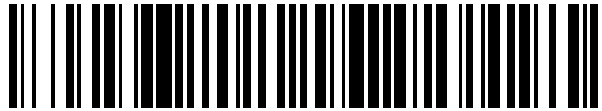


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 225**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2008** **E 12169594 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015** **EP 2505672**

54 Título: **Cebadores de polinucleótidos para detectar mutaciones de PIK3CA**

30 Prioridad:

**28.09.2007 GB 0719034**

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

**25.03.2015**

73 Titular/es:

**QIAGEN MANCHESTER LIMITED (100.0%)  
Skelton House Lloyd Street North  
Manchester M15 6SH, GB**

72 Inventor/es:

**BOARD, RUTH;  
FERGUSON, JENNIFER;  
RAVETTO, PAUL FRANCIS;  
THELWELL, NICOLA y  
WHITCOMBE, DAVID**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 532 225 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**

Cebadores de polinucleótidos para detectar mutaciones de PIK3CA

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un polinucleótido, a un kit que comprende un polinucleótido y a un método para detectar la presencia o la ausencia de mutaciones en un gen.

**Antecedentes de la técnica**

10 Las fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) son una familia grande de quinasas lipídicas implicadas en la señalización celular. La ruta PI3K-AKT se activa en una serie de tipos de tumores, dando como resultado anomalías en el crecimiento, la proliferación y la supervivencia de las células (añadir referencia de 1 revisión reciente). Recientemente, se han identificado mutaciones de la subunidad catalítica de la clase 1A de PI3K (PIK3CA) en cánceres humanos<sup>[1]</sup>. La función concreta de dichas mutaciones en la carcinogénesis aún no ha sido definida con claridad, pero con un desarrollo continuo de una serie de inhibidores de PI3K dirigidos, la detección de mutaciones se hará cada vez más importante para la selección de pacientes. Los retos técnicos en la detección de dichas mutaciones se deben a las limitaciones de las biopsias tumorales, que pueden contener solamente cantidades pequeñas de las secuencias mutadas. Además, el ADN extraído de tejido embebido en parafina a menudo está degradado y es de baja calidad. El nivel mínimo de ADN mutante requerido para la detección por secuenciamiento es de 15-25% y por tanto existe una necesidad acuciante por desarrollar ensayos sensibles capaces de detectar cantidades pequeñas de alelos mutados en una muestra heterogénea y los productos necesarios para llevar a cabo dichos ensayos.

20 La presente invención busca satisfacer esta necesidad.

**Descripción de la invención**

La presente invención proporciona ensayos sensibles y robustos para mutaciones de PIK3CA portadas por tumores.

En la presente memoria se describe:

25 Un método de PCR para detectar la presencia o la ausencia de una mutación en el gen PIK3CA que comprende las etapas de:

a) mezclar una muestra de ácido nucleico que comprende al menos un fragmento del gen PIK3CA con una secuencia de polinucleótido cebador que consiste en la SEQ ID NO. 5, donde el polinucleótido se usa como cebador y el segundo cebador corresponde a una región del fragmento de la secuencia de PIK3CA por debajo de la región a la cual el polinucleótido es complementario, y llevar a cabo una PCR con la mezcla; y

30 b) detectar la hibridación del polinucleótido con la muestra de ácido nucleico, donde la hibridación indica la presencia de una mutación.

Preferiblemente, el segundo cebador tiene una secuencia de acuerdo a la SEQ ID NO. 18.

La invención también se refiere a un polinucleótido con una secuencia que consiste en la SEQ ID NO.5

35 Preferiblemente, el método comprende además la etapa de, previamente a la etapa a), amplificar el número de copias del fragmento del gen PIK3CA empleando amplificación de ácido nucleico por ciclado térmico, preferiblemente PCR.

De forma ventajosa, la etapa b) comprende llevar a cabo una polimerización de ADN usando el polinucleótido como primer cebador y detectando el producto de extensión de la polimerización.

40 De forma conveniente, la etapa b) comprende la etapa de mezclar la muestra de ácido nucleico y el polinucleótido con un segundo cebador que se corresponde con una región del fragmento de la secuencia de PIK3CA por debajo de la región respecto a la cual el polinucleótido es complementario, y llevar a cabo una PCR de la mezcla.

Preferiblemente, el segundo cebador es la SEQ ID NO. 18.

45 Alternativamente, el método comprende además la etapa de llevar a cabo una PCR de la muestra usando cebadores de control y comparando la amplificación del gen PIK3CA con la amplificación usando el polinucleótido y el segundo cebador.

De forma ventajosa, los cebadores de control comprenden las SEQ ID NO. 37 y 39.

De forma conveniente, el polinucleótido comprende un grupo apagador y un grupo fluoróforo y en el que la etapa b) comprende exponer la mezcla a la luz de una longitud de onda a la cual responde el fluoróforo en ausencia del

grupo apagador, y detectar luz en la longitud de onda emitida por el grupo fluoróforo en ausencia del grupo apagador.

Se prefiere que el gen PIK3CA se la secuencia disponible en el GenBank con el nº de acceso NM\_006218 versión nº NM\_006218.2 GI:54792081.

- 5 En esta especificación, "ARMS" es el sistema de mutación refractario de amplificación descrito, por ejemplo, en el documento EP-A-0332435.

Cuando se hace referencia en dicha especificación a un porcentaje de un polinucleótido comparado con un polinucleótido de referencia, éste puede determinarse mediante algoritmos conocidos en la técnica.

- 10 Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar usando el algoritmo BLASTP versión 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402) usando los parámetros por defecto.

### Breve descripción de las figuras

- 15 Figura 1: muestra los resultados obtenidos al llevar a cabo detección y secuenciamiento *Scorpions* en muestras que contienen el gen PIK3CA mutante.

### Descripción detallada

Las realizaciones de la presente invención proporcionan polinucleótidos cebadores que pueden usarse en ensayos para la detección de mutaciones del gen PIK3CA en una muestra que contenga ácidos nucleicos.

- 20 En realizaciones específicas, los polinucleótidos cebadores son cebadores directos e inversos que se hibridan con el gen PIK3CA para facilitar que se produzca una reacción de amplificación de PCR. Así, el cebador directo se hibrida en por encima (en dirección 3') y en la cadena opuesta al cebador inverso, y los cebadores directo e inverso definen conjuntamente una secuencia de ampliación que es amplificada durante la PCR. La secuencia del cebador directo se selecciona de tal modo que no sea complementaria a la secuencia natural, pero que sea capaz de hibridarse con una secuencia de PIK3CA mutante.

- 25 A fin de detectar la presencia del gen PIK3CA mutante en la muestra, los cebadores se mezclan con la muestra. Entonces se añaden los agentes necesarios para la PCR (los trifosfatos de nucleótido apropiados, la enzima de ADN polimerasa y la disolución tamponante) a la muestra y se lleva a cabo la PCR. Si la muestra contiene la secuencia mutante con la cual el cebador directo es capaz de hibridarse, entonces el amplicón es ampliado durante la PCR quedando así indicada la presencia de la secuencia mutante en la muestra. Si la muestra no contiene la secuencia mutante, entonces el cebador directo se une a la secuencia PIK3CA con una baja eficacia y por tanto no hay apenas amplificación, si es que la hay, de la secuencia de amplicón.
- 30

- A fin de detectar la mutación E542K, la secuencia de cebador directo es la SEQ ID NO . 5. Para detectar la presencia de los amplicones formados en la muestra, el cebador inverso es un cebador denominado "Scorpions" en las realizaciones de la presente invención. Los detalles de los cebadores *Scorpions* se incluyen en el documento WO-A-991066071. Un cebador "Scorpions" comprende una secuencia de cebador complementaria a una primera secuencia diana de un gen (en esta invención el PIK3CA) y una secuencia de cola comprende una secuencia sonda flanqueada por dos secuencias mutuamente complementarias. Se proporciona un resto bloqueante de ADN polimerasa (tal como un monómero de hexetilen glicol (HEG)) entre la secuencia de cebador y la secuencia de cola. Se proporciona un grupo fluoróforo en un extremo de la secuencia de cola y se proporciona un grupo apagador en el otro extremo de la secuencia de cola. Durante el uso, la secuencia de cebador del cebador *Scorpions* actúa como un cebador inverso durante la PCR de la manera normal y por tanto el cebador *Scorpions* completo, que incluye la secuencia de cola, acaba incorporada en todos los amplicones. El resto bloqueante de ADN polimerasa evita la duplicación de la secuencia de cola. De este modo, las secuencias mutuamente complementarias de la secuencia de cola tienen tendencia a hibridarse una con la otra, poniendo en contacto el grupo fluoróforo y el grupo apagador y evitando la emisión del grupo fluoróforo. Sin embargo, si el amplicón contiene una segunda secuencia diana complementaria a la secuencia sonda, la secuencia sonda se une preferentemente a la segunda secuencia diana, separando las secuencias mutuamente complementarias. Esto da como resultado que el grupo fluoróforo y el grupo apagador queden distanciados espacialmente, de tal modo que el grupo fluoróforo emite luz de una longitud de onda en respuesta a luz incidente de otra longitud de onda. Por consiguiente, el cebador *Scorpions* permite una detección fácil de amplicones y además evita falsos positivos (provocados por dímeros de cebador, por ejemplo) debido a que sólo se genera señal cuando el amplicón contiene la segunda secuencia diana.
- 35
- 40
- 45
- 50

- 55 El grupo fluoróforo puede ser Hex (4,7,2',4',5',7'-hexacloro-(3',6'-dipivaloilfluoresceinil)-6-carboxamidahexil-1-O-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita), Fam ([3',6'-dipivaloilfluoresceinil)-6-carboxamidohehil]-1-O-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita) o Rox (5,6,-Carboxi-X-Rodamina). El grupo apagador puede ser Dabcyl (5-dimetoxitritiloxi-5-[(N-4'-carboxi-4-(dimetilamino)-azobenceno)-aminohexil-3-acrilimido]-2'-desoxi-uridina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita]).

En realizaciones de la presente invención, se proporciona un cebador *Scorpions* para la detección de la mutación E542K en donde la secuencia del cebador es SEQ ID NO. 18 y la secuencia de sonda sea la SEQ ID NO. 17.

Sin embargo, cabe destacar que el uso de cebadores *Scorpions* no es esencial para la invención, ya que se pueden emplear otros métodos para detectar la síntesis de amplicones, tales como la detección de producto de TaqMan™, tal como se describe en los números de patente US-A-5487972 y US-A-5210015

En algunas realizaciones, también se lleva a cabo un ensayo de control para detectar la concentración global del gen PIK3CA en la muestra. Esto se logra llevando a cabo una reacción PCR separada con cebadores directos e inversos de control que definen un amplicón en otra región del gen PIK3CA. Se prefiere que el cebador directo sea la SEQ ID NO. 37 y que el cebador inverso sea un cebador *Scorpions* en el que la secuencia de cebador sea la SEQ ID NO. 39 y la secuencia de sonda sea la SEQ ID NO. 38. El número de ciclos de PCR requeridos para generar un número umbral de amplicones de control se compara a continuación con el número de ciclos de PCR requerido para generar el número umbral de amplicones que contienen la secuencia mutante a fin de determinar la proporción de copias de mutante del gen de PIK3CA en la muestra. Dichos ensayos de control generalmente se llevan a cabo de forma separada de los ensayos de evaluación.

Los ensayos de PCR preferiblemente se llevan a cabo como ensayos de PCR en tiempo real múltiplex.

La muestra evaluada de ácido nucleico convencionalmente es una muestra de sangre, heces, esputo, lavado colónico, lavado bronquial o de otro fluido corporal, o tejido obtenido de un individuo. De forma conveniente el individuo es humano, preferiblemente *Homo sapiens*. Cabe destacar que la muestra evaluada puede ser igualmente una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la secuencia de la muestra evaluada. Esto quiere decir que una parte o la totalidad de la región del ácido nucleico de la muestra puede ser amplificada en primer lugar usando cualquier técnica conveniente tal como la amplificación de ácidos nucleicos por ciclado térmico, en particular PCR, o amplificación de genoma completo (WGA, del inglés "whole genome amplification") antes de ser usado en el método de la invención.

Se puede usar cualquier enzima conveniente para la polimerización, siempre que no afecte a la capacidad de la ADN polimerasa para discriminar entre secuencias normales y de plantilla mutante en cualquier extensión significativa. Los ejemplos de enzimas convenientes incluyen enzimas termoestables que no tienen una actividad de 3'-5' exonucleasa significativa, por ejemplo ADN polimerasa Taq, particularmente ADN polimerasa "Ampli Taq Gold"™ (PE Applied Biosystems), fragmento Stoffel, u otras modificaciones de eliminación N-terminal apropiada de ADN polimerasa Taq o Tth (*Thermus thermophilus*).

En otras realizaciones adicionales de la presente invención, se proporcionan kits que comprenden uno o más polinucleótidos de la invención y los trifosfatos de nucleótido, la enzima de ADN polimerasa y la disolución tamponante requerida para llevar a cabo una reacción de PCR. Los kits preferidos comprenden cebadores directos e inversos para la detección de una mutación específica y cebadores directos e inversos de control.

## EJEMPLOS

### Materiales y métodos

Se diseñaron cebadores contra las 4 mutaciones más comunes del gen PIK3CA (Número de Acceso: NM\_006218). Se diseñaron cebadores ARMS para detectar 2 mutaciones en el exón 20: H1047R y H1047L; y 2 mutaciones en el exón 9: E452K y E454K. Se diseñó un cebador de control para ADNc de la posición 2450 del gen PIK3CA.

También se diseñaron los *Scorpions*. Para permitir el multiplexado de una serie de ensayos de cada reacción, los tres cebadores *Scorpions* fueron marcados con diferentes fluoróforos.

### Diseños de cebador

Se diseñó una serie de cebadores ARMS específicos para cada región diana. La región diana para las mutaciones E542K y E545K se muestra a continuación como las SEQ ID NO. 1 y 2 respectivamente (las bases mutantes se muestran entre corchetes con la variante normal en primer lugar). Los cebadores directos para las mutaciones también se muestran a continuación (SEQ ID NOS. 3 a 16). Para potenciar la especificidad de dichas reacciones, se usaron discordancias de cebador adicionales cercanas al extremo 3' (mostradas subrayadas en las secuencias de cebador). Se usaron los cebadores óptimos (E542K-2 y E545K-4) para los experimentos descritos. El cebador *Scorpions* utilizable con las secuencias de cebador se muestra como las SEQ ID NO. 17 y 18. Las regiones de correspondencia entre el cebador *Scorpions* y las regiones diana se muestran subrayadas o destacadas de forma idéntica.

Región de exón 9

AACAGAGAATCTCCATTTTAGCACTTACCTGTGACTCCATAGAAAATCTTTCTCC  
TGCTCAGTGATTT(C/T)AGAGAGAGGATCTCGGTAGAAAATTGCTTTGAGCTGTT  
CTTTGTGATTTCCGTTAATTCATTC STCTCTAGCTAGTCTGTTACTCTGTAAAATA  
 AAATAATATCTTATATA (SEQ ID NO. 1)

AACAGAGAATCTCCATTTTAGCACTTACCTGTGACTCCATAGAAAATCTTTCTCC  
TGCT(C/T)AGTGATTTAGAGAGAGGATCTCGGTAGAAAATTGCTTTGAGCTGTT  
CTTTGTGATTTCCGTTAATTCATTC STCTCTAGCTAGTCTGTTACTCTGTAAAATA  
 AAATAATATCTTATATA (SEQ ID NO. 2)

Mutación	Secuencia de cebador	SEQ. ID. NO.
E542K-0	5'-CTTTCTCCTGCTCAGTGATTTT-3'	3
E542K-1	5'-CTTTCTCCTGCTCAGTGATTAT-3'	4
E542K-2	5'-CTTTCTCCTGCTCAGTGATTCT-3'	5
E542K-3	5'-CTTTCTCCTGCTCAGTGATTGT-3'	6
E542K-4	5'-CTTTCTCCTGCTCAGTGATATT-3'	7
E542K-5	5'-CTTTCTCCTGCTCAGTGATCTT-3'	8
E542K-6	5'-CTTTCTCCTGCTCAGTGATGTT-3'	9
E545K-0	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCTT-3'	10
E545K-1	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCAT-3'	11
E545K-2	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCCT-3'	12
E545K-3	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCGT-3'	13
E545K-4	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGATT-3'	14
E545K-5	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGGTT-3'	15
E545K-6	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGTTT-3'	16
Scorpion de exón 9	Hex-CGCGCTCGTGTAGAAATTGCTTTGAGCGCG-que-heg-CAATGAATTAAGGGAAAATGACA	17 y 18

**Región de exón 20**

La región diana para las mutaciones H1047R y N1047L se muestra a continuación como la SEQ ID NO. 19 (las bases mutantes se muestran entre corchetes con la variante normal en primer lugar). Los cebadores directos para las mutaciones también se muestran a continuación (SEQ ID NOS. 20 a 33). Para potenciar la especificidad de dichas reacciones, se usaron discordancias de cebador adicionales cercanas al extremo 3' (mostradas subrayadas en las secuencias de cebador). Se usaron los cebadores óptimos (H1047R-1 y H1047L-1) para los experimentos descritos. El cebador *Scorpions* utilizable con las secuencias de cebador se muestra como las SEQ ID NO. 34 y 35. Las regiones de correspondencia entre el cebador *Scorpions* y las regiones diana se muestran subrayadas o destacadas de forma idéntica.

5

AGTGCAGTGTGGAATCCAGAGTGAGCTTTCATTTTCTCAGTTATCTTTTCAGTTC  
AATGCATGCTGTTTAATTGTGTGGAAGATCCAATCCATTTTGTGTCAGCCAC  
CATGATT/C/AGTGCATCATTCAATTTGTTTCATGAAATACTCCAAAGCCTCTGCTC  
AGTTTATCTAAGGCTAGGCTCTTTTTCGAATGTATGCAATGTCATCAAAGATTGT  
AGTTCTGGCATTCCAGAGCCAAGCATCATTGAGAAAAGATTTATGAAGAGATTG  
GCATGCTGTGCAATAGCTAGATAAGCCTT (SEQ ID NO. 19)

10

Mutación	Secuencia de cebador	SEQ. ID. NO.
H1047R-0	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGAC-3'	20
H1047R-1	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGCC-3'	21
H1047R-2	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGGC-3'	22
H1047R-3	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGTC-3'	23
H1047R-4	5'-TGTTGTCCAGCCACCATAAC-3'	24
H1047R-5	5'-TGTTGTCCAGCCACCATCAC-3'	25
H1047R-6	5'-TGTTGTCCAGCCACCATTAC-3'	26
H1047L-0	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGAA-3'	27
H1047L-1	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGCA-3'	28
H1047L-2	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGGA-3'	29
H1047L-3	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGTA-3'	30
H1047L-4	5'-TGTTGTCCAGCCACCATAAA-3'	31
H104TL-5	5'-TGTTGTCCAGCCACCATCAA-3'	32
H1047L-6	5'-TGTTGTCCAGCCACCATTAA-3'	33
<i>Scorpion</i> exón 20	de Fam-CGCGGCATGAAATACTCCAAAGCCGCG-que-heg-CCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGCA	34 y 35

### Cebadores de control

A continuación se muestran los cebadores de control. Las regiones de correspondencia entre el cebador *Scorpions* y las regiones diana se muestran subrayadas o destacadas de forma idéntica.

AGGCTTGAAGAGTGTCCAATTATGTCCTCTGCAAAAAGGCCACTGTGGTTGAAT  
TGGGAGAACCCAGACATCATGTGAGAGTTACTGTTTCAGAACAATGAGATCATC  
TTAAAAATGGGGATGG (SEQ ID NO. 36)

Mutación	Secuencia de cebador	SEQ. ID. NO.
Cebador de control	5'-AGATGATCTCATTGTTCTGAAACAG-3'	37
<i>Scorpion</i> de control	Rox-CCGGCCAATTCAACCACAGTGGCCGG-que-heg-GGCTTGAAGAGTGTGTCGAATTA	38 y 39

5

Todos los cebadores fueron sintetizados y suministrados por Invitrogen. El tampón de PCR, la Taq y el magnesio fueron suministrados por Eurogentec y los dNTPS fueron adquiridos a Abgene Ltd. Los *Scorpions* fueron suministrados y sintetizados por ATDBio.

10 Los ensayos fueron multiplexados en 2 reacciones que contenían un ensayo de control y 2 ensayos ARMS (1 x exón 9 y 1 x exón 20). Los ensayos fueron llevados a cabo en un volumen de reacción de 25 µL que contenía 1 x tampón de PCR, 4,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de mezcla de dNTPs, 0,25 µM de cada uno de los cebadores (cebador de control y 2 cebadores ARMS) y 0,25 µM de cada *Scorpion* (*Scorpion* de control (SEQ ID NO. 38 y 39), *Scorpion* de exón 20 (SEQ ID NO. 34 y 35) y *Scorpion* de exón 9 (SEQ ID NO. 17 y 18)). Se añadieron 2,5 µL de plantilla de ADN a cada reacción. Los cebadores H1047R y E542K fueron multiplexados con 2,5 unidades de polimerasa Taq por reacción. Los cebadores H1047L y E545K fueron multiplexados con 3,0 unidades de polimerasa Taq por reacción. El cebador E542K usado fue el E542K-2 (SEQ ID NO. 5). El cebador E545K usado fue el E545K-4 (SEQ ID NO. 14). El cebador H1047R usado fue el H1047R-1 (SEQ ID NO. 21). El cebador H1047L usado fue el H1047L-1 (SEQ ID NO. 28).

20 En todos los casos las reacciones fueron amplificadas en un Stratagene Mx3000P en las condiciones siguientes: 95°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 90°C durante 30 segundos y 60°C durante 1 minuto.

25 Las casetes de ADN que albergan mutaciones puntuales que se emplean como controles positivos fueron construidas en base a un método descrito por Higuchi et al.<sup>[2]</sup>. Resumidamente, se usaron cebadores exteriores y mutámeros correspondientes para generar medias casetes con extremos complementarios, conteniendo cada media casete una base mutante. Dichos productos de PCR fueron mezclados y amplificados con cebadores anidados interiores. El auto-cebado de las medias casetes complementarias y la amplificación posterior crearon un producto final con una base mutada. Los productos fueron secuenciados para asegurar que se había creado la secuencia correcta. Este proceso se repitió para cada mutación de interés. La casete de ADN se mezcló con una cantidad igual de ADN genómico para crear un control 100% positivo.

### Ejemplo 1

30 Para determinar la especificidad de las reacciones y los cebadores se llevó a cabo cada ensayo con 5-50 ng de ADN genómico por reacción para determinar la señal de rotura producida por la extensión de cebador no coincidente. Para cada reacción se definió un valor  $\Delta Ct$  ( $Ct$  de control -  $Ct$  de mutación) ( $Ct$  = ciclo umbral, del inglés "threshold cycle"). Las reacciones se llevaron a cabo seis veces para cada concentración de ADN y se repitieron por triplicado en momentos diferentes para definir un valor de  $\Delta Ct$  de corte por debajo del cual se puede decir que cualquier amplificación es debida a la presencia de secuencia mutante y que no es debida a una señal de rotura. Se determinó que el valor de  $\Delta Ct$  de corte era 1  $Ct$  inferior al menor valor de  $\Delta Ct$  observado en todas las reacciones de cada ensayo. Para los ensayos de H1047R y H1047L, se definió el corte de  $\Delta Ct$  como 12, para el ensayo de E542K el valor de corte de  $\Delta Ct$  fue de 9 y para el ensayo de E545K el corte de  $\Delta Ct$  fue 8.

### Ejemplo 2

40 Para determinar la sensibilidad del ensayo, se diluyeron 5 copias de ADN mutante en concentraciones variables de ADN genómico para producir concentraciones finales de 5, 2, 1, 0,5 y 0,1 % de ADN mutante respecto al natural. La Tabla 1 ilustra la sensibilidad de los 4 ensayos ARMS. La tabla muestra los valores de  $\Delta Ct$  para concentraciones reducidas de ADN mutante dentro de un fondo de ADN natural. Los  $\Delta Ct$ s de corte predefinidos se ilustran en la columna final. Los ensayos de exón 20 fueron capaces de detectar 5 copias de ADN mutante cuando éstas

constituían únicamente un 0,1% del ADN total (dentro del  $\Delta Ct$  de corte definido previamente). Los ensayos de exón 9 fueron capaces de detectar 5 copias de ADN a una concentración del 1% con un  $\Delta Ct$  dentro de los valores de corte predefinidos (Tabla 1).

Tabla 1:

ADN MUT /reacción (copias)	ADN MUT /reacción (copias)	% relativo de alelos MUT	ACT				$\Delta Ct$ de CORTE	
			H1047L	H1047R	E542K	E545K		
100	5	5%	5,9	4,3	5,1	5,8		
250	5	2%	7,2	6,7	7,2	6,4	H1047L	12
500	5	1%	8,3	7,6	8,4	7,0	H1047R	12
1000	5	0,5%	9,3	9,0	10,2	8,1	E542K	9
5,000	5	0,1%	11,5	10,5	12,1	10,1	E545K	8

5

### Ejemplo 3

Las mezclas de líneas celulares que contiene la mutación H1047R (HCT-116) y la E545K (MCF-7) se usaron para comparar las sensibilidades relativas de los ensayos ARMS en comparación con el secuenciamiento. Ambas líneas celulares eran heterocigotas para la mutación. El secuenciamiento se llevó a cabo usando los cebadores y las condiciones de ciclos de PCR descritas por Samuels et al<sup>[1]</sup>. Los ensayos de ARMS y el secuenciamiento se llevaron a cabo en concentraciones del gen mutante de 100%, 50%, 30%, 10% y 1% de la mezcla total. Los resultados se muestran en la Figura 1 en la que los resultados bajo el título "Scorpions" muestran el aumento del número de copias de amplicón tras rondas sucesivas de PCR (los resultados obtenidos usando cebadores de control y cebadores mutantes se muestran como líneas separadas). Bajo el título de "Secuenciamiento de ADN" se muestran los resultados del secuenciamiento de la cadena inversa del gen de la mezcla. El secuenciamiento no fue capaz de detectar la presencia de mutante H1047R cuando estaba presente en menos del 50% de la mezcla total, y fue incapaz de detectar la presencia del mutante E545K cuando estaba presente en menos del 30% de la mezcla total. Los ensayos que usan los cebadores de la invención, por el contrario, fueron capaces de detectar la presencia de mutantes en una concentración del 1%.

10

15

### Ejemplo 4

Este ensayo se aplicó a ADN extraído de tejido congelado fresco procedente de una variedad de tipos tumorales que fueron evaluados para determinar la presencia de mutaciones PIK3CA usando el ensayo ARMS/Scorpion. En total se disponía de ADN de 279 muestras de tumores. El ensayo evidenció mutaciones en 5 de 49 (10,2%) de las muestras de cáncer colorrectal, en 19 de 49 (38,7%) de las muestras de cáncer de mama, en 1 de 51 (1,9%) de las muestras de cáncer de pulmón, y en 1 de 34 (2,9%) de las muestras de melanoma. No se detectaron mutaciones en 50 muestras de cáncer de próstata ni en 46 muestras de cáncer de ovario. De las muestras colorrectales positivas para mutaciones de PIK3CA, 3 fueron H1047R, 1 fue H1047L y 1 fue E542K; de las muestras de cáncer de mama positivas para PIK3CA, 15 fueron H1047R, 1 fue H1047L y 3 fueron E545K; tanto las mutaciones en muestras de cáncer de pulmón como de melanoma positivas para mutaciones PIK3CA fueron H1047R. El secuenciamiento solo identificó 14 del total de 26 (53%) de mutaciones detectadas. El secuenciamiento detectó una mutación en un espécimen de cáncer de mama que el ensayo ARMS no estaba diseñado para detectar (c.1634 A>G; p E545G). Ésta no es una mutación nueva y ha sido descrita previamente en cánceres de mama y colorrectales<sup>[3-5]</sup>.

25

30

La incidencia de mutaciones PIK3CA en las muestras analizadas fue consistente con los estudios previos, excepto para el cáncer de ovario<sup>[1,3,-9]</sup>. Las mutaciones PIK3CA han sido descritas previamente en cánceres de ovario pero se ha sugerido que puede haber una asociación con cánceres de células endometrioides y claras<sup>[8,10]</sup>. Todos los cánceres de ovario evaluados en este estudio fueron adenocarcinomas serosos, lo que puede explicar la ausencia de mutaciones PIK3CA.

35

El ensayo ARMS identificó significativamente más mutaciones en las muestras clínicas que las observadas mediante secuenciamiento directo. Las mezclas de líneas celulares confirman que este ensayo es más sensible que la secuenciación en la detección de las mutaciones de PIK3CA de interés, es probable que la heterogeneidad de las

40



5 muestras clínicas que contienen tanto el tumor como el tejido normal darán lugar a que en algunos casos la incidencia de la mutación esté por debajo de lo detectable por métodos de secuenciación y como tal el ensayo de ARMS es más adecuado para aplicaciones clínicas. La desventaja es que solo se detectan determinadas mutaciones específicas de ARMS. Sin embargo, en esta serie de 279 muestras solo se detectó una única mutación en el exón 9 ó 20 del gen PI3KCA para cuya detección el ensayo ARMS no estaba diseñado.

En resumen, los ejemplos demuestran que la presente invención proporciona un ensayo sensible de alta capacidad para la detección de las 4 mutaciones más comunes del gen PIK3CA. Dicho ensayo puede aplicarse a cantidades pequeñas de ADN y puede detectar niveles bajos de PIK3CA mutante en una muestra.

**Texto libre de listado de secuencias**

- <210> 1
- <223> Región diana de E542K
- <210> 2
- 5 <223> Región diana de E645K
- <210> 3
- <223> Cebador directo de E542K-0
- <210> 4
- <223> Cebador directo de E542K-1
- 10 <210> 5
- <223> Cebador directo de E542K-2
- <210> 6
- <223> Cebador directo de E542K-3
- <210> 7
- 15 <223> Cebador directo de E542K-4
- <210> 8
- <223> Cebador directo de E542K-5
- <210> 9
- <223> Cebador directo de E542K-6
- 20 <210> 10
- <223> Cebador directo de E545K-0
- <210> 11
- <223> Cebador directo de E545K-1
- <210> 12
- 25 <223> Cebador directo de E545K-2
- <210> 13
- <223> Cebador directo E545K-3
- <210> 14
- <223> Cebador directo de E454K-4
- 30 <210> 15
- <223> Cebador directo de E545K-5
- <210> 16
- <223> Cebador directo de E545K-6
- <210> 17
- 35 <223> Exón 9 Scorpion
- <210> 18
- <213> Exón 9 Scorpion2

- <210> 19
- <223> Regiones diana de H1047R y H1047L
- <210> 20
- <223> Cebador directo H1047R-0
- 5 <210> 21
- <223> Cebador directo H1047R-1
- <210> 22
- <223> Cebador directo H1047R-2
- <210> 23
- 10 <223> Cebador directo H1047R-3
- <210> 24
- <223> Cebador directo H1047R-4
- <210> 25
- <223> Cebador directo H1047R-5
- 15 <210> 26
- <223> Cebador directo H1047R-6
- <210> 27
- <223> Cebador directo de H1047L-0
- <210> 28
- 20 <223> Cebador directo de H1047L-1
- <210> 29
- <223> Cebador directo de H1047L-3
- <210> 30
- <223> Cebador directo de H1047-3
- 25 <210> 31
- <223> Cebador directo de H1047L-4
- <210> 32
- <223> Cebador directo de H1047L-5
- <210> 33
- 30 <223> Cebador directo de H1047L-6
- <210> 34
- <223> Exón 20 Scorpion
- <210> 35
- <223> Exón 20 Scorpion2
- 35 <210> 36
- <223> Región diana de control
- <210> 37

<223> Cebador de control

<210> 38

<223> Scorpion de control

<210> 39

5 <223> Scorpion de control 2

**Referencias:**

1. 1. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004; 304(5670): 554.
- 5 2. 2. Higuchi R, Krummel B, Saiki RK. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(15): 7351-67.
3. 3. Wu G, Xing M, Mambo E, et al. Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005; 7(5): R609-16.
4. 4. Levine DA, Bogornolnii F, Yee CJ, et al. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res* 2005;11(8):2875-8.
- 10 5. 5. Velho S, Oliveira C, Ferreira A, et al. The prevalence of PIK3CA mutations In gastric and colon cancer. *Eur J Cancer* 2005;41(11):1649-54.
6. 6. Lee JW, Soung YH, Kim SY, et al. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2005; 24(8): 1477-80.
- 15 7. 7. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, et al. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2004; 3(8): 772-5.
8. 8. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 2004;64(21):7678-81.
9. 9. Omholt K, Krockel D, Ringborg U, Hansson J. Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2006; 16(2):197-200.
- 20 10. 10. Wang Y, Helland A, Holm R, Kristensen GB, Borresen-Dale AL. PIK3CA mutations In advanced ovarian carcinomas. *Hum Mutat* 2005;25(3):322.

**Listado de secuencias**

<110> Qiagen Manchester Ltd.

<120> Polinucleótidos cebadores

5 <130> B051-MA02EP7

<150> GB0719034.1

<151> 2007-09-28

10 <160> 39

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1  
<211> 180  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Región diana de E542K

<400> 1

aacagagaat ctccatttta gcaattacct gtgactccat agaaaatctt tctcctgctc 60

agtgatttca gagagaggat ctogttaga aattgctttg agctgttctt tgcattttc 120

25 ccttaattca ttgtctctag ctagtctgtt actctgtaaa ataaaataat atcttatata 180

<210> 2  
<211> 180  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Región diana de E545K

35 <400> 2

aacagagaat ctccatttta gcaattacct gtgactccat agaaaatctt tctcctgcty 60

agtgatttca gagagaggat ctogttaga aattgctttg agctgttctt tgcattttc 120

ccttaattca ttgtctctag ctagtctgtt actctgtaaa ataaaataat atcttatata 180

<210> 3  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> Cebador directo de E542K-0

45 <400> 3

ctttctcctg ctcaagtatt tt 22

50 <210> 4  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial

55 <220>  
<223> Cebador directo de E542K-1

<400> 4  
ctttctcctg ctcagtgatt at 22

5 <210> 5  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Cebador directo de E542K-2  
<400> 5

15 ctttctcctg ctcagtgatt ct 22  
<210> 6  
<211> 22  
<212> ADN  
20 <213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador directo de E542K-3

25 <400> 6  
ctttctcctg ctcagtgatt gt 22  
<210> 7  
30 <211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
35 <223> Cebador directo de E542K-4  
<400> 7 22

40 ctttctcctg ctcagtgata tt 22  
<210> 8  
<211> 22  
<212> ADN  
45 <213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador directo de E542K-5  
<400> 8

50 ctttctcctg ctcagtgatc tt 22  
<210> 9  
<211> 22  
55 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador directo de E542K-6  
60 <400> 9  
ctttctcctg ctcagtgatg tt 22

65 <210> 10  
<211> 27

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Cebador directo de E545K-0  
  
 <400> 10  
  
 actccataga aaatcttct cctgct 27  
 10  
 <210> 11  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Cebador directo de E545K-1  
  
 <400> 11  
 20  
 actccataga aaatcttct cctgcat 27  
  
 <210> 12  
 <211> 27  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo de E545K-2  
 30  
 <400> 12  
  
 actccataga aaatcttct cctgcct 27  
 35  
 <210> 13  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Cebador directo E545K-3  
  
 <400> 13  
 45  
 actccataga aaatcttct cctgcgt 27  
  
 <210> 14  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 50 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo de E454K-4  
 55  
 <400> 14  
  
 actccataga aaatcttct cctgatt 27  
 60  
 <210> 15  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 65 <223> Cebador directo de E545K-5



ES 2 532 225 T3

<400> 15  
actccataga aaatcttct cctggtt 27

5 <210> 16  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Cebador directo de E545K-6  
<400> 16

15 actccataga aaatcttct cctggtt 27  
<210> 17  
<211> 30  
<212> ADN  
20 <213> Artificial  
<220>  
<223> Exón 9 Scorpion

25 <400> 17  
cgcgctcgtg tagaaattgc tttgagcgcg 30  
<210> 18  
30 <211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
35 <223> Exón 9 Scorpion 2  
<400> 18

40 caatgaatta agggaaaatg aca 23  
<210> 19  
<211> 300  
<212> ADN  
45 <213> Artificial  
<220>  
<223> Regiones diana de H1047R y H1047L  
<400> 19

50 agtgcagtggt ggaatocaga gtgagctttc attttctcag ttatcttttc agttcaatgc 60  
atgctgttta attgtgtgga agatccaatc catttttggt gtccagccac catgahgtgc 120  
atcattcatt tgtttcatga aatactccaa agcctcttgc tcagttttat ctaaggctag 180  
ggctcttcga atgtatgcaa tgtcatcaaa agattgtagt tctggcattc cagagccaag 240  
catcattgag aaaagattta tgaagagatt ggcattgctgt cgaatagcta gataagcctt 300

55 <210> 20  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>

<223> Cebador directo H1047R-0  
 <400> 20  
 5    tggtgtccag ccaccatgac        20  
       <210> 21  
       <211> 20  
       <212> ADN  
 10    <213> Artificial  
       <220>  
       <223> Cebador directo H1047R-1  
 15    <400> 21  
       tggtgtccag ccaccatgcc       20  
       <210> 22  
 20    <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Artificial  
       <220>  
 25    <223> Cebador directo H1047R-2  
       <400> 22  
       tggtgtccag ccaccatggc       20  
 30    <210> 23  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Artificial  
 35    <220>  
       <223> Cebador directo H1047R-3  
       <400> 23  
 40    tggtgtccag ccaccatgtc       20  
       <210> 24  
       <211> 20  
 45    <212> ADN  
       <213> Artificial  
       <220>  
       <223> Cebador directo H1047R-4  
 50    <400> 24  
       tggtgtccag ccaccataac       20  
 55    <210> 25  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Artificial  
 60    <220>  
       <223> Cebador directo H1047R-5  
       <400> 25  
 65    tggtgtccag ccaccatcac       20

<210> 26  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador directo H1047R-6  
 <400> 26  
 10  
 tggtgtccag ccaccattac        20  
 <210> 27  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Cebador directo de H1047L-0  
 20  
 <400> 27  
 tggtgtccag ccaccatgaa        20  
 25  
 <210> 28  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Cebador directo de H1047L-1  
 <400> 28  
 35  
 tggtgtccag ccaccatgca        20  
 <210> 29  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Cebador directo de H1047L-3  
 45  
 <400> 29  
 tggtgtccag ccaccatgga        20  
 <210> 30  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Cebador directo de H1047-3  
 55  
 <400> 30  
 tggtgtccag ccaccatgta        20  
 60  
 <210> 31  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 65  
 <220>

<223> Cebador directo de H1047L-4  
 <400> 31

5    tggtgtccag ccaccataaa       20  
       <210> 32  
       <211> 20  
       <212> ADN  
 10    <213> Artificial  
       <220>  
       <223> Cebador directo de H1047L-5

15    <400> 32  
       tggtgtccag ccaccatcaa       20  
       <210> 33  
 20    <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Artificial  
       <220>

25    <223> Cebador directo de H1047L-6  
       <400> 33  
       tggtgtccag ccaccattaa       20  
 30    <210> 34  
       <211> 27  
       <212> ADN  
       <213> Artificial

35    <220>  
       <223> Exón 20 Scorpion  
       <400> 34

40    cgcgcatga aatactccaa agccgcg       27  
       <210> 35  
       <211> 26  
 45    <212> ADN  
       <213> Artificial  
       <220>

50    <223> Exón 20 Scorpion2  
       <400> 35  
       ccctagcctt agataaaact gagcaa       26  
 55    <210> 36  
       <211> 125  
       <212> ADN  
       <213> Artificial

60    <220>  
       <223> Región diana de control  
       <400> 36

ES 2 532 225 T3

	aggcttgaag agtgcgaat tatgtcctct gcaaaaaggc cactgtgggtt gaattgggag	60
	aaccagaca tcatgtcaga gttactgttt cagaacaatg agatcatctt taaaaatggg	120
	gatgg	125
	<210> 37	
	<211> 25	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de control	
10	<400> 37	
	agatgatctc atgttctga aacag	25
15	<210> 38	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Scorpion de control	
	<400> 38	
25	ccggccaatt caaccacagt ggccgg	26
	<210> 39	
	<211> 21	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Scorpion de control 2	
35	<400> 39	
	ggcttgaaga ggtcgaatt a	21

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de PCR para detectar la presencia o la ausencia de una mutación en el gen PIK3CA que comprende las etapas de:
  - a) mezclar una muestra de ácido nucleico que comprende al menos un fragmento del gen PIK3CA con una secuencia de polinucleótido cebador que consiste en la SEQ ID NO. 5, donde el polinucleótido se usa como cebador y el segundo cebador corresponde a una región del fragmento de la secuencia de PIK3CA por debajo de la región a la cual el polinucleótido es complementario, y llevar a cabo una PCR con la mezcla; y
  - b) detectar la hibridación del polinucleótido con la muestra de ácido nucleico, donde la hibridación indica la presencia de una mutación.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, donde el segundo cebador tiene una secuencia según la SEQ ID NO. 18.
3. Un polinucleótido con una secuencia que consiste en la SEQ ID NO. 5.

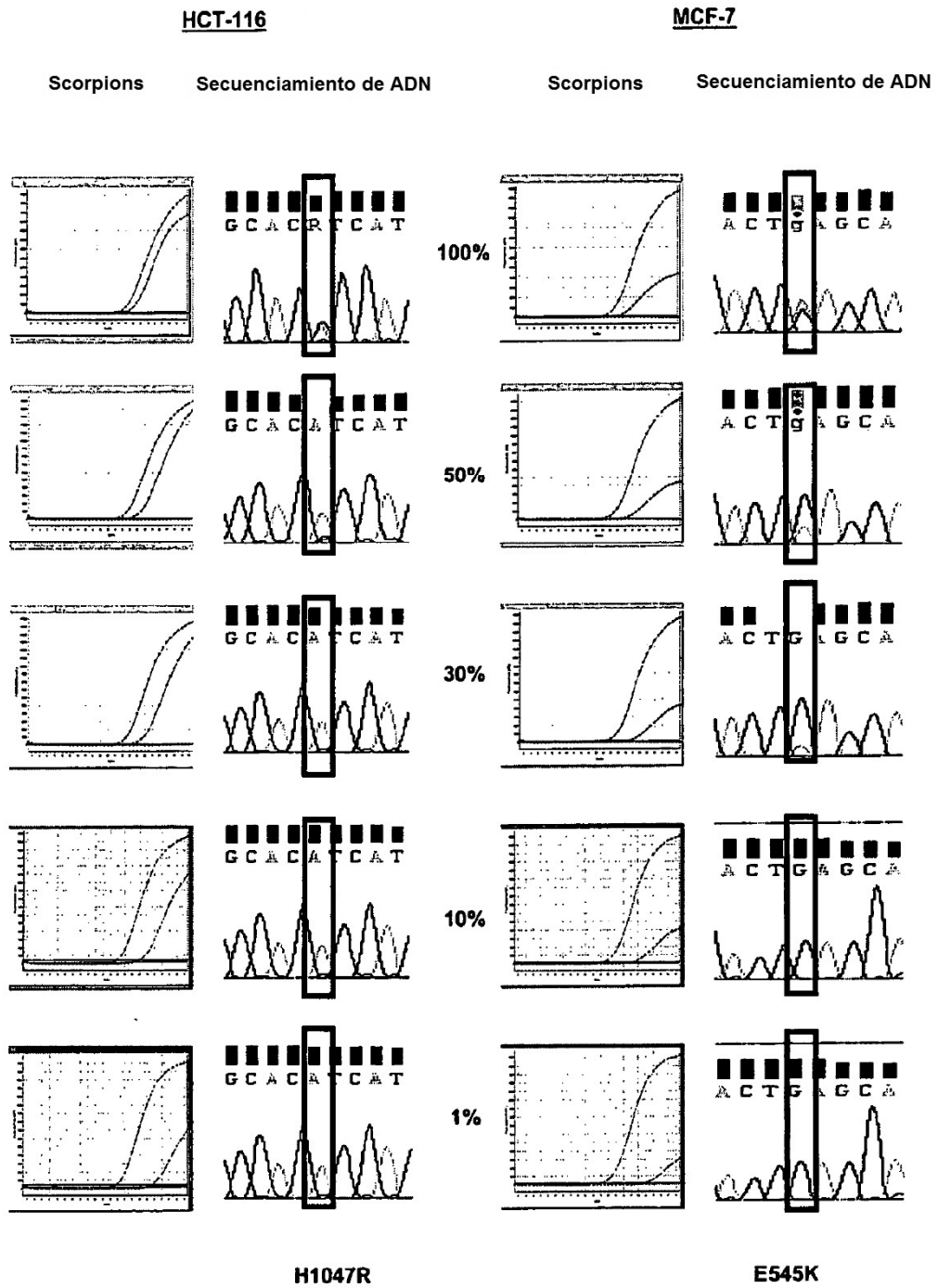


Figura 1