

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 816**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012 PCT/EP2012/076350**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO2013092839**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012 E 12813839 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2794919**

54 Título: **Método para la detección de mutaciones KRAS**

30 Prioridad:

23.12.2011 EP 11382397

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

02.06.2017

73 Titular/es:

**GENOMICA S.A.U. (100.0%)
C/ Alcarria 7 Poligono Industrial de Coslada
28823 Coslada, Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**VILLAHERMOSA JAEN, MARIA LUISA y
MOSCOSO DEL PRADO, JUAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 614 816 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la detección de mutaciones KRAS

5 **Antecedentes de la invención**

10 KRAS es un homólogo de oncogén Kirsten ras de la familia de genes ras de mamífero, que codifica una proteína que es un miembro de la superfamilia GTPasa pequeña. En las patologías humanas, en particular cáncer, suelen encontrarse frecuentemente mutaciones en el oncogén KRAS, pudiendo ser una sola sustitución de aminoácido en la proteína KRAS la responsable de una mutación activante. La proteína mutada que resulta puede estar implicada en diversas malignidades, incluyendo adenocarcinoma de pulmón, adenoma mucinoso, carcinoma ductal del páncreas y carcinoma colorrectal.

15 Asimismo, los defectos en KRAS pueden ser una causa de leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielomonocítica juvenil (JMML), síndrome de Noonan tipo 3 (NS3) y síndrome cardiofaciocutáneo (síndrome CFC). Prácticamente el 50 % de los cánceres de colon llevan mutaciones activantes en KRAS, y también las mutaciones activantes en el oncogén KRAS están comúnmente asociadas con la progresión desde un adenoma benigno a un adenocarcinoma displásico avanzado. Por otra parte, la presencia de estas mutaciones en KRAS está correlacionada con la falta de respuesta a determinadas terapias dirigidas contra el cáncer basadas en la inhibición de EGRF, en pacientes con cáncer colorrectal metastático. Por tanto, frecuentemente se recomienda la evaluación del estado mutacional de KRAS para determinar el tratamiento apropiado.

20 Las mutaciones de KRAS asociadas a neoplasia afectan frecuentemente a los codones 12, 13 y 61. Las mutaciones en los codones 12 y 13 de KRAS son fuertes predictores de la ausencia de respuesta a anticuerpos anti-EGFR en cáncer colorrectal metastático (Shankaran y col., 2010, Oncologist 15, 157-167). Asimismo, los estudios clínicos indican que las mutaciones en el codón 61 están asociadas también con bajos resultados de la terapia de anticuerpos anti-EGFR (De Roock y col. 2010, Lancet Oncol 11, 753-762; Loupakis y col. 2009, Br. J. Cancer 101, 715-721). Los codones 12 y 13 del oncogén KRAS esconden 7 mutaciones de KRAS relevantes: Gly12Ser (GGT/AGT), Gly12Arg (GGT/CGT), Gly12Cys (GGT/TGT), Gly12Asp (GGT/GAT), Gly12Ala (GGT/GCT), Gly12Val (GGT/GTT) y Gly113Asp (GGC/GAC). Asimismo, las mutaciones en el codón 61, en particular, Gln61His (CAA>CAT) y Gln61Leu (CAA>CTA) son mutaciones de contrasentido, que eliminan la actividad GTPasa con el resultado de una señalización ras constitutivamente activada.

35 Existe una gran demanda de métodos de detección de estas 9 mutaciones del gen KRAS. En particular, el estado de la técnica se refiere a menudo a la cuestión de la detección de al menos las 7 mutaciones que corresponden a Gly12 y Gly13. La Figura 1a) describe un fragmento de ADN que contiene las posiciones que dan lugar a las 7 mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val y Gly13Asp (los 5 nucleótidos que determinan la mutación KRAS exacta están dentro del cuadrado). La Figura 1b) muestra los cambios de nucleótido exactos que dan lugar a cada una de las 7 mutaciones KRAS. Una consecuencia del hecho de que las 7 mutaciones KRAS se sitúen en su totalidad muy próximas dentro de la secuencia del gen KRAS, así como de las mínimas diferencias de secuencia entre los productos de amplificación correspondientes, es la hibridación no específica de cualquier producto de amplificación que corresponde a una de las mutaciones KRAS, con sondas complementarias para las demás mutaciones KRAS. Por tanto, la hibridación con una sonda del producto de amplificación de ADN de cualquiera de las 7 mutaciones KRAS no es específica ya que el fragmento de amplificación de otras mutaciones KRAS también se puede unir no específicamente con la sonda que corresponde al primero.

45 Este inconveniente se aplica tanto a la estrategia de amplificación ARMS multiplex, como a la de amplificación ARMS individual, donde para cada mutación, los productos de amplificación específicos se obtienen en vasos de reacción independientes.

50 Otro problema asociado es que las mutaciones KRAS, que pueden estar presentes como factores pronósticos para la estadificación, metástasis, evolución, heterogeneidad celular o heterogeneidad alélica del tumor, con frecuencia se encuentran en muestras en baja abundancia con respecto a la forma de tipo silvestre. Y, aunque se dispone de muchos métodos de diagnóstico para la detección de mutaciones, la mayoría de ellos no sirve para detectar con precisión mutaciones de baja abundancia. La secuenciación de Sanger es el criterio de referencia para la identificación de la mutación KRAS, si bien solamente puede detectar mutaciones en abundancia por encima de aproximadamente 20 %.

60 El documento US2003/175750A1 (Barany Francis (EE.UU.) y col.) desvela un método para la detección de una o más diferencias de ácido nucleico, en particular, mutaciones KRAS, comprendiendo dicho método la etapa de ligamiento entre dos sondas de oligonucleótido ("Reacción de Detección de la Ligasa" o "LDR") como etapa crucial. De acuerdo con la información descrita en el documento US2003/175750A1, la LDR sería el método de detección de mutaciones muy agrupadas, como por ejemplo las de KRAS, que no son susceptibles de detección por PCR específica de alelo o hibridación.

65

Otros métodos de detección conocidos utilizados en el estado de la técnica se basan en la amplificación PCR del fragmento de ADN de KRAS que contiene estas mutaciones. La gran similitud de secuencia entre las secuencias de ADN de las mutaciones KRAS perjudica la especificidad de detección de los productos de amplificación. Por tanto, en la mayor parte de los métodos del estado de la técnica, la detección posterior de productos de la PCR se realiza a través de ciertas estrategias técnicas, tales como secuenciación de ADN, visualización en gel de agarosa, etc.

Dos documentos particulares del estado de la técnica, WO 99/04037 y WO 2010/048691, describen métodos de diagnóstico para la detección de mutaciones KRAS, basadas en el sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS, por las siglas en inglés de *Amplification Refractory Mutation System*). El método ARMS es para detectar mutaciones puntuales basado en el principio de sensibilización específica de alelo de amplificación PCR (documento EP0332435; Newton y col., 1989, *Nucleic Acid Research* 17, 2503-2516). Este sistema se basa en una estrategia en la que se diseña un cebador oligonucleotídico para que funcione solamente como cebador para la PCR cuando se hibrida con su secuencia de ADN diana específica. Esta técnica requiere que el nucleótido 3' terminal del cebador de PCR sea específico de alelo. Esto implica que el nucleótido 3' terminal corresponda al de la mutación puntual. Por tanto, el cebador se diseña en dos formas: la forma "normal" que es refractaria para PCR para ADN molde "mutante" y la forma "mutante" que es refractaria para PCR sobre ADN "normal".

En algunos casos, una sola base desapareada en 3' no impide completamente la extensión no específica del cebador oligonucleotídico cuando se tiene como diana el ADN correspondiente a otra mutación puntual, y prosigue la amplificación.

En dichos casos, la introducción de un desapareamiento deliberado cerca del extremo 3' del cebador apropiado específico de alelo (en el segundo, tercero o incluso cuarto nucleótido desde el extremo 3' del cebador) permite mejorar la especificidad del cebador.

La técnica de ARMS implica que puedan tener lugar al menos dos PCR en una mezcla de reacción, correspondiendo cada una de ellas a la amplificación con uno de los cebadores del ARMS. Cualquiera de los cebadores del ARMS requiere además un segundo cebador (que se denominará en adelante cebador de amplificación y que normalmente también recibe el nombre de cebador común) para generar el producto específico de alelo. Por otra parte, se pueden incluir dos o más cebadores de control en la mezcla de reacción con el fin de generar un producto no relacionado que indique que la reacción está funcionando correctamente.

El documento WO 99/04037 desvela la detección de las 7 mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val y Gly13Asp presentes en una muestra que se basa en la amplificación ARMS con los cebadores ARMS 1 a 7 que se presentan en la tabla 2 de dicho documento WO 99/04037. Además del documento WO 99/04037, Yamada y col., 2005, *Int. J. Cancer* 113, 1015-1021, hacen uso de reacciones de amplificación PCR individuales, específicas para cada alelo mutante para detectar mutaciones KRAS en muestras de mucosa colorrectal tumoral y normal. La visualización de los productos de amplificación se lleva a cabo tras electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. La detección simultánea de productos de ARMS que corresponden a diferentes mutaciones KRAS, a través de hibridación con sondas de detección, por ejemplo, no sería posible debido a la unión no específica de los productos ARMS de ciertas mutaciones KRAS a las sondas de diferentes mutaciones KRAS como consecuencia de la similitud de secuencia.

El documento WO 2010/048691 desvela un método de detección de mutaciones KRAS basado también en la amplificación ARMS, pero en el que los cebadores ARMS presentan un fragmento 3' de 19 a 21 nucleótidos (nt), complementario para la secuencia diana de la mutación KRAS que se ha de detectar, y una secuencia 5' no específica diferente que se utiliza para detección. Las condiciones de ciclos térmicos que se utilizan para amplificación de ADN comprenden una "temperatura de hibridación" de 54 °C y, normalmente, son necesarios 50 ciclos de PCR para una amplificación sensible. La secuencia no específica 5' se utiliza después para la detección de productos de amplificación. Se sometió a ensayo mediante este método la detección del 50 %, 25 % o 5 % de mutante en un contexto de tipo silvestre, siendo el mejor dato de sensibilidad obtenido la detección de un 5 % mutante presente en un contexto de tipo silvestre, pero no para todas las mutaciones KRAS.

Un inconveniente de este método es que surgen varios problemas de especificidad, tal como se puede observar en los datos correspondientes a Q61R, en las Tablas 8 y 9 de la solicitud de patente. Básicamente, se detectan no solamente la mutación KRAS presente en la muestra, sino también otras mutaciones KRAS no presentes en ella tras la amplificación con los cebadores ARMS del documento WO 2010/048691.

Por lo tanto, sería muy deseable proporcionar un método alternativo para detectar mutaciones KRAS presentes en una muestra que permitiera una detección específica de dichas mutaciones al mismo tiempo que se mantiene o se potencia los valores de sensibilización de los métodos del estado de la técnica, en particular el del documento WO 2010/048691. El método debería permitir así la detección de mutaciones KRAS presentes en la muestra en un porcentaje del 5 % o inferior, en un contexto de tipo silvestre.

La invención aquí descrita tiene por objetivo proporcionar un método fiable y robusto para detectar mutaciones KRAS y mitigar así las deficiencias de la técnica anterior.

Sumario de la invención

El problema que se resuelve con la presente invención es proporcionar un método alternativo a los inconvenientes existentes en el estado de la técnica, para la detección de una cualquiera de las 9 mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu, presentes en una muestra, resolviéndose la falta de especificidad de los métodos de la técnica anterior. El método descrito en el presente documento permite detectar específicamente cualquiera de las mutaciones KRAS mencionadas presentes en una muestra, al tiempo que proporciona unos valores de sensibilidad iguales o superiores a los de los métodos del estado de la técnica.

La solución que se aplica en los diferentes métodos y aspectos de la invención descritos en el presente documento se basa en la amplificación ARMS (sistema de mutación refractario a la amplificación, método para detectar mutaciones puntuales basado en el principio de sensibilización específica de alelo de amplificación por PCR) de una o más de las 9 mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu presentes en una muestra, con uno o más cebadores ARMS del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, como cebadores de mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu, respectivamente.

Los cebadores ARMS comprenden una secuencia específica de diana 3' seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, y SEQ ID NO: 9, respectivamente, comprendiendo además cada cebador una secuencia etiqueta 5' no específica de diana de 17 a 30 nucleótidos que se utiliza para detección.

Los correspondientes cebadores ARMS específicos para las 9 mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu se pueden describir tal como se indica en la tabla 1.

Tabla 1

5' etiqueta1-CTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGCGCTA 3',
5' etiqueta2-CGTC AAGGCACTCTTGCCTACGACACG 3',
5' etiqueta3-CTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGATT 3',
5' etiqueta4-CTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCCGA 3',
5' etiqueta5-CTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGCAGATGC 3',
5' etiqueta6-CGTC AAGGCACTCTTGCCTACGGCAA 3'
5' etiqueta7-CTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGGGA 3'
5' etiqueta8-TGGTCCCTCATTGCACTGTA CTCCACA 3'
5' etiqueta9-GATATTCTCGACACAGCAGTTCT 3'.

La etiqueta1, etiqueta2, etiqueta3, etiqueta4, etiqueta5, etiqueta6, etiqueta7, etiqueta8 y etiqueta9, que se localizan en la posición 5' de los cebadores ARMS, representan las secuencias de nucleótido no específicas de diana, siendo todas diferentes entre sí. Asimismo, las secuencias específicas de diana 3' se designan de acuerdo con el método de amplificación ARMS.

A lo largo de toda la presente memoria descriptiva de patente, estos cebadores de amplificación específicos de mutación designados de acuerdo con el método de amplificación ARMS, se denominarán "cebadores ARMS". Adicionalmente, el cebador o cebadores que se combinan con cebadores ARMS para la amplificación de ADN diana, que también reciben el nombre de cebadores comunes, se denominarán "cebadores de amplificación". Estos últimos pueden ser directos o inversos, dependiendo de si los cebadores ARMS son inversos o directos, respectivamente.

La diferencia entre los cebadores ARMS de la presente invención y los del documento WO 2010/048691 es la longitud del fragmento específico de diana 3', complementario de la secuencia diana de la mutación KRAS que se ha de detectar. Según esto, los cebadores ARMS de la presente invención presentan fragmentos específicos de diana 3' de las siguientes longitudes: 34 nt (SEQ ID NO: 16), 31 nt (SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14), 30 nt (SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 12), 27 nt (SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 17), 26 nt (SEQ ID NO: 15), y 23 nt (SEQ ID NO: 18). En cambio, todos los fragmentos específicos de diana 3' de los cebadores ARMS del documento WO 2010/048691 tienen una longitud de 19 a 21 nt, la mayoría de ellos una longitud de 20 nt.

La amplificación con cebadores ARMS de la presente invención permite aplicar unas condiciones de ciclo térmico que comprenden una "temperatura de hibridación" en el intervalo de 60 a 64 °C, preferiblemente de 62 °C, que es más alta que la "temperatura de hibridación" de 54 °C del documento WO 2010/048691. La amplificación a esta temperatura de amplificación más alta potencia la especificidad de detección, ya que cada cebador se hibridará solamente con su secuencia diana. En cambio, a temperaturas de hibridación más bajas es inevitable la unión no específica de los cebadores a diferentes mutaciones. Los datos de especificidad de los cebadores de la presente invención están comprendidos todos ellos entre 98,5 y 100 %.

Otra diferencia más que se consigue gracias a los cebadores ARMS de la presente invención se refiere al número de ciclos de la reacción de amplificación PCR. Según esto, el número de ciclos de la reacción de amplificación PCR según el método de la presente invención es preferiblemente de 40 a 42 ciclos. En cambio, las condiciones de amplificación más habituales del documento WO 2010/048691 comprenden 50 ciclos PCR. Se requiere un número más alto de ciclos PCR cuando no se pueden conseguir los valores de sensibilidad adecuados con un número más bajo de ciclos, tal como es el caso con el estado de la técnica más reciente. La amplificación con los cebadores ARMS de la presente invención, sin embargo, proporciona unos mejores valores de sensibilidad que los del documento WO 2010/048691, y dichos valores se consiguen con un menor número de ciclos PCR. Una consecuencia de esta reducción en el número de ciclos PCR con los cebadores de la presente invención es una potenciación de la especificidad, al tiempo que con un número mayor de ciclos no se puede evitar la amplificación no específica de otras mutaciones KRAS. Asimismo, el uso de los cebadores de la presente invención proporciona el presente método de detección con valores de sensibilidad en los que se puede detectar KRAS mutante al 1 % en un contexto de tipo silvestre (véase el Ejemplo 2 más adelante). Dicho valor de sensibilidad es mejor que el del documento WO 2010/048691, en el que el valor de sensibilidad óptimo conseguido es la detección de mutante KRAS al 5 % en un contexto de tipo silvestre.

El método de la presente invención permite la amplificación ARMS Multiplex con dos o más cebadores de la presente invención.

Una ventaja más del método de la presente invención es que permite la detección de mutaciones KRAS que están presentes en la muestra en un bajo porcentaje (mutante al 1 % en un contexto de tipo silvestre).

En uno de sus aspectos, la invención se refiere a un método para detectar una o más mutaciones KRAS seleccionadas de Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu en una muestra de ensayo que comprende ácido nucleico, comprendiendo dicho método someter la muestra a amplificación con una mezcla que comprende uno o más cebadores ARMS seleccionados de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente, comprendiendo además la mezcla de amplificación uno o más cebadores de amplificación.

Además de los cebadores ARMS y de amplificación, la mezcla de amplificación comprende también reactivos adicionales para la amplificación de ácido nucleico, como la ADN polimerasa y dNTP (desoxirribonucleósido trifosfatos)

Preferiblemente, la temperatura de hibridación que se utiliza en la reacción de amplificación PCR es de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 64 °C, preferiblemente de aproximadamente 62 °C, siendo lo más preferible 62 °C. Asimismo, las condiciones de ciclo térmico preferibles de la reacción de amplificación se seleccionan de:

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1 ciclo	95 °C	15'
≥40 ciclos (preferiblemente 40-42 ciclos)	94 °C	15-30" (preferiblemente 15")
	60-64 °C (preferiblemente 62 °C)	45-90" (preferiblemente 60")
1 ciclo	62-72 °C (preferiblemente	6-12' (preferiblemente 10')
1 ciclo	4 °C	Ilimitado

Preferiblemente, el método de la presente invención comprende poner en contacto uno o más productos de amplificación obtenidos con una o más sondas, hibridándose cada sonda específicamente con la región del producto que corresponde a la secuencia de etiqueta 5' del cebador ARMS correspondiente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para detectar una o más mutaciones KRAS seleccionadas de Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu en una muestra de ensayo que comprende ácido nucleico, comprendiendo dicho kit una o más mezclas de reactivos para amplificación de ácido nucleico (mezclas de amplificación), comprendiendo cada mezcla:

- uno o más cebadores ARMS seleccionados de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente y
- uno o más cebadores de amplificación,

comprendiendo el kit además una micromatriz en la que se inmovilizan una o más sondas que se unen específicamente a los productos ARMS de una o más de las mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu, hibridándose específicamente cada sonda con la región del correspondiente producto ARMS complementaria para la secuencia etiqueta 5' del cebador ARMS correspondiente.

Un tercer aspecto de la presente invención corresponde a un cebador ARMS seleccionado de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.

5 Otro aspecto más de la presente invención corresponde al uso del método, el kit o los cebadores ARMS, tal como se describen en el presente documento, para diagnóstico y/o pronóstico de un estado patológico en un paciente. Preferiblemente, el estado patológico es cáncer. Más preferiblemente, el cáncer es cáncer colorrectal. Otro aspecto se refiere a un método para detectar/diagnosticar cáncer en un paciente que comprende un método de detección o
10 amplificación tal como se describe en el presente documento. Adicionalmente, otro aspecto más de la presente invención se corresponde con la predicción de respuesta de un paciente a terapia con anticuerpos anti-EGFR, a través de la realización de los métodos y el equipo de la presente invención.

Tal como se ha señalado ya, los cebadores ARMS utilizados en el método de la invención comprenden en el extremo 3', una secuencia específica de diana que es capaz de hibridarse con el ácido nucleico diana de manera
15 específica de alelo. Dicha secuencia específica de diana 3' puede ser de 23 a 34 nt de longitud. Dicho cebador también comprende una secuencia 5' que no es específica de diana y por tanto no complementaria para el ácido nucleico diana. Esta secuencia es una secuencia etiqueta que es útil para detectar el producto de amplificación a través de la posterior hibridación con una sonda diseñada específicamente para hibridarse con la región del producto de amplificación complementaria para secuencia etiqueta. Esto permite la detección específica del producto de
20 amplificación amplificado a través de los métodos descritos en el presente documento.

El método de la presente invención comprende por tanto poner en contacto una muestra de ensayo de un paciente que comprende ácidos nucleicos con uno o más cebadores ARMS de diagnóstico de la presente invención, en presencia de uno o más cebadores de amplificación, trifosfato nucleótidos apropiados y un agente de polimerización
25 y en las condiciones apropiadas, de manera que cada cebador de diagnóstico se extiende solamente cuando está presente su correspondiente mutación KRAS en la muestra; y la detección de la presencia o ausencia de una mutación KRAS haciendo referencia a la presencia o ausencia de un producto de extensión de cebador de diagnóstico. Las personas especializadas en la técnica pueden seleccionar el agente de polimerización y las condiciones apropiadas.

Se puede utilizar uno o más cebadores ARMS seleccionados de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, en solitario o en combinación con uno o más de los demás cebadores ARMS. En un modo de realización, se utilizan 1, 2, 3, 4, 5, 6,
35 7, 8 o 9 de estos cebadores.

En particular, el método de la presente invención permite detectar específicamente cualquier producto de amplificación obtenido de las 9 mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu presentes en una muestra por hibridación de dicho producto con una o más sondas que se hibridan específicamente con él en la región que corresponde a la etiqueta proporcionada por el cebador
40 específico. En particular, de acuerdo con los métodos de la invención, las sondas pueden estar comprendidas en una micromatriz. Preferiblemente, las sondas pueden estar inmovilizadas sobre un soporte sólido.

Las combinaciones de cebadores especialmente preferibles son mezclas de cebador que comprenden:

- 45 - Uno o más cebadores ARMS seleccionados de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 (Componentes de la mezcla de amplificación 1);
- Uno o más cebadores ARMS seleccionados de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 18 (Componentes de la mezcla de amplificación 2);
- 50 - Uno o más cebadores ARMS seleccionados de SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 15 (Componentes de la mezcla de amplificación 3);
- Uno o más cebadores ARMS seleccionados de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14 (Componentes de la mezcla de amplificación 4); y
- Uno o más cebadores ARMS seleccionados de SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 15 (Componentes de la mezcla de amplificación 5).

Como cebador de amplificación, se podría utilizar para la amplificación cualquier cebador posible de entre 17 y 35 nucleótidos que tras la combinación con uno o más de los cebadores ARMS señalados tenga como resultado la amplificación de productos de 1000 pares de bases (pb) o menos. El cebador de amplificación puede ser directo o inverso, dependiendo de si el cebador ARMS correspondiente es inverso o directo, respectivamente.

Preferiblemente, se utiliza un cebador de amplificación que comprende SEQ ID NO: 19, siendo lo más preferible, un cebador que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 19 en combinación con uno o más cebadores ARMS de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 16.

65 Asimismo, preferiblemente se utiliza un cebador de amplificación que comprende la SEQ ID NO: 20, siendo lo más preferible un cebador que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 20 en combinación con uno o dos de los cebadores

ARMS de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14.

Asimismo, preferiblemente se utiliza un cebador de amplificación que comprende la SEQ ID NO: 21, siendo lo más preferible un cebador que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 21 en combinación con uno o dos de los cebadores ARMS de SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 15.

Asimismo, preferiblemente se utiliza un cebador de amplificación que comprende la SEQ ID NO: 22, siendo lo más preferible un cebador que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 22 en combinación con un cebador de SEQ ID NO: 17.

Además, se utiliza un cebador de amplificación que comprende SEQ ID NO: 23, siendo lo más preferible, un cebador que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 23 en combinación con el cebador ARMS de SEQ ID NO: 18.

Las sondas de detección se hibridan específicamente con la región del producto complementario con la secuencia etiqueta 5' del cebador correspondiente. Preferiblemente, la etiqueta 5' puede seleccionarse de una de las siguientes secuencias SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32.

Las secuencias etiqueta 5' de los diferentes cebadores son todas ellas diferentes entre sí. Esta diferencia es lo que hace posible la unión específica de los diferentes productos de amplificación a sus correspondientes sondas, ya que cualquier sonda específica para uno de los productos de amplificación debe tener una secuencia de nucleótido capaz de hibridarse al menos con una región del producto que corresponde a la etiqueta correspondiente. Según esto, las sondas de la presente invención comprenden una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, y SEQ ID NO: 32, y pueden contener nucleótidos adicionales a los específicos para la región de etiqueta.

Las sondas preferibles son sondas de SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55.

Las sondas se pueden inmovilizar sobre un soporte sólido. El conjunto de sondas de la micromatriz y el soporte sólido pueden comprender además una o más sondas de control. Preferiblemente, el kit de la presente invención comprende además reactivos para la visualización de la hibridación entre cualquier producto de amplificación y la micromatriz de sondas.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1

La Figura 1a) presenta un fragmento de ADN que contiene las posiciones de nucleótido que dan lugar a las 7 mutaciones KRAS, Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val y Gly13Asp. Los 5 nucleótidos que determinan la mutación KRAS exacta son los que están dentro del cuadrado.

La Figura 1b) presenta los cambios de nucleótido exactos que corresponden a cada una de las 7 mutaciones KRAS.

Figura 2

Secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 a 54, y las correspondientes descripciones.

Figura 3

La Figura 3 presenta la visualización en un gel de agarosa de los productos de la amplificación ARMS Multiplex llevada a cabo con los cebadores ARMS y de amplificación de la presente invención, y las muestras /clones indicados que corresponden a las diferentes mutaciones KRAS indicadas.

Longitud del producto de amplificación que corresponde a las mutaciones:

KRAS Gly12 y Gly13: ~164pb

KRAS Gln61 His: ~102pb KRAS, y Gln61Leu: 240pb

Las bandas adicionales más cortas que se observan son artefactos que resultan de los cebadores ARMS y de amplificación, pero, no obstante, no modifican los resultados finales obtenidos en la etapa de visualización posterior. Se ha confirmado también que las variaciones en el número de ciclos de amplificación no modifican los resultados obtenidos.

Figura 4

La Figura 4 presenta la visualización de la hibridación con una micromatriz que comprende las sondas de la presente invención que corresponden a los productos resultan de la amplificación con cebadores ARMS y de amplificación de la presente invención, de las muestras /clones indicados en el Ejemplo 1 y la Figura 3.

Los puntos señalados con una "P" en la primera de las imágenes corresponden al Marcador de Posición, y están presentes en todas las matrices en la misma posición. Los puntos que corresponden a la unión específica, en las diferentes matrices, de los diferentes productos de amplificación ARMS con sus sondas específicas están dentro de cuadrados/rectángulos.

Figura 5

La figura 5 muestra una comparación entre los resultados obtenidos con el método de la presente invención y los de un método de referencia (TheraScreen de Qiagen).

La figura 5a) muestra el resultado de detección con el kit de la presente invención, CMA, de una muestra que comprende 1000 copias de un clon KRAS G12R en 5 µl. Los puntos que están dentro del rectángulo en la micromatriz corresponden a la unión específica del producto de amplificación ARMS KRAS G12R con sus sondas específicas; los puntos restantes corresponden a diferentes controles;

La figura 5b) presenta un gráfico que corresponde a la detección de 10/ 100/ y 1000 copias de un clon KRAS G12R en 5 µl con el kit de referencia TheraScreen de Qiagen.

La figura 5c) es una Tabla con los diferentes resultados obtenidos con los kits CMA y TheraScreen, para diferentes diluciones de clones que corresponden a las mutaciones KRAS indicadas.

Figura 6

Resultado de la amplificación de la mutación Gly12Ser de KRAS, a dos temperaturas de hibridación diferentes, 54 °C y 62 °C, según el ejemplo 4:

La Figura 6 muestra los productos de amplificación que corresponden a la mutación KRAS Gly12Ser a dos temperaturas de hibridación diferentes, 54 °C y 62 °C, tal como se visualiza tras la electroforesis en gel de agarosa.

Las calles 1 y 4 corresponden al producto de amplificación de 1 ng de línea celular NCI-H460 (Gly12Ser negativo);

Las calles 2 y 5 corresponden al producto de amplificación de 1 ng de línea celular HCT 116 (Gly12Ser negativo);

Las calles 3 y 6 corresponden al producto de amplificación de línea celular A549 (Gly12Ser positivo);

La calle 7 corresponde al marcador de peso molecular VIII de Roche

Descripción detallada de la invención

En los siguientes pasajes, se definen diferentes aspectos de la presente invención con más detalle. Cada uno de los aspectos así definidos se puede combinar con cualquier otro aspecto o aspectos a no ser que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier rasgo de la invención indicado como preferible o ventajoso se puede combinar con cualquier otro rasgo o rasgos indicados como preferibles o ventajosos.

Un primer aspecto de la presente invención consiste en un método para detectar una o más mutaciones KRAS seleccionadas de Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu en una muestra de ensayo que comprende ácido nucleico, comprendiendo dicho método someter la muestra a amplificación con una mezcla que comprende uno o más cebadores ARMS seleccionados de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente, comprendiendo además la mezcla de amplificación uno o más cebadores de amplificación.

El método de la presente invención puede comprender también preferiblemente la detección de cualquier producto de amplificación a través de la hibridación de cualquiera de dichos productos con una o más sondas específicas, hibridándose específicamente la sonda específica para cualquier mutación KRAS con el producto de al menos la región que corresponde a la secuencia etiqueta 5' etiqueta1, etiqueta2, etiqueta3, etiqueta4, etiqueta5, etiqueta6, etiqueta7, etiqueta8 o etiqueta9 provista por el cebador ARMS específico.

Los métodos de la presente invención implican que, además de los cebadores ARMS y de amplificación, en la mezcla de amplificación puede haber cualquier componente adicional, conocido por los especialistas, necesario para la amplificación de ácido nucleico, en particular, para la amplificación por PCR. Por tanto, en la mezcla de amplificación también puede haber una ADN polimerasa y desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTP).

Preferiblemente, el producto de amplificación se transforma en ADN monocatenario antes de la hibridación con la correspondiente sonda. Es lo más preferible que el ADN monocatenario se obtenga a través de la desnaturalización del producto de amplificación, siendo sobre todo preferible a través de desnaturalización térmica. Preferiblemente, la sonda se hibrida específicamente con la región del producto complementario para la secuencia etiqueta 5' del cebador ARMS específico. Las sondas específicas de diana se pueden proveer en una micromatriz.

Un segundo aspecto de la presente invención corresponde a un kit para detectar una o más mutaciones KRAS seleccionadas de Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu en una muestra de ensayo que comprende ácido nucleico, comprendiendo dicho kit una o más mezclas de reactivos para amplificación de ácido nucleico, comprendiendo cada muestra:

- uno o más cebadores ARMS seleccionados de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente, y

- uno o más cebadores de amplificación,

el kit comprende además una micromatriz en la que se inmoviliza una o más sondas que se unen específicamente a productos ARMS de una o más de las mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu, hibridándose específicamente cada sonda con la región del correspondiente producto ARMS complementaria para la secuencia etiqueta 5' del correspondiente cebador ARMS.

Igual que ocurre con los métodos señalados, el kit de la presente invención implica que, además del cebador ARMS o los cebadores de amplificación, también puede haber cualquier componente adicional, conocido por los especialistas, que sea necesario para la amplificación de ácido nucleico, en particular, amplificación por PCR, como por ejemplo, una ADN polimerasa y dNTP (desoxirribonucleósido trifosfatos)

Definiciones:

A lo largo de la presente divulgación, a no ser que se señale de otra forma, la expresión "cebadores ARMS" se refiere a los cebadores de amplificación específicos de mutación KRAS diseñados de acuerdo con el método de amplificación ARMS; y la expresión "cebadores de amplificación" se refiere a los cebadores que se combinan con los cebadores ARMS para amplificación de ADN diana.

Los cebadores ARMS se pueden representar tal como se presenta en la Tabla 1 anterior. Los fragmentos localizados en la posición 5' de los cebadores, es decir: etiqueta1, etiqueta2, etiqueta3, etiqueta4, etiqueta5, etiqueta6, etiqueta7, etiqueta8 y etiqueta9 constituyen la secuencia etiqueta 5' o "etiqueta", no existiendo una sustancial homología entre las secuencias etiqueta. Debe entenderse por ausencia de sustancial homología menos de un 50 % de homología (es decir, dos secuencias etiqueta no comparten más de un 50 % de sus nucleótidos).

Los cebadores ARMS de la presente invención que corresponden a las mutaciones Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu son las siguientes, respectivamente:

AAGGATAATTAATTAATCTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGCGCTA (SEQ ID NO: 10)
AATATTGAGGCTGCAGCCGTCAAGGCACTCTTGCCTACGACACG (SEQ ID NO: 11)
GGCTAGCTAGCCGCGGTAGCTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGATT (SEQ ID NO: 12)
CGGTATTTGGGCAACCTGCTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCCGA (SEQ ID NO: 13)
GAATCCATGTGATGACTTGCTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGCAGATGC (SEQ ID NO: 14)
TCAGGCGGCCAGGATGGAGCGTCAAGGCACTCTTGCCTACGGCAA (SEQ ID NO: 15)
CCGAGACGTTTCGACACTGCCTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGGGA (SEQ ID NO: 16)
TTAGGCTCTGAACCTCGGCGTTGGTCCCTCATTGCACTGTACTCCACA (SEQ ID NO: 17) y
GGCCACTTACCGGGATCCAGATATTCTCGACACAGCAGTTCT (SEQ ID NO: 18),

Los nucleótidos en negrita corresponden a la etiqueta.

Las correspondientes etiquetas 5' corresponden por tanto a SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, y SEQ ID NO: 32.

Como cebador de amplificación, se podría utilizar para amplificación cualquier cebador posible de entre 17 y 35 nucleótidos, que tras la combinación con uno o más de los cebadores ARMS que consisten en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, y SEQ ID NO: 18, tenga como resultado productos de amplificación de 1000 pb o menos. En un modo de realización preferible, el cebador de amplificación combinado con uno o más los cebadores ARMS indicados para amplificación produce productos de amplificación de 500 pb o menos, en otro modo de realización preferido, alrededor de 200 pb, y en el modo de realización más preferido, entre 200 pb y 100 pb. El cebador de amplificación puede ser directo o inverso, dependiendo de si el correspondiente cebador ARMS es inverso o directo, respectivamente.

Preferiblemente, de acuerdo con los diferentes aspectos de la invención, se utiliza un cebador de amplificación que comprende SEQ ID NO: 19, siendo lo más preferible, utilizar un cebador que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 19 en combinación con uno o más cebadores ARMS de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 16.

5 Asimismo, preferiblemente se utiliza un cebador de amplificación que comprende la SEQ ID NO: 20, siendo lo más preferible un cebador que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 20 en combinación con uno o dos de los cebadores ARMS SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14.

10 Asimismo, preferiblemente, se utiliza un cebador de amplificación que comprende la SEQ ID NO: 21, siendo lo más preferible un cebador que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 21 en combinación con uno o dos de los cebadores ARMS SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 15.

15 Asimismo, se utiliza un cebador de amplificación que comprende la SEQ ID NO: 22, siendo lo más preferible un cebador que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 22 en combinación con un cebador de SEQ ID NO: 17.

Además, se utiliza un cebador de amplificación que comprende SEQ ID NO: 23, siendo lo más preferible, un cebador que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 23 en combinación con el cebador ARMS de SEQ ID NO: 18.

20 En un aspecto preferible, cualquier sonda específica para la detección de cualquiera de las mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu tiene una longitud de 17 a 39 nucleótidos, siendo la región que se hibrida específicamente con el correspondiente producto ARMS en la región correspondiente a etiqueta1, etiqueta2, etiqueta3, etiqueta4, etiqueta5, etiqueta6, etiqueta7, etiqueta8 o etiqueta9 de entre 17 y 30 nucleótidos. Cada sonda puede comprender nucleótidos adicionales, tanto en el extremo 5' y/o como el extremo 3', hasta la longitud total comprendida entre 17 y 39 nucleótidos.

25 Preferiblemente, Las sondas específicas para la detección de mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu comprenden las secuencias de nucleótido de SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32, respectivamente.

30 En la Tabla 2 se presentan las sondas más preferibles para cada una de las mutaciones KRAS.

Mutación KRAS	Secuencia de sonda	Nombre de sonda	SEQ ID NO:
Gly12Ser	GCTTGCCCCGGGAAGGATAATTAATTAAT	S-34 A7.2	33
Gly12Ser	CCCCGGGAAGGATAATTAATTAAT	S-34 A7.4	34
Gly12Arg	TTCGCCGGTTACCCGGGAATATTGAGGCTGCAGC	S-34 C13.2	35
Gly12Arg	CGGGTTACCCGGGAATATTGAGGCTGCAGC	S-34 C13.4	36
Gly12Cys	GGCTAGCTAGCCGCGGTAGCTGAAT	S-34 T18.5	37
Gly12Cys	CGAGGCCTTGGCCGGCTAGCTAGCCGCGGTAGCTGAAT	S-34 T18.6	38
Gly12Cys	CGAGGCCTTGGCCGGCTAGCTAGCCGCGGTAG	S-34T18.7	39
Gly12Cys	CCTTGGCCGGCTAGCTAGCCGCGGTAGCTGAAT	S-34 T18.8	40
Gly12Cys	CCTTGGCCGGCTAGCTAGCCGCGGTAG	S-34 T18.9	41
Gly12Asp	GCTTGCCCCGGGGCGGTATTTGGGCAACCTG	S-34 A7.6	42
Gly12Asp	CCCCGGGGCGGTATTTGGGCAACCTG	S-34 A7.7	43
Gly12Ala	GAATCCATGTGATGACTTG	S-35 C3	44
Gly12Ala	GAATCCATGTGATGACTTGACTTG	S-35 C4	45
Gly12Ala	CGGGTTACCCGGGAGTCTCGAATCCATGTGATGACTTG	S-35 C5	46
Gly12Ala	CGGGTTACCCGGGAATCCATGTGATGACTTG	S-35 C6	47
Gly12Val	TCAGGCGGCCAGGATGGAGCTGAAT	S-34 C13.5	48
Gly12Val	CGGGTTACCCGGGTCAGGCGCCAGGATGGAG	S-34 C13.7	49
Gly13Asp	CCGAGACGTTTCGACACTGCCTGAAT	S-38 A2	50
Gln61His	CGGGTTACCCGGGTTAGGCTCTGAACTCGGCCT	S-61 H3	51
Gln61His	CGGGTTACCCGGGAGTCTCTTAGGCTCTGAACTCGGCCT	S-61 H4	52
Gln61Leu	CGGGTTACCCGGGGGCCACTTACCGGGATCCA	S-61 L1	53
Gln61Leu	CGGGTTACCCGGGAGTCTCGGCCACTTACCGGGATCCA	S-61 L2	54

Para detectar cada mutación KRAS se puede utilizar una o más sondas diferentes. En particular, las sondas se inmovilizan en una micromatriz. Una micromatriz es una colección de puntos de oligonucleótido microscópicos. Una micromatriz de ADN (también comúnmente conocida como chip génico, chip de ADN o biochip) es una colección de puntos de ADN microscópicos unida a una superficie sólida. Se sintetizan las sondas y después se unen por ingeniería de superficie a una superficie sólida mediante enlace covalente a una matriz química (vía epoxi-silano, amino-silano, lisina, poliacrilamida u otros). Las superficies sólidas son conocidas en la técnica e incluyen perlas microscópicas, así como soportes sólidos. En particular, se inmovilizan las sondas sobre un soporte sólido.

Por consiguiente, además de la mezcla para amplificación, el kit de la presente invención comprende una micromatriz en la que se inmovilizan una o más sondas que se hibridan específicamente con uno o más de los productos de las mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu.

Para una mejor comprensión de la presente invención, en la Figura 2 se describen las secuencias de nucleótido SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 54 descritas en el presente documento.

Se pueden incluir uno o más controles en los métodos y el kit de la presente invención. Preferiblemente, se puede incluir en la mezcla de amplificación un par de cebadores de amplificación que corresponden a cualquier gen ubicuo o constitutivo conocido entre las personas especializadas en la técnica. Es sobre todo preferible utilizar cebadores de amplificación que corresponden al gen β -actina. La amplificación con dicho par de cebadores permite confirmar la correcta extracción del ácido nucleico presente en la muestra de ensayo y constituye un "control endógeno" o "control de extracción". Adicionalmente, se incluyen preferiblemente en la mezcla de amplificación un plásmido de ADN y un par de cebadores con capacidad para amplificarlo, y constituyen el "control de amplificación" o "control interno". Preferiblemente, la micromatriz puede comprender una o más sondas con capacidad para hibridarse con las correspondientes secuencias ADN de control, en particular, los productos de los controles de extracción y amplificación.

Preferiblemente, el kit de la presente invención comprende además reactivos para la visualización de la hibridación entre cualquier producto de amplificación y la micromatriz de sondas.

Un aspecto más de la presente invención corresponde a uno o más cebadores ARMS seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.

Otro aspecto más de la presente invención corresponde al uso del método descrito en el presente documento, o el kit descrito en el presente documento, o los cebadores descritos en el presente documento, para el diagnóstico y/o pronóstico de un estado patológico en un paciente, en particular, de cáncer, así como para la predicción de respuesta de un paciente a terapia con anticuerpos anti-EGFR. En particular, si está presente una mutación KRAS en la muestra, entonces no es probable que el paciente responda a terapia anti-EGFR. Según esto, la invención se refiere también a un método in vitro para diagnosticar a un sujeto o valorar a un sujeto en cuanto a la quimioterapia apropiada, que comprende:

- (i) proporcionar una muestra de tumor del sujeto;
- (ii) determinar si está presente una mutación KRAS en la muestra aplicando los métodos descritos en el presente documento.

En un modo de realización, si está presente en la muestra una mutación KRAS, entonces se determina que no es apropiada una terapia que comprenda anti-EGFR.

En un modo de realización preferible, los tipos de muestras de ensayo que se pueden tratar según la presente invención son hisopos, biopsias embebidas en parafina, sangre, esputo, lavado colónico, lavado bronquial, así como solución salina, plasma y líquido cefalorraquídeo y cualquier otro fluido corporal o tejido obtenido de un individuo. El individuo es un ser humano.

La muestra de ensayo puede ser igualmente una secuencia de ácido nucleico que corresponda a la secuencia en la muestra de ensayo. Se puede amplificar toda o parte de la región de la muestra de ácido nucleico utilizando cualquier técnica conveniente, como por ejemplo PCR antes de aplicar el método de la presente invención.

En otro modo de realización preferible, la extracción del material genético se puede llevar a cabo mediante técnicas de extracción tanto automática como manual del estado de la técnica.

Un método de extracción de ADN especialmente preferible desde tejidos y otras muestras es el kit EZ1@DNA Tissue de QIAGEN. También es preferible producto AllPrep® DNA/RNA FFPE de QIAGEN diseñado para la purificación simultánea de ADN genómico y el total de ARN de secciones de tejido embebidas en parafina fijadas con formalina. Dentro de la presente invención se puede utilizar cualquier otra técnica y método para el tratamiento automático o manual de muestras para extraer ADN y otros ácidos nucleicos, conocidos entre las personas especializadas.

En un modo de realización preferible de la presente invención, el vaso en el que tiene lugar el método de la presente invención comprende, además del uno o más cebadores ARMS y el uno o más cebadores de amplificación, otros componentes para la amplificación del ADN presentes en la muestra. En particular, se incluyen también en la mezcla de reactivos de amplificación nucleótido trifosfatos como dATP, dCTP, dGTP, dTTP y una enzima adecuada para la polimerización.

Se puede utilizar cualquier enzima de polimerización conveniente. En particular, cualquier ADN polimerasa con capacidad para discriminar entre secuencias plantilla normales y mutantes en un grado significativo. Entre los ejemplos de enzimas convenientes se incluyen enzimas termoestables que no tienen actividad 3'-5'-exonucleasa significativa, y con velocidades de polimerización en torno a 10 nucleótidos/segundo, produciendo por tanto fragmentos de amplificación de 600-1000 pb en etapas de extensión normales. Preferiblemente, se puede utilizar ADN polimerasa HotStarTaq de QIAGEN, que usa un arranque en caliente mediado químicamente que, al contrario que los sistemas mediados por anticuerpo, conduce a una completa inactivación de la polimerasa hasta la etapa de activación de calor inicial. También se puede utilizar cualquier otra enzima con estas características conocida en el estado de la técnica. Por ejemplo, ADN polimerasa "Ampli Taq Gold" de PE Applied Biosystems.

La amplificación ARMS de las diferentes mutaciones KRAS de la presente invención se puede llevar a cabo en una reacción de amplificación individual o multiplex de dos o más de las mutaciones KRAS. En ambos casos es sobre todo preferible utilizar un kit de PCR Multiplex de QIAGEN para la amplificación ARMS, dentro de los métodos y los kits de la presente invención.

El método de la presente invención se puede llevar a cabo en uno o más vasos de reacción, comprendiendo cada vaso al menos un cebador ARMS de la presente invención, y al menos un cebador de amplificación, junto con otros reactivos para amplificación.

Las condiciones de ciclo térmico que funcionan bien incluyen los siguientes intervalos de temperatura y tiempos

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1 ciclo	95 °C	15'
≥40 ciclos (preferiblemente 40-42 ciclos)	94 °C	15-30" (preferiblemente 15")
	60-64 °C (preferiblemente 62 °C)	45-90" (preferiblemente 60")
1 ciclo	62-72 °C (preferiblemente 72°C)	6-12' (preferiblemente 10')
1 ciclo	4 °C	Ilimitado

La primera temperatura mencionada (es decir, 95 °C) puede denominarse "temperatura de activación"; la segunda temperatura mencionada (es decir, 94 °C) puede denominarse "temperatura de desnaturalización";

El siguiente intervalo de temperaturas que se menciona (es decir, aproximadamente 60 °C a aproximadamente 64 °C, preferiblemente, 62 °C) puede denominarse "temperatura de hibridación" que también es la temperatura a la que tiene lugar la extensión de los productos PCR;

El siguiente intervalo que se menciona después (es decir, aproximadamente 62 °C a aproximadamente 72 °C, preferiblemente, 72 °C) puede denominarse "temperatura de terminación";

Finalmente, la temperatura final 4 °C que se menciona, corresponde a la temperatura a la que los productos de PCR son estables.

Las condiciones de ciclo térmico que, tal como se ha demostrado, funcionan particularmente bien con muestras son:

NUMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1 ciclo	95 °C	15'
40 ciclos	94 °C	15"
	62 °C	60"
1 ciclo	72 °C	10'
1 ciclo	4 °C	Ilimitado

Se puede utilizar cualquier combinación posible de cebadores ARMS de la presente invención para la detección multiplex de una o más de las 9 mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu presentes en una muestra.

Por lo tanto, el vaso de reacción en el que tiene lugar el método de la presente invención puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de los cebadores ARMS seleccionados del grupo que comprende SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, así como uno o más cebadores de amplificación que se podrían combinar con los cebadores ARMS señalados para

amplificación de una o más de las 9 mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu presentes en una muestra.

5 En la mezcla de amplificación también se pueden incluir pares de cebadores adicionales, preferiblemente los que corresponden a los controles internos y/o extracción, de acuerdo con los diferentes aspectos de la invención.

Algunas combinaciones de cebador especialmente preferibles según los diferentes aspectos de la invención son las siguientes:

- 10 - Mezcla de amplificación 1: que comprende cebador ARMS Gly12Ser (SEQ ID NO: 10), cebador ARMS Gly12Asp (SEQ ID NO: 13), cebador ARMS Gly13Asp (SEQ ID NO: 16), "Cebador" de amplificación común Gly12Ser, Gly12Asp y Gly13Asp (SEQ ID NO: 19), cebador ARMS Gln61His (SEQ ID NO: 17), y "Cebador" de amplificación Gln61His (SEQ ID NO: 22).
- 15 - Mezcla de amplificación 2: que comprende cebador ARMS Gly12Cys (SEQ ID NO: 12), cebador ARMS Gly12Ala (SEQ ID NO: 14), "Cebador" de amplificación común Gly12Cys y Gly12Ala (SEQ ID NO: 20), cebador ARMS Gln61Leu (SEQ ID NO: 18), y "Cebador" de amplificación Gln61Leu (SEQ ID NO: 23).
- Mezcla de amplificación 3: que comprende cebador ARMS Gly12Arg (SEQ ID NO: 11), cebador ARMS Gly12Val (SEQ ID NO: 15), y "Cebador" de amplificación común Gly12Arg y Gly12Val (SEQ ID NO: 21).
- 20 - Mezcla de amplificación 4: que comprende cebador ARMS Gly12Cys (SEQ ID NO: 12), cebador ARMS Gly12Ala ARMS (SEQ ID NO: 14) y "Cebador" de amplificación común Gly12Cys y Gly12Ala (SEQ ID NO: 20).
- Mezcla de amplificación 5: que comprende cebador ARMS Gly12Arg (SEQ ID NO: 11), cebador ARMS Gly12Val (SEQ ID NO: 15), "Cebador" de amplificación común Gly12Arg y Gly12Val (SEQ ID NO: 21), cebador ARMS Gln61Leu (SEQ ID NO: 18) y "Cebador" de amplificación Gln61Leu (SEQ ID NO: 23).

25 Todas las diferentes mezclas de amplificación pueden contener adicionalmente cebadores directos e inversos para la amplificación de controles de extracción e internos.

30 Se ha demostrado que con el método de la presente invención se detectan fácilmente cantidades de ADN mutado con KRAS de 1 ng a 1 µg. En particular, se ha demostrado que con el método de la presente invención se detectan sin problema 5 µl de una línea celular con 200 ng/µl de ADN mutado, así como diluciones en serie de éste de hasta 0,2 ng/µl. El límite de detección del kit de la presente invención (kit CMA) es 1000 copias de KRAS mutante en una muestra de 5 µl. La sensibilidad del valor de detección del kit CMA es 1 % (véase ejemplo 2, más adelante).

35 En lo que se refiere a los parámetros de diagnóstico, el valor de Sensibilidad de Diagnóstico del kit CMA es de 92,31 % a 100 % para todas las mutaciones KRAS, con la excepción de la mutación KRAS G12C, cuyo valor de Sensibilidad de diagnóstico es 86,96 %.

40 El valor de Especificidad del kit CMA está comprendido entre 99 y 100 % para todas las mutaciones KRAS, siendo el valor de Especificidad de Diagnóstico de KRAS nativo 98,51 %. (En el Ejemplo 3 más adelante se puede encontrar información detallada de los Parámetros de Diagnóstico del kit CMA de acuerdo con la presente invención).

45 Se puede introducir un marcador en el producto de amplificación de ADN durante la amplificación ARMS para permitir una posterior detección; en particular, un marcador que proporcione una señal que pueda ser detectada por métodos colorimétricos, métodos fluorescentes o cualquier método de marcado conocido en la técnica. El marcador puede consistir en agentes radioactivos, quimioluminiscentes, luminiscentes y fluorescentes. En un aspecto preferible, el marcador que se utiliza es biotina. No obstante, se puede utilizar cualquier otra clase de marcador conocida en la técnica (p.ej. digoxigenina).

50 En un aspecto preferible, al menos uno de los cebadores utilizados está marcado en el extremo 5' con biotina. Preferiblemente, está marcado el cebador de amplificación.

55 Asimismo, el marcado del ADN amplificado puede conseguirse alternativamente añadiendo nucleótidos modificados que contienen una etiqueta (p. ej. derivados dUTP digoxigenina o biotinilados) en la mezcla de PCR. En determinados modos de realización, se pueden utilizar marcadores radioactivos, o fluoróforos.

Se pueden aplicar métodos alternativos que puedan dar cabida a la detección de la interacción entre cualquier producto de amplificación y su sonda correspondiente, conocidos entre los especialistas en la técnica, incluyendo métodos que impliquen marcado de la sonda.

60 En un modo de realización preferible de la presente invención, se incuban los productos de amplificación, previamente desnaturalizados, con sondas específicas de diana que se hibridan con los productos de amplificación al menos en la región que corresponde a la etiqueta 5' de los nucleótidos proporcionados por el cebador específico.

65 En un modo de realización preferible, la desnaturalización del ADN amplificado se puede realizar por calentamiento. Se pueden emplear también otras formas de preparar ADN monocatenario tras la amplificación; por ejemplo, medios químicos.

En un aspecto preferible, la muestra de ensayo que comprende ácidos nucleicos se divide en dos o más partes alícuotas, en las que:

- una de las partes alícuotas se somete a amplificación con una mezcla que comprende los cebadores de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 22 (Mezcla 1);
- otra parte alícuota se somete a amplificación con una mezcla que comprende los cebadores de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 23 (Mezcla 2),
- otra parte alícuota se somete a amplificación con una mezcla que comprende los cebadores de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 21 (Mezcla 3),

O alternativamente

- una de las partes alícuotas se somete a amplificación con la mezcla 1 anterior;
- otra parte alícuota se somete a amplificación con una mezcla que comprende los cebadores de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 20 (Mezcla 4),
- otra parte alícuota se somete a amplificación con una mezcla que comprende los cebadores de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23 (Mezcla 5).

El método comprende además la desnaturalización de cualquier producto de amplificación ARMS obtenido y la posterior hibridación de cualquiera de dichos productos con una micromatriz que comprende una o más sondas seleccionadas de SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55.

Preferiblemente, se proporcionan las sondas para la detección de productos de amplificación en una micromatriz. La tecnología de micromatriz permite la detección simultánea de diferentes productos de amplificación, que corresponden a una o más de las mutaciones KRAS presentes en una muestra, al tiempo que proporciona controles necesarios para asegurar la fiabilidad de los resultados.

Alternativamente, se incuba ADN monocatenario obtenido de uno o más productos de amplificación con varias sondas específicas de diana provistas en una micromatriz. En la micromatriz se proporciona al menos una, preferiblemente más de una sonda con capacidad para hibridarse con cada secuencia diana. En ciertos modos de realización de la invención se puede incubar el ADN monocatenario con sondas específicas de diana provistas en solución; no obstante, es preferible que las sondas estén dispuestas en una micromatriz.

De acuerdo con los diferentes aspectos descritos en el presente documento, las sondas están contenidas en una micromatriz, que puede estar colocada sobre un portaobjetos o contenida en un vaso de reacción, que se denomina entonces vaso matriz. Los vasos matriz pueden tener diferentes formatos de presentación, incluyendo vasos matriz individuales, como pocillos o tubos, o conjuntos de vasos de matriz dispuestos en tiras de pocillos o tubos o placas planas. Normalmente, las placas consisten en conjuntos de tiras de vasos de matriz. Por lo tanto, una micromatriz puede estar contenida en un vaso matriz individual. Alternativamente, dos o más micromatrices pueden estar contenidas en una tira de vasos. En un modo de realización preferible, la tira de vasos está constituida por 8 vasos. Asimismo, pueden estar dispuestos tres o más vasos de matriz en un conjunto de tira de vasos. En otro modo de realización preferible, el conjunto de tira de vasos es una placa de microtitulación. En otro modo de realización más, la placa de microtitulación está constituida por 96 vasos de matriz.

En modos de realización preferibles, se pueden inmovilizar las sondas sobre un soporte sólido pudiendo ser dicho soporte sólido el fondo del vaso de matriz o un soporte sólido diferente unido al fondo del vaso de matriz. Esto significa que la superficie de la micromatriz puede ser el fondo plano del vaso de matriz. Alternativamente, la superficie de la micromatriz puede ser un soporte sólido unido al fondo del vaso de matriz.

En uno de sus aspectos, el vaso de reacción tiene el tamaño normal de un vaso de reacción de laboratorio. Los volúmenes de llenado normales oscilan entre 100 µl y 2,5 ml, pero también pueden ser más bajos o más altos en modos de realización especiales. El vaso de reacción puede tener un volumen de llenado normal para un tubo Eppendorf normal de hasta 1,5 ml. Son volúmenes de llenado más preferidos hasta 0,4 ml, hasta 0,5 ml, hasta 0,7 ml, hasta 1,0 ml o hasta 2,0 ml.

Debido al marcado del ADN amplificado, siempre que las moléculas de muestra interactúen con las moléculas de sonda sobre la superficie de la micromatriz, un reactivo indicador se une al marcador y produce señales visibles que se pueden detectar mediante un dispositivo de detección. Se identifican las moléculas de la sonda y de la muestra que interactúan por el emplazamiento de la señal en la superficie de la micromatriz. En el caso particular en el que se marcan los productos de amplificación de la muestra con biotina, el agente indicador puede ser peroxidasa de rábano rusticano unida covalentemente a estreptavidina. Ésta se une específicamente a biotina, y la peroxidasa desencadena la precipitación de sustratos como tetrametilbencidina (TMB).

Se puede emplear cualquier otra reacción que tenga como resultado un precipitado en los elementos de matriz y que se pueda utilizar para detectar la interacción entre la diana y las moléculas de sonda de acuerdo con la presente invención.

5 Se puede emplear cualquier otro método de detección conocido en el estado de la técnica, como por ejemplo fluorescencia, para detectar la interacción entre los productos de amplificación y las sondas correspondientes. El método dependerá del marcado exacto de los productos de amplificación.

10 Las sondas se pueden obtener a través de diferentes métodos, tales como síntesis química (p.ej. por método fosfotriéster convencional) o técnicas de ingeniería genética, como por ejemplo por clonación molecular de plásmidos recombinantes en los que se han insertado las secuencias de nucleótido correspondientes y se pueden obtener después por digestión con nucleasas.

15 Las sondas o mezclas de sondas específicas para cada una de las 9 mutaciones KRAS se pueden inmovilizar en un solo emplazamiento del soporte sólido, en dos emplazamientos distintos del soporte sólido y en tres o más emplazamientos distintos del soporte sólido. Adicionalmente, se puede proporcionar una o más sondas de control en emplazamientos distintos.

20 En un modo de realización preferible, la visualización de las interacciones entre los productos de amplificación y sus correspondientes sondas específicas de KRAS o de control consiste en las siguientes etapas:

- Primera, se captura la imagen en la matriz utilizando un dispositivo óptico;
- A continuación, se analiza la imagen;
- Finalmente, se proporciona un informe que contiene una interpretación del resultado.

25 Preferiblemente, se analiza la imagen por medio de un software apropiado. Se puede utilizar cualquier dispositivo adecuado para dicho procesamiento.

30 La detección de las 9 mutaciones KRAS con el método de la presente invención es compatible con la detección de otras mutaciones en el gen KRAS, así como en lo tocante a otras mutaciones en otros genes pertinentes en cáncer. De hecho, el método de la presente invención se puede combinar con otros métodos de detección de mutaciones, en genes KRAS y/o en otros genes pertinentes en cáncer, para llevar a cabo un minucioso diagnóstico y/o pronóstico de cáncer.

35 El método de detección de las 9 mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu de la presente invención se puede aplicar a cualquier patología y cualquier muestra sospechosa de correlacionarse con mutaciones KRAS.

40 Para proporcionar una descripción más concisa, algunas de las expresiones cuantitativas dadas en el presente documento no se califican con el término "aproximadamente". Debe entenderse que, ya se utilice explícitamente o no el término "aproximadamente", cada una de las cantidades dadas en el presente documento debe interpretarse como el valor real dado, pretendiéndose también que se refiera a la aproximación de dicho valor dado, que se suele deducir de forma razonable en función de la especialización habitual en la técnica, que incluye equivalentes y aproximaciones como consecuencia de las condiciones experimentales y/o de medición para dicho valor dado.

45 Los ejemplos que se facilitan a continuación sirven meramente para ilustrar la invención y no limitan en modo alguno el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

50 Ejemplo 1:

Se preparó la siguiente mezcla de reactivos para amplificación ARMS multiplex de las mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Asp, Gly13Asp y Gln61His en muestras /líneas celulares/clones (Multiplex 1):

Reactivos Multiplex 1	Concentración de reserva (µM)	Concentración final (µM)
Mezcla maestra PCR Multiplex 2X QIAGEN	2x	1x
Cebador ARMS SEQ ID NO: 10	50	0,20
Cebador ARMS SEQ ID NO: 13	50	0,20
Cebador ARMS SEQ ID NO: 16	50	0,20
Cebador amplificación SEQ ID NO: 19 (marcado con biotina)	50	1,00
Cebador ARMS SEQ ID NO: 17	50	0,20

ES 2 614 816 T3

Cebador amplificación SEQ ID NO: 22 (marcado con biotina)	50	0,80
H2O		Hasta 45 ul

De la misma forma, se prepararon también mezclas de reactivos correspondientes a Multiplex 4 y Multiplex 5.

El volumen total por tubo era de 45 µl.

5

A continuación, se añadieron 5 µl de un total de eluato de 30 µl obtenidos de secciones de tejido embebidas en parafina (muestra), o de los clones indicados, hasta un volumen de reacción final de 50 µl.

Tubo	Muestra/ Clon	Mutación	Multiplex
1	Muestra	G12S	1
2	Muestra	G12R	5
3	Muestra	G12D	1
4	Clon 10e5	G12C	4
5	Muestra	G12V	5
6	Clon10e5	G12A	4
7	Muestra	G13D	1
8	Muestra	Q61L	5
9	Clon10e4	Q61H	1
10	H2O	Control negativo	5

10 Las condiciones del ciclo térmico de la PCR fueron:

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1 ciclo	95 °C	15'
40 ciclos	94 °C	15"
	62 °C	60"
1 ciclo	72 °C	10'
1 ciclo	4 °C	Ilimitado

15 En la Figura 3 se presentan los resultados de las diferentes amplificaciones ARMS Multiplex. Se visualizaron los diferentes productos ARMS en gel de agarosa al 2 %, analizándose los productos de las diferentes reacciones de amplificación. En estos experimentos, se ha comprobado que la amplificación ARMS solamente tiene lugar cuando se somete la muestra amplificación ARMS, es decir muestra/ clon/ línea celular, que corresponde a una de las mutaciones KRAS para la que se han incluido los cebadores ARMS en la mezcla de reactivos utilizada para amplificación Multiplex.

20 Tal como se puede observar en la Figura 3, los productos de amplificación ARMS que corresponden a las diferentes mutaciones están presentes en pocillos de muestras o clones de dichas mutaciones; se ha confirmado también por secuenciación de ADN que los productos ARMS obtenidos son el resultado realmente de la amplificación específica de la muestra o clon con el correspondiente cebador ARMS.

25 Se ha confirmado asimismo que no se pudo encontrar ningún producto de amplificación ARMS en las muestras/ clones/ líneas celulares correspondientes a las mutaciones no incluido en cada Multiplex (no se muestra). Por consiguiente, la amplificación ARMS en cada Multiplex es específica.

30 Se desnaturalizaron e hibridaron los diferentes productos de amplificación ARMS Multiplex con micromatrices de sondas. En la Figura 4 se presenta la visualización de los resultados correspondientes.

35 Se ha comprobado asimismo que la inclusión de los cebadores directos e inversos que son necesarios para la amplificación de control interno y de control de extracción, así como un plásmido como PPG44, necesario también para la amplificación de control interno, a las concentraciones que se presentan a continuación, no altera los resultados obtenidos:

Reactivos Multiplex1/ 2/ 3/ 4/ 5	Concentración de reserva (µM)	Concentración final (µM)
Cebador directo IC	50	0,20

Cebador inverso CI (marcado con biotina)	50	0,20
Cebador directo CE	50	0,20
Cebador inverso (marcado con biotina)	50	0,20
Plásmido PPG44	7,5 fg	0,25
CI: Control interno; CE: Control de extracción		

Ejemplo 2

5 Se prepararon clones de diferentes mutaciones KRAS y se ensayó la detección de diferentes diluciones de estos clones, tanto con el kit de la presente invención (CMA) como con un kit de referencia (Kit mutación K-RAS TheraScreen® de Qiagen).

10 Las diluciones sometidas a ensayo incluyeron 100.000; 10.000; 1000; 100 y 10 copias en 5 µl de clones de diferentes mutaciones KRAS. En la Figura 5 se pueden encontrar algunos de los resultados representativos de esta comparación entre los kits CMA y TheraScreen.

15 Básicamente, la dilución que corresponde a 1000 copias de cualquiera de las mutaciones KRAS fue detectada sin problema con el kit CMA. En la Figura 5a) se presenta el resultado obtenido con 1000 copias en 5 µl del clon de mutación KRAS G12R.

20 En la Figura 5b) se muestran los resultados de la detección de 10, 100 y 1000 copias de clon KRAS G12R con el equipo de referencia, TheraScreen de Qiagen. El kit TheraScreen de Qiagen se basa en ensayos Scorpions en tiempo real. Estos ensayos emplean el número de ciclos PCR necesario para detectar una señal fluorescente por encima de una señal de fondo, como medida de las moléculas diana presentes al comienzo de la reacción. El punto en el cual se detecta la señal por encima de la fluorescencia del fondo se denomina "umbral de ciclo" (Ct, *cycle threshold*).

25 Los valores ΔCt de la muestra se calculan como la diferencia entre el Ct del ensayo de mutación y el Ct del ensayo de control de la misma muestra. Las muestras se clasifican como positivas para la mutación si dan un ΔCt de menos de 1 % del valor ΔCt para ese ensayo. Por encima de este valor, la muestra puede contener o bien menos de un 1 % de mutación (más allá del límite de los ensayos) o bien la muestra es negativa para mutación.

30 El kit TheraScreen de Qiagen depende también de un Software LightCycler® 480 Adapt que calcula valores ΔCt y determina si la muestra es positiva o negativa a la mutación en función del 1 % de los valores de corte que son diferentes para cada mutación KRAS:

	<u>Ensayo 1</u>	<u>% delta Ct</u>
35	12ALA	6,25
	12ASP	7,72
	12ARG	6,83
	12CYS	6,95
	12SER	8,95
	12VAL	6,50
40	13ASP	9,09

45 A partir del gráfico presentado en 4b), se obtuvieron los valores Ct correspondientes a 10, 100 y 1000 copias de clon KRAS G12R. Los correspondientes a 10 y 100 copias de clon KRAS G12R fueron mucho más largos, proporcionando un resultado positivo con el kit TheraScreen de Qiagen únicamente la dilución correspondiente a 1000 copias de clon KRAS G12R en 5 µl.

La figura 5c) es una Tabla con los diferentes resultados obtenidos con kits CMA y TheraScreen, para diferentes diluciones de clones que corresponden a las diferentes mutaciones KRAS indicadas.

50 En lo que se refiere a los resultados del kit TheraScreen, se presentan los valores Ct que corresponden a las diferentes mutaciones KRAS. En lo que se refiere a los resultados con el kit CMA, "+" y "-" representan resultados de detección positivos y negativos, respectivamente.

55 Los resultados de los experimentos de la presente invención se pueden resumir en que el límite de detección del kit CMA es 1000 copias de KRAS mutante en 5 µl, siendo también el límite de detección del kit TheraScreen 1000 copias en 5 µl para la mayoría de las mutaciones KRAS. Las capacidades de detección de los kits CMA y TheraScreen son por tanto equivalentes, siendo comparable la sensibilidad del valor de detección del kit CMA a la del kit TheraScreen, siendo el valor del 1 %.

Ejemplo 3

Se obtuvieron los parámetros de diagnóstico, incluyendo sensibilidad de diagnóstico, especificidad de diagnóstico, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, del kit CMA de la presente invención para diferentes mutaciones KRAS. El número total de muestras que fue sometido a ensayo fue de 376 muestras reales.

Mutación KRAS	N=376	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
G12A	25	96,00	99,48	92,31	99,74
G12C	23	86,96	100,00	100,00	99,23
G12D	68	98,53	99,71	98,53	99,71
G12V	52	92,31	100,00	100,00	98,89
G12R	7	100,00	99,75	87,50	100,00
G12S	25	96,00	100,00	100,00	99,74
G13D	39	92,31	100,00	100,00	99,19
Q61H	3	100,00	100,00	100,00	100,00
Q61L	2	100,00	100,00	100,00	100,00
Nativo	132	ND	98,51	ND	97,06

ND: No determinado. No tiene sentido determinar la sensibilidad y los valores PPV en caso de KRAS nativo.

Ejemplo 4

Se sometieron a amplificación individualmente 1 ng de línea celular NCI-H460 (Gly12Ser negativo), 1 ng de línea celular HCT 116 (Gly12Ser negativo) y 1 ng de línea celular A549 (Gly12Ser positivo) con una mezcla de amplificación que comprendió cebadores ARMS y de amplificación correspondientes a la mutación KRAS Gly12Ser.

Las condiciones de ciclo térmico que se utilizaron fueron las siguientes:

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1 ciclo	95 °C	15'
40 ciclos	94 °C	15"
	54 °C o 62 °C	60"
1 ciclo	72 °C	10'
1 ciclo	40 °C	Ilimitado

En la figura 6, más adelante, se presenta el análisis de los productos de amplificación que corresponden a la mutación KRAS Gly12Ser, obtenidos a dos temperaturas de hibridación diferentes, 54 °C y 62 °C, tal como se visualizan tras electroforesis en gel de agarosa.

Tal como se puede observar en la figura 6, la especificidad de amplificación de la mutación KRAS Gly12Ser solamente se consigue en condiciones de amplificación cuya temperatura de hibridación es 62 °C, mientras que en unas condiciones de amplificación cuya temperatura de hibridación es 54 °C, tiene lugar una amplificación de Gly12Ser no específica.

Por lo tanto, mientras que a una temperatura de hibridación de 62 °C, solamente la línea celular positiva para Gly12Ser, A549, rinde el producto de amplificación que corresponde a Gly12Ser, y las otras dos líneas celulares que son negativas para Gly12Ser (NCI-H460 y HCT 116) no rinden ese producto de amplificación, a la temperatura de hibridación de 54 °C las tres líneas celulares proporcionan un producto de amplificación que corresponde a Gly12Ser. La presencia del producto de amplificación que corresponde a Gly12Ser en las líneas celulares negativas para Gly12Ser se debe a una amplificación no específica.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENOMICA S.A.U.

<120> Método para la detección de mutaciones KRAS

<130> PC926820WO

<160> 55

<170> PatentIn versión 3.3

ES 2 614 816 T3

<210> 1
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> secuencia 3' de cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Ser, siendo la secuencia específica de diana
10
<400> 1
ctgaatataa acttggtgta gttggcgcta 30

<210> 2
<211> 27
15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia 3' de cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Arg, siendo la secuencia específica de diana
20
<400> 2
cgtaaggca ctctgccta cgacacg 27

<210> 3
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
25

<220>
<223> secuencia 3' de cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Cys, siendo la secuencia específica de diana
30
<400> 3
ctgaatataa acttggtgta gttggagatt 30
35

<210> 4
<211> 31
<212> ADN
40
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia 3' de cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Asp, siendo la secuencia específica de diana
45
<400> 4
ctgaatataa acttggtgta gttggagccg a 31

<210> 5
<211> 31
<212> ADN
50
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia 3' de cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Ala, siendo la secuencia específica de diana
55
<400> 5
ctgaatataa acttggtgta gttgcagatg c 31
60

<210> 6
<211> 26
<212> ADN
65
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 614 816 T3

<223> secuencia 3' de cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Val, siendo la secuencia específica de diana

<400> 6

5 cgtaaggca ctctgccta cggcaa 26

<210> 7

<211> 34

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia 3' de cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly13Asp, siendo la secuencia específica de diana

15

<400> 7

ctgaataaa acttggtgta gttggagctg ggga 34

<210> 8

20 <211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> secuencia 3' de cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gln61His, siendo la secuencia específica de diana

<400> 8

30 tggccctca tgcactgta ctccaca 27

<210> 9

<211> 23

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia 3' de cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gln61Leu, siendo la secuencia específica de diana

40

<400> 9

gatattctcg acacagcagt tct 23

<210> 10

<211> 47

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Ser

50

<400> 10

aaggataatt aattaatctg aatataaact tgtgtagtt ggcgcta 47

<210> 11

55 <211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Arg

<400> 11

aatattgagg ctgcagccgt caaggcactc tgcctacga cacg 44

65

<210> 12

<211> 49

ES 2 614 816 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Cys

<400> 12
ggctagctag ccgcggtagc tgaatataaa cttgtggtag ttggagatt 49

10 <210> 13
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Asp

<400> 13
cggatttgg gcaacctgct gaatataaac ttgtggtagt ttggagccga 49

20 <210> 14
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Ala

30 <400> 14
gaatccatgt gatgactgc tgaatataaa cttgtggtag ttgcagatgc 50

<210> 15
<211> 45
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Val

40 <400> 15
tcaggcggcc aggatggagc gtcaaggcac tcttcctac ggcaa 45

<210> 16
<211> 53
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly13Asp

50 <400> 16
ccgagacgtt cgacactgcc tgaatataaa cttgtggtag ttggagctgg gga 53

<210> 17
<211> 47
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gln61His

60 <400> 17
ttaggctctg aactcggcgt tggccctca ttgcactgta ctccaca 47

65 <210> 18
<211> 42

ES 2 614 816 T3

- <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
5 <223> cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gln61Leu
- <400> 18
ggccacttac cgggatccag atattctcga cacagcagtt ct 42
- 10 <210> 19
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 15 <220>
<223> Cebador de amplificación a usar en combinación con cualquiera de los cebadores ARMS que comprende SEQ ID N° 1, 4, 7 o cebadores ARMS que consisten en SEQ ID N° 10, 13, 16
- 20 <400> 19
ggtcctgcac cagtaatatg ca 22
- <210> 20
<211> 22
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
30 <223> Cebador de amplificación a usar en combinación con cualquiera de los cebadores ARMS que comprende SEQ ID N° 3, 5 o cebadores ARMS que consisten en SEQ ID N° 12, 14
- <400> 20
35 ggtcctgcac cagtaatatg ca 22
- <210> 21
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> Cebador de amplificación a usar en combinación con cualquiera de los cebadores ARMS que comprende SEQ ID N° 2, 6 o cebadores ARMS que consisten en SEQ ID N° 11, 15
- 45 <400> 21
ggtggagtat ttgatagtgt a 21
- <210> 22
<211> 24
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
55 <223> Cebador de amplificación a usar en combinación con cualquiera de los cebadores ARMS que comprende SEQ ID N° 8 o cebador ARMS que consiste en SEQ ID N° 17
- <400> 22
60 gtttctccct tctcaggatt ccta 24
- <210> 23
<211> 24
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 614 816 T3

<220>
<223> Cebador de amplificación a usar en combinación con cualquiera de los cebadores ARMS que comprende SEQ ID N° 9 o cebador ARMS que consiste en SEQ ID N° 18

5 <400> 23
gggatattac ctacctcata aaca 24

10 <210> 24
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> secuencia 5'222 del cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Ser, no siendo la secuencia específica de diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de la mutación KRAS Gly12Ser.

20 <400> 24
aaggataatt aattaat 17

25 <210> 25
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> secuencia 5'222 del cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Arg, no siendo la secuencia específica de diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de la mutación KRAS Gly12Arg

35 <400> 25
aatattgagg ctgcagc 17

40 <210> 26
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> secuencia 5'222 del cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Cys, no siendo la secuencia específica de diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de la mutación KRAS Gly12Cys

50 <400> 26
ggctagctag ccgcggtag 19

55 <210> 27
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> secuencia 5'222 del cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Asp, no siendo la secuencia específica de diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de la mutación KRAS Gly12Asp

65 <400> 27
cggatattgg gcaacctg 18

<210> 28
<211> 19

ES 2 614 816 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> secuencia 5\222 del cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Ala, no siendo la secuencia específica de diana.
Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de la mutación KRAS Gly12Ala

10 <400> 28
gaatccatgt gatgacttg 19

<210> 29
<211> 19
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> secuencia 5\222 del cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly12Val, no siendo la secuencia específica de diana.
Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de la mutación KRAS Gly12Val

25 <400> 29
tcaggcggcc aggatggag 19

<210> 30
<211> 19
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> secuencia 5\222 del cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gly13Asp, no siendo la secuencia específica de diana.
Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de la mutación KRAS Gly13Asp

40 <400> 30
ccgagacgtt cgacactgc 19

<210> 31
<211> 20
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> secuencia 5\222 del cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gln61His, no siendo la secuencia específica de diana.
Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de la mutación KRAS Gln61His

55 <400> 31
ttagctctg aactcggcgt 20

<210> 32
<211> 19
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>
65 <223> secuencia 5\222 del cebador ARMS para la amplificación de la mutación KRAS Gln61Leu, no siendo la secuencia específica de diana.
Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de la mutación KRAS Gln61Leu

<400> 32

ES 2 614 816 T3

ggccacttac cgggatcca 19

5 <210> 33
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Ser

15 <400> 33
gcttgccccg gggaaggata attaattaat 30

20 <210> 34
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Ser

30 <400> 34
ccccggggaa ggataattaa ttaat 25

35 <210> 35
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Arg

45 <400> 35
ttcgccgggt taccgggaa tattgaggct gcagc 35

50 <210> 36
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Arg

60 <400> 36
cgggttaccg gggaatattg aggctgcagc 30

65 <210> 37
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

70 <220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Cys

75 <400> 37
ggctagctag ccgcgtagc tgaat 25

80 <210> 38
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 614 816 T3

<220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Cys

5 <400> 38
cgaggccttg gccggctagc tagccgcggt agctgaat 38

<210> 39
<211> 32
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Cys

15 <400> 39
cgaggccttg gccggctagc tagccgcggt ag 32

<210> 40
<211> 33
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Cys

25 <400> 40
30 ccttgcccg ctagctagcc gcggtagctg aat 33

<210> 41
<211> 27
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Cys

40 <400> 41
ccttgcccg ctagctagcc gcggtag 27

<210> 42
<211> 31
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Asp

50 <400> 42
55 gctgccccg gggcgtatt tggcaacct g 31

<210> 43
<211> 26
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Asp

65 <400> 43
ccccgggcg gtattgggc aacctg 26

ES 2 614 816 T3

<210> 44
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Ala
10
<400> 44
gaatccatgt gatgactg 19
<210> 45
<211> 24
15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Ala
20
<400> 45
gaatccatgt gatgactga ctg 24
25
<210> 46
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
30
<220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Ala
35
<400> 46
cgggttacc gggagtctcg aatccatgtg atgactg 38
<210> 47
<211> 32
<212> ADN
40
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Ala
45
<400> 47
cgggttacc ggggaatcca tgtgatgact tg 32
50
<210> 48
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
55
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Val
<400> 48
tcaggcggcc aggatggagc tgaat 25
60
<210> 49
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
65
<220>

ES 2 614 816 T3

<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly12Val

5 <400> 49
cgggttaccg gggtcaggcg gccaggatgg ag 32

<210> 50
<211> 25
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gly13Asp

15 <400> 50
ccgagacggt cgacactgcc tgaat 25

<210> 51
<211> 33
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gln61His

<400> 51
30 cgggttaccg gggtaggct ctgaactcgg cgt 33

<210> 52
<211> 39
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gln61His

40 <400> 52
cgggttaccg gggagtctct taggctctga actcggcgt 39

<210> 53
<211> 32
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gln61Leu

<400> 53
cgggttaccg gggggccact taccgggatc ca 32

55 <210> 54
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Sonda para detección del producto de amplificación ARMS de la mutación KRAS Gln61Leu

65 <400> 54
cgggttaccg gggagtctcg gccactacc gggatcca 38

ES 2 614 816 T3

<210> 55
<211> 241
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> Fragmento de ADN que contiene las posiciones que dan lugar a las 7 mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val y Gly13Asp

10 <400> 55

```
ggtggagtat ttgatagtgt attaacctta tgtgtgacat gttctaatat agtcacattt      60
tcattatfff tattataagg cctgctgaaa atgactgaat ataaacttgt ggtagttgga      120
gctggtggcg taggcaagag tgccttgacg atacagctaa ttcagaatca ttttgtggac      180
gaatatgata caacaataga ggtaaatcct gttttaatat gcatattact ggtgcaggac      240
c                                                                              241
```

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para detectar una o más mutaciones KRAS seleccionadas de Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His yGln61Leu en una muestra de ensayo que comprende ácido nucleico, comprendiendo dicho método someter la muestra a amplificación con una mezcla que comprende uno o más cebadores ARMS seleccionados de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente, comprendiendo además la mezcla de amplificación uno o más cebadores de amplificación.

10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la temperatura de hibridación que se utiliza en la reacción de amplificación PCR es desde aproximadamente 60 °C hasta aproximadamente 64 °C.

15 3. El método de las reivindicaciones 1 y 2, en el que las condiciones de ciclo térmico de la amplificación PCR se seleccionan de:

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1 ciclo	95 °C	15'
≥40 ciclos (preferiblemente 40-42 ciclos)	94 °C	15-30" (preferiblemente 15")
	60-64 °C (preferiblemente 62 °C)	45-90" (preferiblemente 60")
1 ciclo	62-72 °C (preferiblemente 72 °C)	6-12' (preferiblemente 10')
1 ciclo	4 °C	Ilimitado

20 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el uno o más cebadores de amplificación que se combinan con uno o más cebadores ARMS comprenden de 17 a 35 nucleótidos y son tales que, al combinarse con uno o más cebadores ARMS, la amplificación tiene como resultado uno o más productos de 1000 pb o menos.

25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el cebador de amplificación se selecciona de uno o más de:

- Un cebador que comprende o que consiste en SEQ ID NO: 19, para la amplificación con uno o más de los cebadores ARMS de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 16.

- Un cebador que comprende o que consiste en SEQ ID NO: 20, para la amplificación con uno o dos de los cebadores ARMS de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14.

- Un cebador que comprende o consiste en SEQ ID NO: 21, para la amplificación con uno o dos de los cebadores ARMS de SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 15.

30 - Un cebador que comprende o que consiste en SEQ ID NO: 22, para la amplificación con el cebador de SEQ ID NO: 17.

- Un cebador que comprende o que consiste en SEQ ID NO: 23, para la amplificación con el cebador de SEQ ID NO: 18.

35 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se usan una, dos, tres, cuatro o cinco de las siguientes combinaciones de cebador seleccionadas de:

SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 22 (Mezcla 1);

SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 23 (Mezcla 2);

40 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 21 (Mezcla 3);

SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 20 (Mezcla 4); y

SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23 (Mezcla 5).

45 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el uno o más de los productos de amplificación obtenidos se ponen en contacto con una o más sondas, hibridándose específicamente cada sonda con la región del producto correspondiente a la secuencia etiqueta 5' del cebador ARMS correspondiente.

50 8. El método de la reivindicación 7, en el que la una o más sondas con las que se ponen en contacto los productos de amplificación tienen una longitud de 17 a 39 nucleótidos, correspondiendo la región de la sonda que se hibrida específicamente con la región en el producto, a la secuencia etiqueta 5' del cebador ARMS.

55 9. El método de las reivindicaciones 7 u 8, en el que la una o más sondas comprenden secuencias seleccionadas de SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la una o más sondas se seleccionan de SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID

NO: 54 y SEQ ID NO: 55.

5 11. Un kit para detectar una o más mutaciones KRAS seleccionadas de Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu en una muestra de ensayo que comprende ácido nucleico, comprendiendo dicho kit una o más mezclas de reactivos para amplificación de ácido nucleico, comprendiendo cada muestra:

10 - uno o más cebadores ARMS seleccionados de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente, y
 - uno o más cebadores de amplificación,

15 comprendiendo el kit además una micromatriz en la que se inmovilizan una o más sondas que se unen específicamente a los productos ARMS de una o más de las mutaciones KRAS Gly12Ser, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61His y Gln61Leu, hibridándose específicamente cada sonda con la región del correspondiente producto ARMS complementario a la secuencia etiqueta 5' del cebador ARMS correspondiente.

20 12. El kit de la reivindicación 11 en el que una o más sondas tienen una longitud comprendida entre 17 a 39 nucleótidos y comprenden secuencias seleccionadas de SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32.

13. El kit de las reivindicaciones 11 y 12 que comprende una o más de las siguientes mezclas de amplificación:

25 - Mezcla de amplificación que comprende cebadores de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 22 (Mezcla 1);
 - Mezcla de amplificación que comprende cebadores de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 23 (Mezcla 2);
 - Mezcla de amplificación que comprende cebadores de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 21 (Mezcla 3);
 30 - Mezcla de amplificación que comprende cebadores de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 20 (Mezcla 4); y
 - Mezcla de amplificación que comprende cebadores de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23 (Mezcla 5);

35 y comprendiendo dicho kit además

40 - Una micromatriz que comprende una o más de las sondas seleccionadas de SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 , SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55.

45 14. Un cebador ARMS seleccionado de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.

50 15. Uso del método de detección de mutaciones KRAS de las reivindicaciones 1 a 10, o del kit de las reivindicaciones 11 a 13, o de los cebadores de la reivindicación 14, para el diagnóstico *in vitro* y/o el pronóstico de un estado patológico en un paciente, o para la predicción *in vitro* de la respuesta de un paciente a terapia con anticuerpos anti EGFR.

Figura 1.

a)

5'GGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACCTTAIGTGTGACATGTTCTAATATAGTCA
CATTTTCAITATTTTTATTATAAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGG
TAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATC
ATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCTTGTTTTAATATGCATAT
TACTGGTGCAGGACC 3'

b)

Gly12Ser: AGTGG

Gly12Arg: CGTGG

Gly12Cys: TGTGG

Gly12Asp: GATGG

Gly12Ala: GCTGG

Gly12Val: GTTGG

Gly13Asp: GGTGA

Figura 2

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
1	Secuencia 3' de cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Ser, siendo la secuencia específica de diana	ctgaatataaacttggttagtggcgcta
2	Secuencia 3' de cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Arg, siendo la secuencia específica de diana	cgtaaggcactcttgctacgacacg
3	Secuencia 3' de cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Cys, siendo la secuencia específica de diana	ctgaatataaacttggttagtggagatt
4	Secuencia 3' de cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Asp, siendo la secuencia específica de diana	ctgaatataaacttggttagtggagccga
5	Secuencia 3' de cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Ala, siendo la secuencia específica de diana	ctgaatataaacttggttagtgcagatgc
6	Secuencia 3' de cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Val, siendo la secuencia específica de diana	cgtaaggcactcttgctacggcaa
7	Secuencia 3' de cebador ARMS para amplificación de	ctgaatataaactgfggttagtggagctgggga

	mutación KRAS Gly13Asp, siendo la secuencia específica de diana	
8	Secuencia 3' de cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gln61His, siendo la secuencia específica de diana	tggtcctcattgcactgtactccaca
9	Secuencia 3' de cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gln61Leu, siendo la secuencia específica de diana	gatattctcgacacagcagttct
10	Cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Ser	aaggataattaattaatctgaataaaactgtggtagttg gcgcta
11	Cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Arg	aatattgaggctgcagccgtcaaggcactcttgctac gacacg
12	Cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Cys	ggctagctagccgctgtagctgaatataaactgtggt agttggagatt
13	Cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Asp	cggtatttgggcaacctgctgaatataaactgtggtagt tggagccga
14	Cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Ala	gaatccatgtgatgacttgctgaatataaactgtggtag ttgcagatgc
15	Cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Val	tcaggcgccaggatggagcgtcaaggcactcttgcc tacggcaa
16	Cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly13Asp	ccgagacgttcgacactgctgaatataaactgtggtgta gttggagctgggga
17	Cebador ARMS para amplificación de	ttaggctctgaactcggcggttgccctcattgcactgtac tccaca

	mutación KRAS Gln61His	
18	Cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gln61Leu	ggccacttaccgggatccagatattctcgacacagcag ttct
19	Cebador de amplificación que se usa en combinación con cualquiera de los cebadores que comprenden las SEQ ID NO: 1, 4, 7 o cebadores ARMS que consisten en SEQ ID NO: 10, 13, 16	ggtcctgcaccagtaatatgca
20	Cebador de amplificación que se usa en combinación con cualquiera de los cebadores que comprenden las SEQ ID NO: 3, 5, o cebadores ARMS que consisten en SEQ ID NO: 12, 14	ggtcctgcaccagtaatatgca
21	Cebador de amplificación que se usa en combinación con cualquiera de los cebadores que comprenden las SEQ ID NO: 2, 6 o cebadores ARMS que consisten en SEQ ID NO: 11, 15	ggtggagtattgatagtgta
22	Cebador de amplificación que se usa en combinación con cualquiera de los cebadores que comprenden las SEQ ID NO: 8 o cebadores ARMS que consisten en SEQ ID NO: 17	ggtctccctctacaggattccta
23	Cebador de amplificación que se usa en combinación con cualquiera de los cebadores que comprenden las SEQ ID NO: 9 o cebadores	gggatattacctacctcataaaca

	ARMS que consisten en SEQ ID NO: 18	
24	Secuencia 5' de cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Ser, no siendo la secuencia específica de diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de mutación KRAS Gly12Ser	aaggataattaattaat
25	Secuencia 5' de cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Arg no siendo la secuencia específica de diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de mutación KRAS Gly12Arg	aatattgaggctgcagc
26	Secuencia 5' de cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Cys, no siendo la secuencia específica de diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de mutación KRAS Gly12Cys	ggctagctagccgcggtag
27	Secuencia 5' de cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Asp, no siendo la secuencia específica de diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de mutación KRAS Gly12Asp	cggtatttgggcaacctg
28	Secuencia 5' de cebador ARMS para amplificación de	gaatccatgtgatgacttg

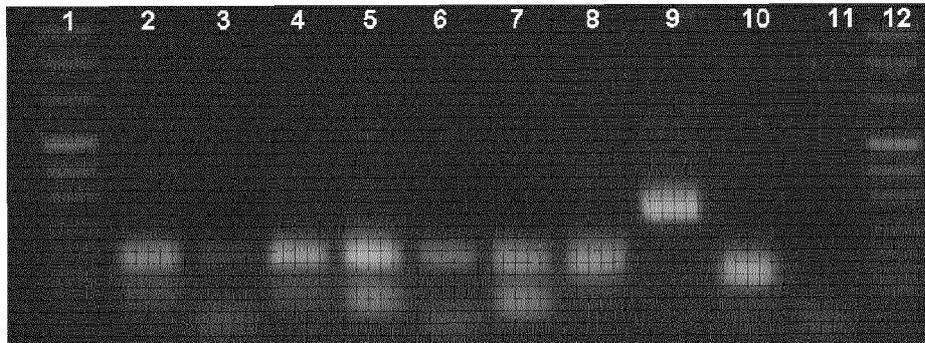
	mutación KRAS Gly12Ala, no siendo la secuencia específica de diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de mutación KRAS Gly12Ala	
29	Secuencia 5' de cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly12Val, no siendo la secuencia específica de diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de mutación KRAS Gly12Val	tccggcggccaggatggag
30	Secuencia 5' de cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gly13Asp, no siendo la secuencia específica de diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de mutación KRAS Gly13Asp	ccgagacggtcgacactgc
31	Secuencia 5' de cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gln61His, no siendo la secuencia específica de diana. Esta secuencia también está presente en la sonda de detección de mutación KRAS Gln61His	ttaggctctgaactcggcgt
32	Secuencia 5' de cebador ARMS para amplificación de mutación KRAS Gln61Leu, no siendo la secuencia específica de diana. Esta secuencia también está presente	ggccacttaccgggatcca

	en la sonda de detección de mutación KRAS Gln61Leu	
33	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Ser	gcttgccccggggaaggataattaattaat
34	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Ser	cccggggaaggataattaattaat
35	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Arg	ttcgccgggttaccgggaatattgaggctgcagc
36	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Arg	cgggttaccgggaatattgaggctgcagc
37	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Cys	ggctagctagccgcggtagctgaat
38	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Cys	cgaggccttgccgggtagctagccgcggtagctgaa t
39	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Cys	cgaggccttgccgggtagctagccgcggtag
40	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Cys	ccttgccgggtagctagccgcggtagctgaat
41	Sonda de detección del producto	ccttgccgggtagctagccgcggtag

	de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Cys	
42	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Asp	gctgccccggggcggtattgggcaacctg
43	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Asp	ccggggcggtattgggcaacctg
44	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Ala	gaatccatgtgatgacttg
45	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Ala	gaatccatgtgatgacttgacctg
46	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Ala	cgggttaccgggagctcgaatccatgtgatgacttg
47	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Ala	cgggttaccggggaatccatgtgatgacttg
48	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Val	tcaggcggccaggatggagctgaat
49	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly12Val	cgggttaccgggtcaggcggccaggatggag
50	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gly13Asp	ccgagacggttcgacactgcctgaat
51	Sonda de detección del	cgggttaccgggttaggctctgaactcggcgt

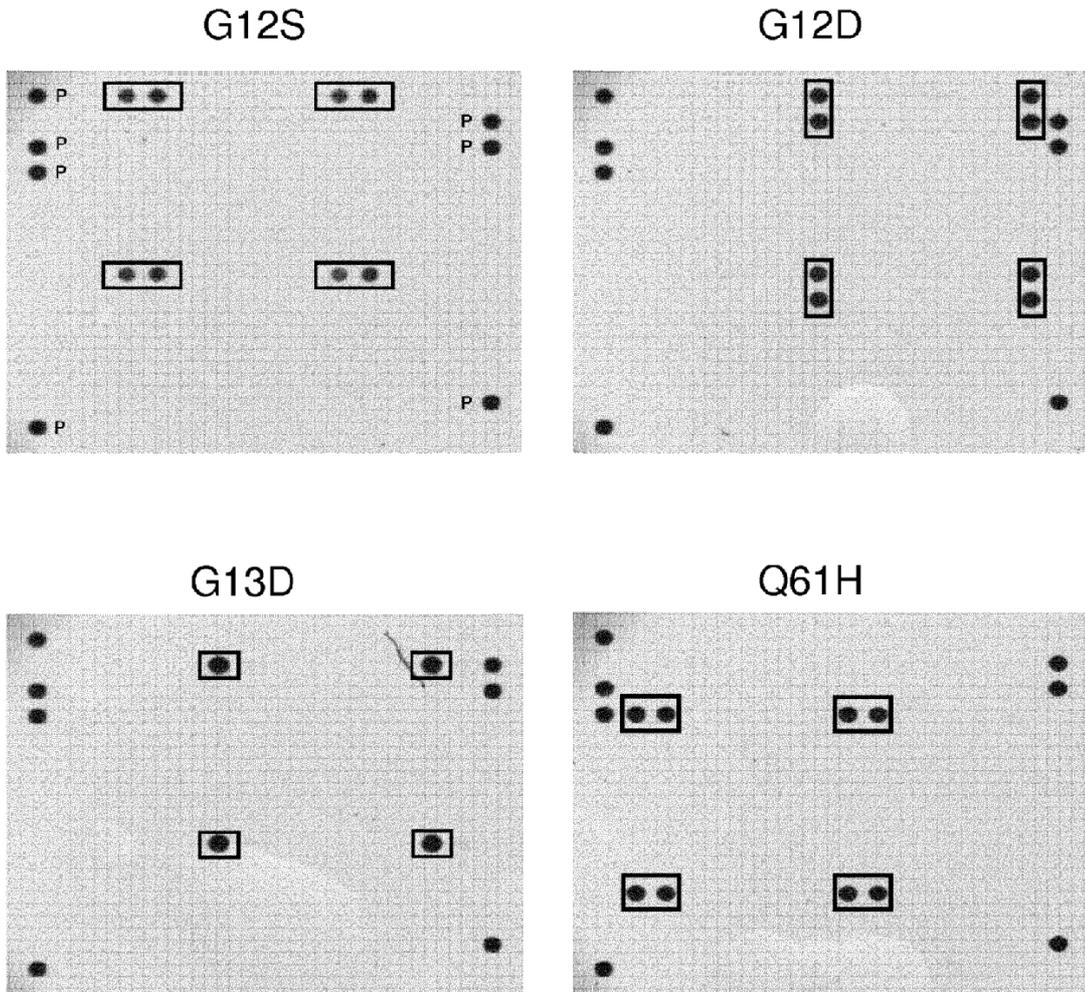
	producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gln61His	
52	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gln61His	cgggttaccgaggagtctcttaggctctaactcggcgt
53	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gln61Leu	cgggttaccggggccactaccgggatcca
54	Sonda de detección del producto de amplificación ARMS de mutación KRAS Gln61Leu	cgggttaccgaggagtctcggccactaccgggatcca

Figura 3.

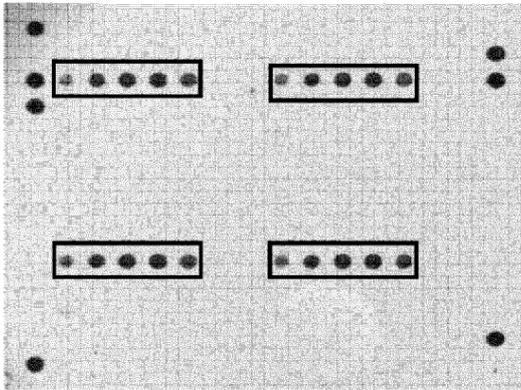


Tubo	Muestra/Clon	Resultado
1	Marcador de Peso molecular	Bandas bien definidas. Marcador de peso molecular VIII de Roche
2	Muestra G12S (Multiplex 1)	Banda específica de mutación
3	Muestra G12R (Multiplex 5)	Banda específica de mutación
4	Muestra G12D (Multiplex 1)	Banda específica de mutación
5	Clon 10e5 G12C (Multiplex 4)	Banda específica de mutación
6	Muestra G12V (Multiplex 5)	Banda específica de mutación
7	Clon 10e5 G12A (Multiplex 4)	Banda específica de mutación
8	Muestra G13D (Multiplex 1)	Banda específica de mutación
9	Muestra Q61L (Multiplex 5)	Banda específica de mutación
10	Clon 10e4 Q61H (Multiplex 1)	Banda específica de mutación
11	Control negativo (H2O) (Multiplex 5)	
12	Marcador de peso molecular	Bandas bien definidas. Marcador de peso molecular VIII de Roche

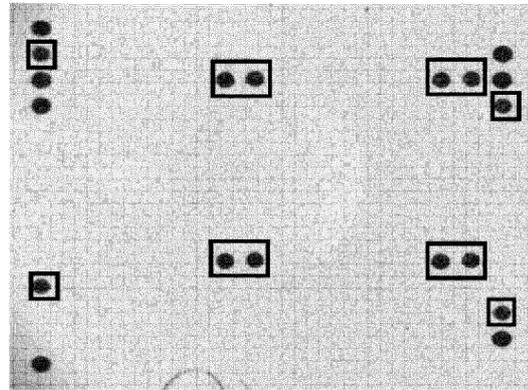
Figura 4.



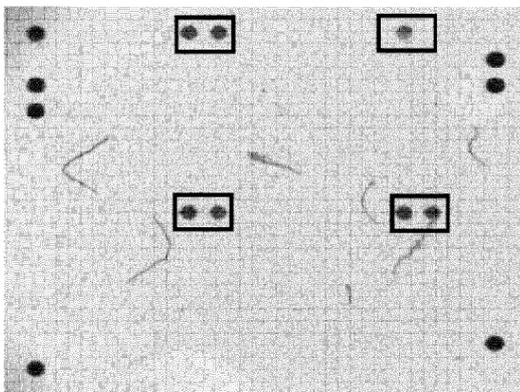
G12C



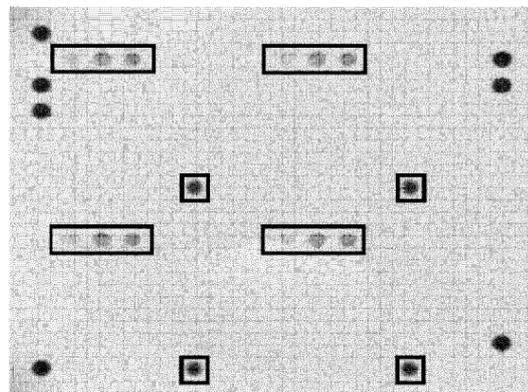
G12A



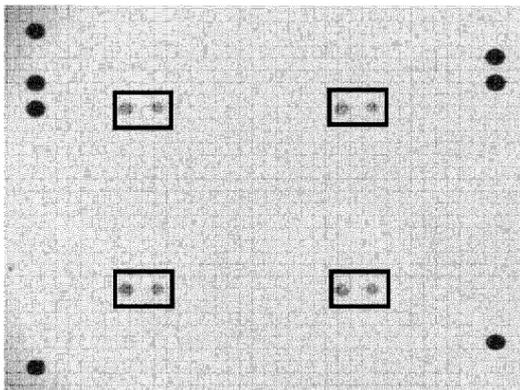
G12R



G12V



Q61L



Control negativo

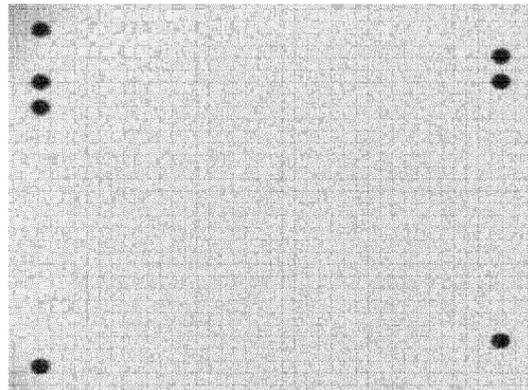
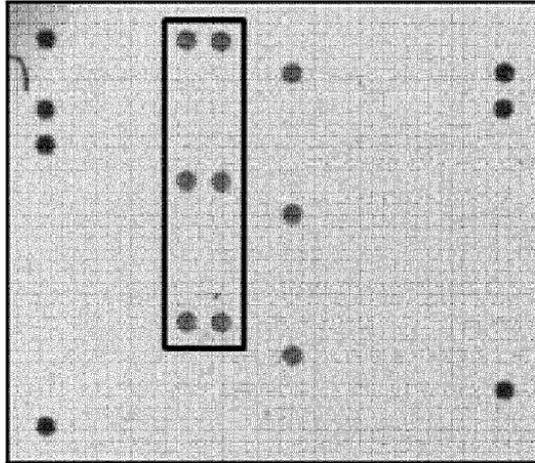


Figura 5.

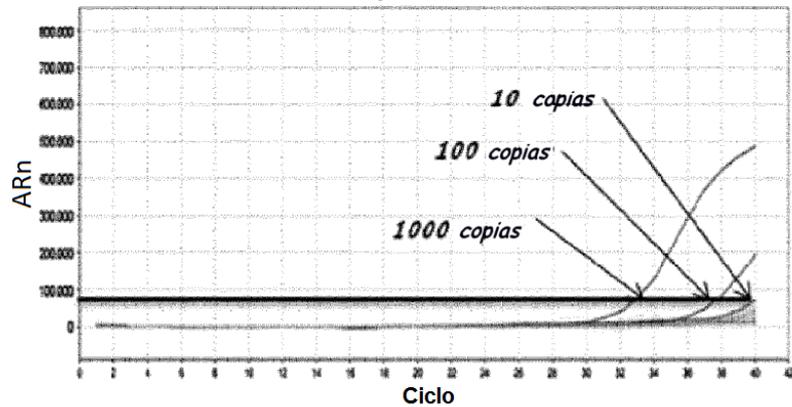
a)



G12R KRAS (1000 copias)

b)

Gráfico de amplificación



G12R KRAS

c)

N.º de copias	G12A		G12C		G12D		G12R		G12S		G12V		G13D	
	C	GS												
10 ⁵			+	29,5									+	28,7
10 ⁴			+	30,5									+	32,8
10 ³	+	31,2	+	33,6	+	37,2	+	31,8	+	37,3	+	32,2	+	36,4
10 ²		35,3		36,3		38,4		36,5		38,6		37,2		-
10		38,7		38,5				38,5		-		-		-

(G: Gold Standard (TheraScreen, Qiagen)

C: CMA, kit de la presente invencion

Figura 6.

