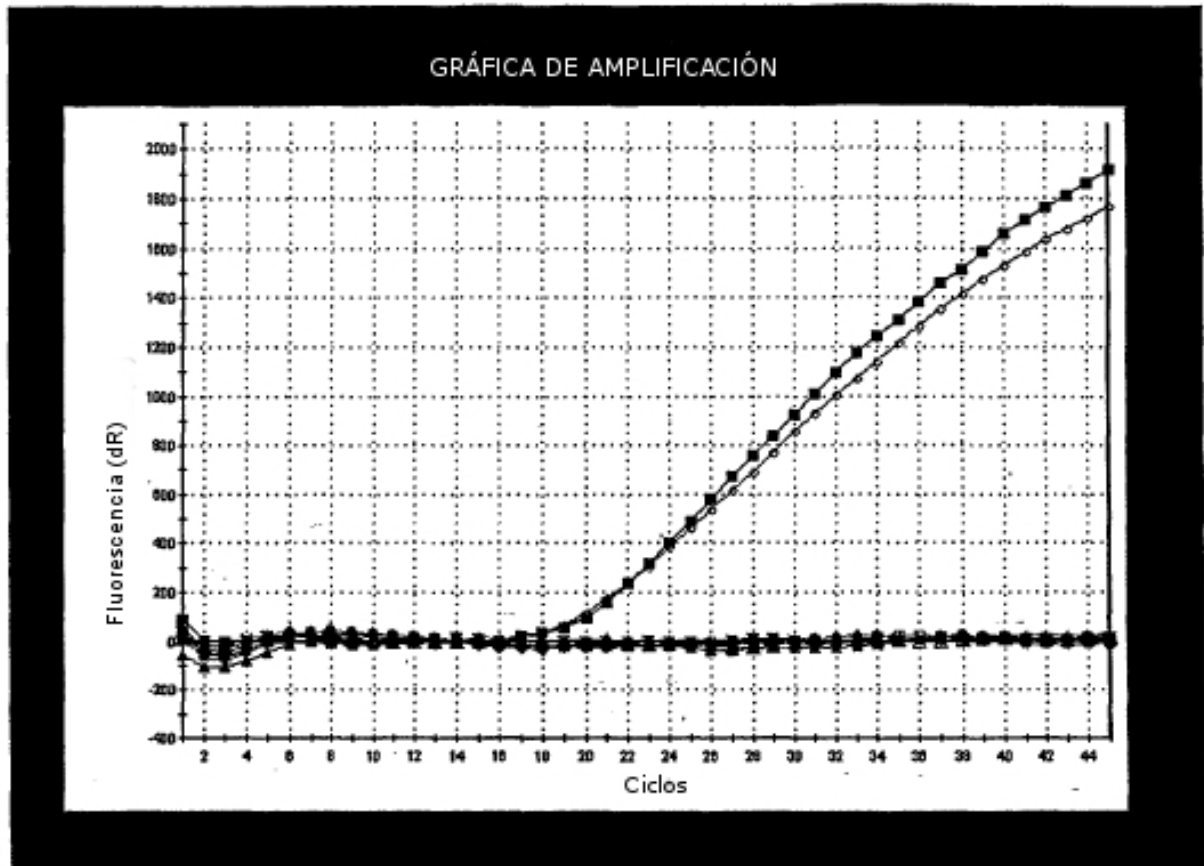


FIGURA 6C

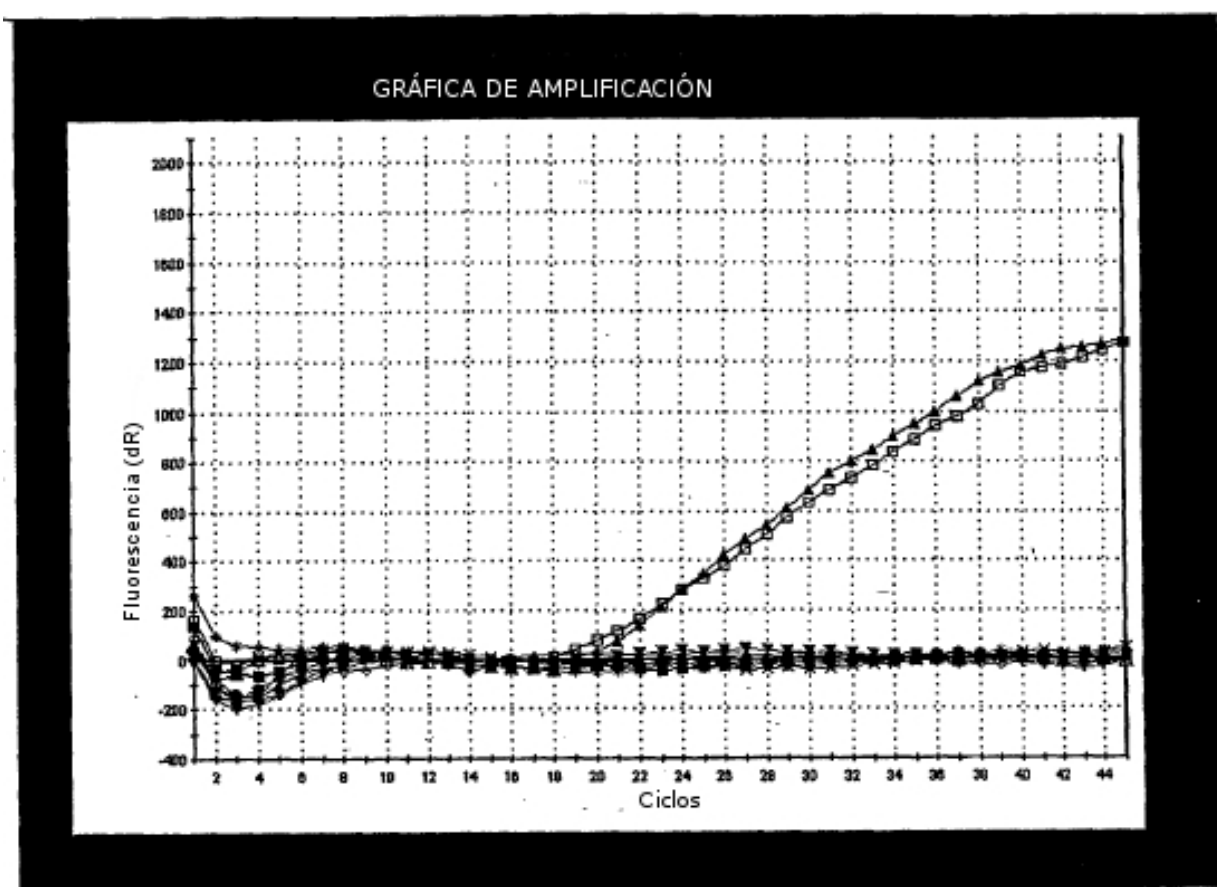


FIGURA 6D

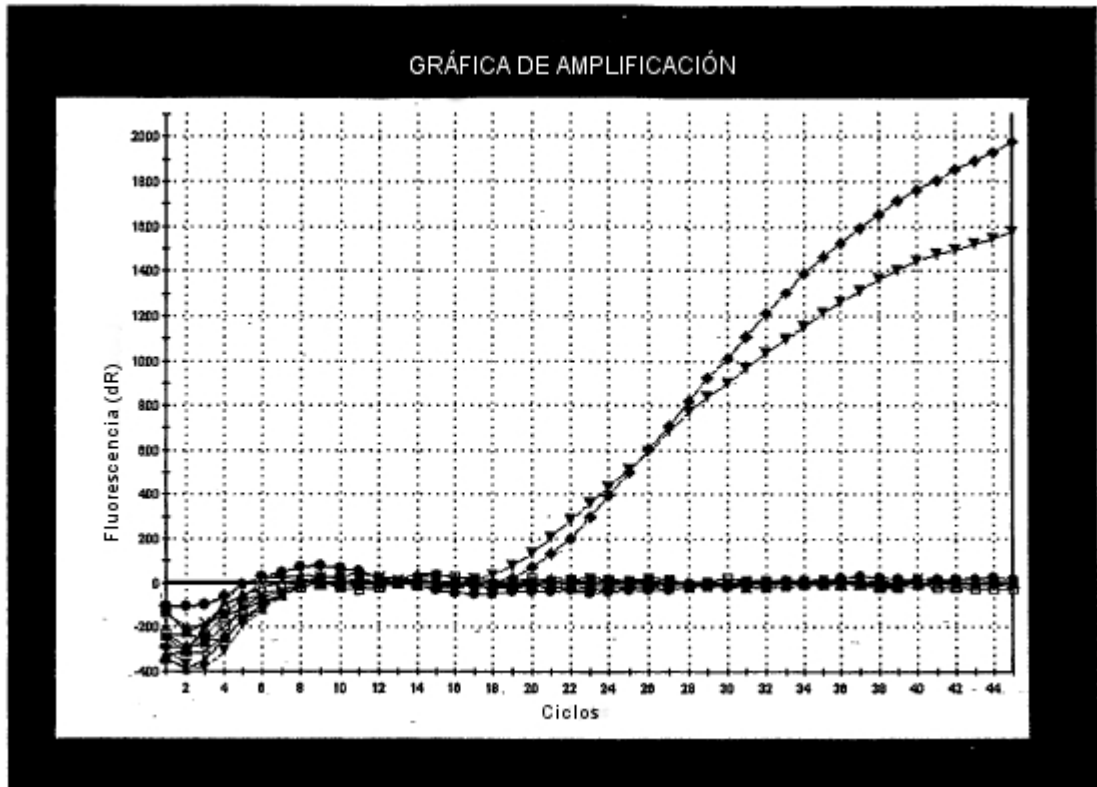


FIGURA 7

HS1-WT



HS1-T2640C
HS1-C2641A
HS1-C2641T