

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 819**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2011 PCT/US2011/059001**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO2012067831**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2011 E 11841038 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2640855**

54 Título: **Ensayo de segmentación en tiempo real**

30 Prioridad:

15.11.2010 US 946737

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

02.06.2017

73 Titular/es:

**EXACT SCIENCES CORPORATION (100.0%)
441 Charmany Drive
Madison, Wisconsin 53719, US**

72 Inventor/es:

**OLDHAM-HALTOM, REBECCA;
ZOU, HONGZHI;
LIDGARD, GRAHAM, P.;
DOMANICO, MICHAEL, J. y
ALLAWI, HATIM**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 614 819 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

Ensayo de segmentación en tiempo real

Antecedentes

5 Diversas mutaciones puntuales en el genoma humano tienen una relación directa con una enfermedad. Por ejemplo, se ha comprobado que diversas mutaciones de KRAS germinales están asociadas con el síndrome de Noonan (Schubbert et al. Nat. Genet. 2006 38: 331-6) y el síndrome cardio-facio-cutáneo (Niihori et al. Nat. Genet. 2006 38: 294-6). Asimismo se encuentran tasas altas de mutaciones de KRAS somáticas en leucemias, cáncer colorrectal (Burmer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1989 86: 2403-7), cáncer pancreático (Almoguera et al. Cell 1988 53: 549-54) y
10 cáncer de pulmón (Tam et al. Clin. Cancer Res. 2006 12: 1647-53). Muchas mutaciones puntuales en el genoma humano no tienen ninguna asociación causativa aparente con una enfermedad.

Es posible utilizar métodos para la detección de mutaciones puntuales, por ejemplo para proporcionar un diagnóstico de enfermedades asociadas con las mutaciones puntuales.

Compendio

15 De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un método de análisis de muestras tal como se especifica en la reivindicación 1.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra esquemáticamente algunos de los principios generales de un ensayo flap.

20 La figura 2 muestra resultados de un ensayo realizado mediante termociclación en una etapa. Detección y cuantificación de la mutación G35T de KRAS en presencia de la secuencia de tipo silvestre en niveles, tal como se indica. Las curvas cinéticas muestran que todas las relaciones entre mutante y tipo silvestre diferentes de 1:10 y 1:100 son indistinguibles.

La figura 3 muestra resultados de un ensayo realizado mediante termociclación en dos etapas. Detección y cuantificación de la mutación G35T de KRAS en presencia de la secuencia de tipo silvestre en niveles, tal como se indica. Las curvas cinéticas muestran la resolución de relaciones de 1:10 a 1:10.0000.

Definiciones

El término "muestra", como se emplea en esta memoria, se refiere a un material o mezcla de materiales, normalmente, aunque no necesariamente, en forma líquida, que contiene uno o más analitos de interés.

30 El término "nucleótido" tiene la finalidad de incluir aquellos restos que no solo contienen las bases de purina y pirimidina conocidas, sino también otras bases heterocíclicas que han sido modificadas. Dichas modificaciones incluyen purinas o pirimidinas metiladas, purinas o pirimidinas aciladas, ribosas alquiladas u otros heterociclos. Además, el término "nucleótido" incluye aquellos restos que contienen marcaciones de hapteno o fluorescentes y pueden contener no solo azúcares de ribosa y desoxirribosa convencionales, sino también otros azúcares. Los nucleósidos o nucleótidos modificados también incluyen modificaciones en el resto de azúcar, por ejemplo, en donde uno o más de los grupos hidroxilo están sustituidos por átomos halógenos o grupos alifáticos, están funcionalizados
35 como éteres, aminas o similares.

40 Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" se emplean en esta memoria indistintamente para describir un polímero de cualquier longitud, por ejemplo mayor que aproximadamente 2 bases, mayor que aproximadamente 10 bases, mayor que aproximadamente 100 bases, mayor que aproximadamente 500 bases, mayor que 1000 bases, hasta aproximadamente 10.000 o más bases, compuesto por nucleótidos, por ejemplo desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, y que se puede producir de forma enzimática o sintética (por ejemplo, PNA tal como se describe en la patente de EE.UU. n° 5,948,902 y las referencias citadas en la misma) y se puede hibridar con ácidos nucleicos de origen natural de una forma específica de secuencia análoga a la de dos ácidos nucleicos de origen natural, por ejemplo puede participar en interacciones de apareamiento de bases de Watson-Crick. Los nucleótidos de origen natural incluyen guanina, citosina, adenina y timina (G, C, A y T, respectivamente).

45 La expresión "muestra de ácido nucleico", como se emplea en esta memoria, significa una muestra que contiene ácido nucleico.

La expresión "polinucleótido diana", como se emplea en esta memoria, se refiere a un polinucleótido de interés sometido a estudio. En algunas realizaciones, un polinucleótido diana contiene uno o más sitios diana de interés sometidos a estudio.

50 El término "oligonucleótido", como se emplea en esta memoria, significa un multímero de nucleótidos monocatenario con aproximadamente 2 a 200 nucleótidos. Los oligonucleótidos pueden ser sintéticos o se pueden producir enzimáticamente, y en algunas realizaciones tienen una longitud de 10 a 50 nucleótidos. Los oligonucleótidos

pueden contener monómeros de ribonucleótido (es decir, pueden ser oligorribonucleótidos) o monómeros de desoxirribonucleótido. Un oligonucleótido puede tener una longitud de 10 a 20, de 11 a 30, de 31 a 40, de 41 a 50, de 51 a 60, de 61 a 70, de 71 a 80, de 80 a 100, de 100 a 150 o de 150 a 200 nucleótidos, por ejemplo.

5 Las expresiones "estructura doble" o "con estructura duplicada", como se emplean en esta memoria, describen dos polinucleótidos complementarios cuyas bases están apareadas, es decir, que están hibridados entre sí.

10 El término "cebador", como se emplea en esta memoria, se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una región de un polinucleótido diana. Un cebador se une con la región complementaria y se extiende, utilizando el ácido nucleico diana como molde, bajo condiciones de extensión de cebador. Un cebador puede tener de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos, aunque es posible utilizar cebadores con una longitud fuera de este intervalo. Un cebador se puede extender desde su extremo 3' por la acción de una polimerasa. Un oligonucleótido que no se puede extender desde su extremo 3' por la acción de una polimerasa no es un cebador.

El término "extender", como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquier adición de uno o más nucleótidos al final de un ácido nucleico, por ejemplo mediante ligación de un oligonucleótido o mediante el uso de una polimerasa.

15 El término "amplificar", como se emplea en esta memoria, se refiere a generar una o más copias de un ácido nucleico diana utilizando el ácido nucleico diana como molde.

El término "desnaturalizar", como se emplea en esta memoria, se refiere a la separación de un ácido nucleico de estructura doble en dos cadenas simples.

20 Los términos "determinar", "medir", "evaluar", "valorar", "ensayar", "detectar" y "analizar" se emplean en esta memoria indistintamente para hacer referencia a cualquier forma de medición, e incluyen la determinación de si un elemento está presente o no. Estos términos incluyen determinaciones cuantitativas y/o cualitativas. La valoración puede ser relativa o absoluta. "Valorar la presencia de" incluye determinar la cantidad de algo presente, así como determinar si ese algo está presente o ausente.

25 El término "utilizar" tiene su significado convencional y, como tal, significa emplear, por ejemplo, poner en servicio, un método o una composición para lograr un objetivo.

30 El término " T_m ", como se emplea en esta memoria, se refiere a la temperatura de fusión de una estructura doble de oligonucleótidos a la que la mitad de la estructura doble permanece hibridada y la otra mitad de la estructura doble se disocia en cadenas simples. La T_m de una estructura doble de oligonucleótidos se puede determinar experimentalmente o predecir utilizando la siguiente fórmula $T_m = 81,5 + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41(\text{fracción G+C}) - (60/N)$, donde N es la longitud de cadena y $[\text{Na}^+]$ es menor de 1 M. Véase Sambrook y Russell (2001; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor N.Y., ch. 10). También existen otras fórmulas para predecir la T_m de estructuras dobles de oligonucleótidos y una fórmula puede ser más o menos apropiada para una condición o un conjunto de condiciones dados.

35 La expresión "con T_m armonizadas", como se emplea en esta memoria, se refiere a múltiples estructuras dobles de ácidos nucleicos que presentan T_m que están dentro de un intervalo definido, por ejemplo, en un margen de 5 °C o 10 °C entre sí.

40 La expresión "mezcla de reacción", como se emplea en esta memoria, se refiere a una mezcla de reactivos que pueden reaccionar entre sí para producir un producto en condiciones externas apropiadas durante un período de tiempo. Una mezcla de reacción puede contener reactivos de PCR y reactivos de segmentación flap, por ejemplo, cuyas fórmulas son conocidas independientemente en la técnica.

45 El término "mezcla", como se emplea en esta memoria, se refiere a una combinación de elementos que están entremezclados sin ningún orden particular. Una mezcla es heterogénea y no se puede separar espacialmente en sus diferentes constituyentes. Algunos ejemplos de mezclas de elementos incluyen una serie de elementos diferentes que están disueltos en la misma solución acuosa, o una serie de elementos diferentes unidos a un soporte sólido de forma aleatoria o sin ningún orden particular, no diferenciándose espacialmente los diversos elementos. Una mezcla no es consignable. Para ilustrar esto con un ejemplo, un conjunto ordenado de polinucleótidos unidos a superficie y separados espacialmente, como es conocido comúnmente en la técnica, no es una mezcla de polinucleótidos unidos a superficie, ya que las especies de polinucleótidos unidos a superficie se diferencian espacialmente y el conjunto ordenado es consignable.

50 La expresión "reactivos de PCR", como se emplea en esta memoria, se refiere a todos los reactivos que son necesarios para realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un molde. Como es conocido en la técnica, los reactivos de PCR incluyen esencialmente un primer cebador, un segundo cebador, una polimerasa termoestable y nucleótidos. Dependiendo de la polimerasa utilizada, también puede estar presentes iones (por ejemplo Mg^{2+}). Opcionalmente, los reactivos de PCR pueden contener un molde a partir del cual se puede amplificar una secuencia diana.

55

La expresión "ensayo flap", como se emplea en esta memoria, se refiere a un ensayo en el que un oligonucleótido flap se segmenta de un modo dependiente de solapamiento mediante una endonucleasa flap para liberar un flap que después es detectado. Los principios de los ensayos flap son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en Lyamichev et al. (Nat. Biotechnol. 1999 17:292-296), Ryan et al. (Mol. Diagn. 1999 4:135-44) y Allawi et al. (J Clin Microbiol. 2006 44: 3443-3447). Para una mayor claridad, más abajo se describen algunos reactivos empleados en un ensayo flap. La Figura 1 ilustra los principios de un ensayo flap. En el ensayo flap mostrado en la figura 1, un oligonucleótido invasivo **2** y un oligonucleótido flap **4** se hibridan en la diana **6** para producir un primer complejo **8** que contiene un solapamiento de nucleótidos en la posición **10**. El primer complejo **8** es un sustrato para endonucleasa flap. La endonucleasa flap **12** segmenta el oligonucleótido flap **4** para liberar un flap **14** que se hibrida con un casete FRET **16** que contiene un extintor "Q" y un fluoróforo extinguido "R" cercano que está extinguido por el extintor Q. La hibridación del flap **14** con el casete FRET **16** conduce a un segundo complejo **18** que contiene un solapamiento de nucleótidos en la posición **20**. El segundo complejo también es un sustrato para endonucleasa flap. La segmentación del casete FRET **16** mediante endonucleasa flap **12** conduce a la liberación del fluoróforo **22**, que produce una señal fluorescente. Estos componentes se describen con mayor detalle más abajo.

La expresión "oligonucleótido invasivo", como se emplea en esta memoria, se refiere a un oligonucleótido que es complementario a una región en un ácido nucleico diana. El nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido invasivo se puede aparear o no con la base de un nucleótido en la diana (que puede ser, por ejemplo, el sitio de un SNP o una mutación).

La expresión "oligonucleótido flap", como se emplea en esta memoria, se refiere a un oligonucleótido que contiene una región flap y una región que es complementaria a una región en el ácido nucleico diana. Las regiones complementarias diana en el oligonucleótido invasivo y el oligonucleótido flap se solapan en un solo nucleótido. Como es conocido, si tanto el nucleótido del extremo 3' del nucleótido invasivo como el nucleótido que se solapa con este nucleótido en el oligonucleótido flap se aparean con la base de un nucleótido en el ácido nucleico diana, se forma una estructura particular. Esta estructura es un sustrato para una enzima, definida más abajo como una endonucleasa flap, que segmenta el flap de la región complementaria diana del oligonucleótido flap. Si el nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido invasivo no se aparea con la base de un nucleótido en el ácido nucleico diana, o si el nucleótido de solapamiento en el oligonucleótido flap no se aparea con la base de un nucleótido en el ácido nucleico diana, el complejo no es un sustrato para la enzima y se produce muy poca o ninguna segmentación.

La expresión "endonucleasa flap", o "FEN" para abreviar, como se emplea en esta memoria, se refiere a una clase de enzimas nucleolíticas que actúan como endonucleasas específicas de estructura en estructuras de DNA con una estructura doble que contiene una parte sobresaliente monocatenaria en el extremo 5', o flap, en una de las cadenas que está desplazada por otra cadena de ácido nucleico, es decir, que hay nucleótidos de solapamiento en la unión entre el DNA monocatenario y el DNA bicatenario. Las FEN catalizan la segmentación hidrolítica del enlace fosfodiéster en la unión del DNA monocatenario y el DNA bicatenario, liberando la parte sobresaliente, o el flap. Las endonucleasas flap han sido analizadas por Ceska y Savers (*Trends Biochem. Sci.* 1998 23:331-336) y Liu et al. (*Annu. Rev. Biochem.* 2004 73: 589-615). Las FEN pueden consistir en enzimas individuales, enzimas multisubunidad, o pueden existir como una actividad de otra enzima o complejo proteínico, por ejemplo una DNA polimerasa. Una endonucleasa flap puede ser termoestable.

La expresión "flap segmentado", como se emplea en esta memoria, se refiere a un oligonucleótido monocatenario que consiste en un producto de segmentación de un ensayo flap.

La expresión "casete FRET", como se emplea en esta memoria, se refiere a un oligonucleótido en horquilla que contiene un resto de fluoróforo y un resto de extintor cercano que extingue el fluoróforo. La hibridación de un flap segmentado con un casete FRET produce un sustrato secundario para la endonucleasa flap. Una vez formado este sustrato, la base que contiene fluoróforo en el extremo 5' se segmenta del casete, generando de este modo una señal de fluorescencia.

La expresión "reactivos de ensayo flap", como se emplea en esta memoria, se refiere a todos los reactivos necesarios para realizar un ensayo flap sobre un sustrato. Como es conocido en la técnica, los ensayos flap incluyen un oligonucleótido invasivo, un oligonucleótido flap, una endonucleasa flap y un casete FRET, tal como se describe más arriba. Los reactivos de ensayo flap pueden contener opcionalmente una diana a la que se unen el oligonucleótido invasivo y el oligonucleótido flap.

Descripción de ejemplos de realización

Antes de describir la presente invención con mayor detalle, se ha de entender que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que, evidentemente, éstas pueden variar. También se ha de entender que la terminología empleada en esta memoria tiene el objetivo de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención solo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a no ser que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior y el límite inferior de

dicho intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en dicho intervalo indicado, está incluido dentro de la presente invención. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos menores pueden estar incluidos independientemente en los intervalos menores y también están incluidos dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o los dos límites, la invención también incluye intervalos que excluyen cualquiera de estos dos límites incluidos, o ambos.

A no ser que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos empleados en esta memoria tienen el mismo significado entendido comúnmente por una persona con competencias normales en el ámbito técnico al que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o las pruebas de la presente invención se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos, a continuación se describen los métodos y materiales preferentes.

La mención de cualquier publicación se refiere a su divulgación antes de la fecha de presentación y no ha de ser interpretada como un reconocimiento de que la presente invención no tiene derecho a antedatar dicha publicación en virtud de invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes a las fechas de publicación reales, que pueden tener que ser confirmadas independientemente.

Se ha de señalar que las formas singulares "un", "una", "el" y "la", como se emplean en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, incluyen referencias en plural a no ser que el contexto indique claramente lo contrario. También se ha de señalar que las reivindicaciones pueden estar redactadas de modo que excluyan cualquier elemento opcional. Como tal, está previsto que esta afirmación sirva como base de antecedente para el uso de terminología exclusiva como "solamente", "únicamente" y similares con respecto a la relación de elementos de reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".

Como será evidente para los expertos en la técnica después de leer esta descripción, cualquier método descrito se puede llevar a cabo en el orden indicado o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

En la presente memoria se describe un método de ensayo de PCR en tiempo real basado en segmentación. En términos generales, en el método de ensayo, una mezcla de reacción que comprende a) reactivos de PCR para amplificar una diana de ácido nucleico, y b) reactivos de segmentación flap para realizar un ensayo de segmentación flap en la diana de ácido nucleico amplificada, se somete a dos series de condiciones de termociclación. En algunos casos no se añade ningún reactivo adicional a la reacción entre la primera y la segunda serie de ciclos, y en cada ciclo de la segunda serie de ciclos se mide la segmentación de una sonda flap. En la descripción posterior del método, en primer lugar se describirá la mezcla de reactivos utilizada en el método y después se describirán las condiciones de termociclación empleadas en el método.

En la siguiente descripción, los expertos en la técnica entenderán que en los métodos se podría utilizar cualquiera de una serie de polimerasas y endonucleasas flap, incluyendo, de forma no exclusiva, las aisladas de organismos procariontes, eucariontes o arqueas termoestables o hipertermoestables. Los expertos en la técnica también entenderán que las enzimas utilizadas en el método, por ejemplo polimerasa y endonucleasa flap, no solo incluyen enzimas de origen natural, sino también enzimas recombinantes que incluyen fragmentos enzimáticamente activos, productos de segmentación y variantes de enzimas de tipo silvestre.

Mezcla de reacción

Como se indica más arriba, la mezcla de reacción utilizada en el método contiene al menos reactivos de PCR para amplificar una diana de ácido nucleico y reactivos de segmentación flap para realizar un ensayo de segmentación flap en el ácido nucleico amplificado. Por lo tanto, la mezcla de reacción empleada en el método puede contener un par de cebadores y un tampón de reacción (que puede estar tamponado en pH y puede incluir sal, por ejemplo $MgCl_2$, y otros componentes necesarios para la PCR), nucleótidos, por ejemplo dGTP, dATP, dTTP y dCTP y una DNA polimerasa termoestable, así como un oligonucleótido flap, una endonucleasa flap y un casete FRET, tal como se definen más arriba. Dependiendo del modo de realización del ensayo (es decir, dependiendo de si se utiliza uno de los cebadores de PCR como un oligonucleótido invasivo en el ensayo flap), la mezcla de reacción puede contener adicionalmente un oligonucleótido invasivo que es diferente a los cebadores de PCR. La mezcla de reacción puede contener además una diana de ácido nucleico.

Las identidades y concentraciones exactas de los reactivos presentes en la mezcla de reacción pueden ser similares o iguales a las empleadas independientemente en los ensayos de PCR y de segmentación flap, excepto que la mezcla de reacción contiene Mg^{2+} en una concentración mayor que la empleada en mezclas de reacción de PCR convencionales (que contienen Mg^{2+} en una concentración entre aproximadamente 1,8 mM y 3 mM). En algunas realizaciones, la mezcla de reacción descrita en la presente memoria contiene Mg^{2+} en una concentración dentro del intervalo de 4 mM a 10 mM, por ejemplo de 6 mM a 9 mM. Los ejemplos de tampones de reacción y DNA polimerasas que pueden ser empleados en la mezcla de reacción en cuestión incluyen los descritos en diversas publicaciones (por ejemplo Ausubel, et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3ª ed., Wiley & Sons 1995 y Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, 2001 Cold Spring Harbor, N.Y.). Es posible comprar tampones de reacción y DNA polimerasas adecuados para PCR de diversos proveedores, por ejemplo Invitrogen (Carlsbad, Calif.), Qiagen (Valencia, Calif.) y Stratagene (La Jolla, Calif.). Los ejemplos de

- polimerasas incluyen *Taq*, *Pfu*, *Pwo*, *UITma* y *Vent*, aunque en algunas realizaciones se pueden emplear muchas otras polimerasas. La información proporcionada con la polimerasa incluye orientación sobre los componentes de reacción adecuados para ser utilizados con una polimerasa y sobre las condiciones adecuadas para su uso. El diseño de cebadores está descrito en diversas publicaciones, por ejemplo Diffenbach y Dveksler (PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press 1995); R. Rapley, (The Nucleic Acid Protocols Handbook (2000), Humana Press, Totowa, N.J.); Schena y Kwok et al., Nucl. Acid Res. 1990 18:999-1005). También existen programas informáticos comercialmente disponibles para el diseño de cebadores y sondas, incluyendo, de forma no exclusiva, Primer Detective (ClonTech, Palo Alto, Calif.), Lasergene, (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.); y Oligo software (National Biosciences, Inc., Plymouth, Minn.) e iOligo (Caesar Software, Portsmouth, N.H.).
- 5 En Lyamichev et al. (Nat. Biotechnol. 1999 17:292-296), Ryan et al. (Mol. Diagn. 1999 4:135-44) y Allawi et al. (J Clin Microbiol. 2006 44: 3443-3447) se pueden encontrar ejemplos de reactivos de ensayo de segmentación flap. Las condiciones apropiadas para reacciones de endonucleasa flap son conocidas o se pueden determinar fácilmente utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Kaiser et al., J. Biol. Chem. 274:21387-94, 1999). Los ejemplos de endonucleasas flap que pueden ser utilizadas en el método incluyen, de forma no exclusiva, DNA polimerasa I de *Thermus aquaticus*, DNA polimerasa I de *Thermus thermophilus*, FEN-1 de mamífero, FEN-1 de *Archaeoglobus fulgidus*, FEN-1 de *Methanococcus jannaschii*, FEN-1 de *Pyrococcus furiosus*, FEN-1 de *Methanobacterium thermoautotrophicum*, FEN-1 de *Thermus thermophilus*, CLEAVASE™ (Third Wave, Inc., Madison, Wis.), RTH1 de *S. cerevisiae*, RAD27 de *S. cerevisiae*, rad2 de *Schizosaccharomyces pombe*, 5'-3' exonucleasa de bacteriófago T5, FEN-1 de *Pyrococcus horikoshii*, exonucleasa 1 humana, 5'-3' exonucleasa de timo de ternero, incluyendo homólogos de los mismos en eubacterias, eucariontes y arqueas, como miembros de la familia de clase II de enzimas específicas de estructura, así como mutantes enzimáticamente activos o variantes de los mismos. Es posible encontrar descripciones de enzimas de segmentación, entre otros lugares, en Lyamichev et al., Science 260:778-83, 1993; Eis et al., Nat. Biotechnol. 19:673-76, 2001; Shen et al., Trends in Bio. Sci. 23:171-73, 1998; Kaiser et al. J. Biol. Chem. 274:21387-94, 1999; Ma et al., J. Biol. Chem. 275:24693-700, 2000; Allawi et al., J. Mol. Biol. 328:537-54, 2003; Sharma et al., J. Biol. Chem. 278:23487-96, 2003; y Feng et al., Nat. Struct. Mol. Biol. 11:450-56, 2004.

En realizaciones particulares, la mezcla de reacción puede contener reactivos para ensayar múltiples (por ejemplo, al menos 2, 3, 4 o más) secuencias diana diferentes en paralelo. En estos casos, la mezcla de reacción puede contener múltiples pares de cebadores de PCR, múltiples oligonucleótidos flap diferentes con diferentes flaps, y múltiples casetes FRET diferentes para detectar los diferentes flaps una vez que éstos han sido segmentados. En una realización, los oligonucleótidos de una mezcla pueden tener flaps comunes pero diferentes secuencias de unión para permitir, por ejemplo, que un grupo de mutaciones segmente un casete FRET común y emita una señal cuando un fluoróforo individual es indicativo de la presencia de una mutación. En esta realización, una vez identificada la presencia de una mutación, se puede determinar qué mutación está presente en la muestra.

30 Opcionalmente, la reacción puede incluir múltiples oligonucleótidos invasivos si uno de los cebadores de PCR no se utiliza como un oligonucleótido invasivo. Al segmentar los casetes FRET se pueden observar múltiples señales fluorescentes distinguibles. El fluoróforo se puede seleccionar, por ejemplo, entre 6-carboxifluoresceína (FAM), que tiene longitudes de onda de excitación y emisión de 485 nm y 520 nm, respectivamente; Redmond Red, que tiene longitudes de onda de excitación y emisión de 578 nm y 650 nm, respectivamente; Yakima Yellow, que tiene longitudes de onda de excitación y emisión de 532 nm y 569 nm, respectivamente; y Quasor670, que tiene longitudes de onda de excitación y emisión de 644 nm y 670 nm, respectivamente, aunque se podrían emplear muchos otros. En algunos casos, al menos uno de los pares de cebadores de PCR, oligonucleótidos flap y casetes FRET puede estar destinado a la detección de un control interno.

Evidentemente, los diversos oligonucleótidos utilizados en el método están diseñados para que no interfieran entre sí. Por ejemplo, en realizaciones particulares, el oligonucleótido flap puede estar rematado en su extremo 3', con lo que se evita su extensión. Igualmente, en algunas realizaciones, el oligonucleótido invasivo también puede estar rematado en su extremo 3' si no se utiliza como uno de los cebadores de PCR. En realizaciones particulares, si el oligonucleótido invasivo no se utiliza como uno de los cebadores de PCR, el oligonucleótido invasivo puede estar presente en una concentración dentro del intervalo de 5% a 50%, por ejemplo de 10% a 40%, de la concentración de los cebadores de PCR. Además, en ciertos casos, las T_m de la parte de flap y las regiones complementarias diana del oligonucleótido flap pueden ser independientemente al menos 10 °C más bajas (por ejemplo 10-20 °C más bajas) que las T_m de los cebadores de PCR, lo que conduce a a) una menor hibridación del oligonucleótido flap en el ácido nucleico diana a temperaturas mayores (60 °C a 75 °C) y b) una menor hibridación de cualquier flap segmentado con el casete FRET a temperaturas mayores (60 °C a 75 °C). La quinta temperatura menor es favorable para la hibridación de los oligonucleótidos utilizados en el ensayo flap, y para la actividad de la endonucleasa flap.

En una reacción múltiple, los cebadores pueden estar diseñados de modo que tengan propiedades termodinámicas similares, por ejemplo T_m , contenido de G/C y estabilidad de horquilla similares, y en algunas realizaciones todos pueden tener una longitud similar, por ejemplo de 18 a 30 nt, por ejemplo de 20 a 25 nt de longitud. Los otros reactivos utilizados en la mezcla de reacción también pueden tener T_m armonizadas.

60 La mezcla de ensayo puede estar presente en un recipiente, incluyendo, de forma no exclusiva, un tubo; una placa de múltiples pocillos, como una placa de 96 pocillos, de 384 pocillos o de 1536 pocillos; y un dispositivo microfluidico. En algunas realizaciones, en el mismo recipiente de reacción se llevan a cabo varias reacciones

múltiples. Dependiendo del modo de realización de la reacción, la mezcla de reacción puede tener un volumen de 5 µl a 200 µl, por ejemplo de 10 µl a 100 µl, aunque también están previstos volúmenes fuera de este intervalo.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción en cuestión puede contener además una muestra de ácido nucleico. En realizaciones particulares, la muestra puede contener DNA genómico o una versión amplificada de éste (por ejemplo, DNA genómico amplificado utilizando por ejemplo los métodos de Lage et al., *Genome Res.* 2003 13: 294-307 o la solicitud de patente publicada US20040241658). En algunos ejemplos de realización, la muestra genómica puede contener DNA genómico de una célula de mamífero, como una célula humana, de ratón, rata o mono. La muestra se puede preparar a partir de células cultivadas o de células de una muestra clínica, por ejemplo una biopsia, un raspado o un lavado de tejido, o de células de una muestra forense (es decir, células de una muestra recogida en la escena de un crimen). En realizaciones particulares, la muestra genómica puede proceder de una muestra fijada en formalina y embebida en parafina (FFPE).

En realizaciones particulares, la muestra de ácido nucleico se puede obtener a partir de una muestra biológica, como células, tejidos, fluidos corporales y heces. Los fluidos corporales de interés incluyen, de forma no exclusiva, sangre, suero, plasma, saliva, modo, flema, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, lágrimas, líquido de conducto mamario, linfa, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina, líquido amniótico y semen. En realizaciones particulares se puede obtener una muestra de un individuo, por ejemplo un humano, y ésta se puede procesar antes de su uso en el ensayo en cuestión. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede extraer de la muestra antes de su uso, para lo cual ya se conocen métodos.

Por ejemplo, se puede extraer DNA de heces mediante cualquier cantidad de métodos diferentes, incluyendo los descritos, por ejemplo, en Coll et al. (*J. of Clinical Microbiology* 1989 27: 2245-2248), Sidransky et al. (*Science* 1992 256: 102-105), Villa (*Gastroenterology* 1996 110: 1346-1353) y Nollau (*BioTechniques* 1996 20: 784-788), y en las patentes EE.UU. nº 5463782, 7005266, 6303304 y 5741650. Los equipos de extracción de DNA comerciales para la extracción de DNA de heces incluyen QIAamp stool mini kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), Instagene Matrix (Bio-Rad, Hercules, Calif.), y RapidPrep Micro Genomic DNA isolation kit (Pharmacia Biotech Inc Piscataway, N.J.), entre otros.

Método de análisis de muestras

Al llevar a cabo el método en cuestión, la mezcla de reacción se somete a las siguientes condiciones de termociclación: una primera serie de 5 a 15 (por ejemplo de 8 a 12) ciclos de: i. una primera temperatura de al menos 90 °C; ii. una segunda temperatura en el intervalo de 60 °C a 75 °C (por ejemplo 65 °C a 75 °C); iii. una tercera temperatura en el intervalo de 65 °C a 75 °C; seguida por: una segunda serie de 20-50 ciclos de: i. una cuarta temperatura de al menos 90 °C; ii. una quinta temperatura que es al menos 10 °C más baja que la segunda temperatura (por ejemplo en el intervalo de 50 °C a 55 °C); y iii. una sexta temperatura en el intervalo de 65 °C a 75 °C. Durante la termociclación no se añade ningún reactivo adicional a la mezcla de reacción, por ejemplo entre la primera y la segunda serie de ciclos. En realizaciones particulares, la polimerasa termoestable no se inactiva entre la primera y la segunda serie de condiciones, permitiendo de este modo la amplificación de la diana durante cada ciclo de la segunda serie de ciclos. En realizaciones particulares, la segunda y la tercera temperatura son la misma temperatura, de modo que se aplican condiciones de termociclación "en dos etapas". Cada uno de los ciclos puede tener independientemente una duración en el intervalo de 10 segundos a 3 minutos, aunque se emplean perfectamente duraciones fuera de este intervalo.

En cada ciclo de la segunda serie de ciclos, mientras la reacción se encuentra a la quinta temperatura se puede medir una señal generada por segmentación de la sonda flap para obtener una medición en tiempo real de la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra (refiriéndose la expresión "en tiempo real" a una medición que se realiza mientras la reacción avanza y se acumulan productos). La medición se puede expresar como una cantidad absoluta de copias o como una cantidad relativa cuando está normalizada con respecto a un ácido nucleico de control en la muestra.

Sin establecer una vinculación con ninguna teoría específica, se cree que las mayores temperaturas de reacción en la primera serie de ciclos pueden permitir que el par de cebadores de PCR amplifique eficientemente el ácido nucleico diana sin ninguna interferencia significativa por parte de cualquiera de los reactivos de ensayo flap o sus productos de reacción. La temperatura de reacción menor utilizada en la segunda serie de ciclos (es decir, la quinta temperatura) no es óptima para la polimerasa utilizada para la PCR, pero permite que el oligonucleótido flap se hibride eficientemente con el ácido nucleico diana y está más cerca de la temperatura óptima de la endonucleasa flap. La temperatura de reacción menor utilizada en la segunda serie de ciclos también facilita la hibridación posterior del flap segmentado con el casete FRET. De este modo, a una temperatura menor, el ácido nucleico diana puede ser detectado sin ninguna interferencia significativa por parte de los reactivos de PCR.

En algunos casos es posible detectar una fluorescencia que indica la cantidad de flap segmentado mediante un fluorómetro automático diseñado para llevar a cabo PCR en tiempo real, que presenta las siguientes características: una fuente luminosa para excitar el fluoróforo del casete FRET, un sistema para calentar y enfriar mezclas de reacción y un fluorómetro para medir la fluorescencia emitida por el casete FRET. Esta combinación de características posibilita una medición en tiempo real del flap segmentado, lo que permite cuantificar la cantidad de

ácido nucleico diana presente en la muestra. En la técnica se conocen fluorómetros automáticos para llevar a cabo reacciones de PCR en tiempo real y éstos se pueden adaptar para utilizarlos en este ensayo específico, por ejemplo el ICYCLER™ de Bio-Rad Laboratories (Hercules, Calif.), el Mx3000P™, el MX3005P™ y el MX4000™ de Stratagene (La Jolla, Calif.), el ABI PRISM™ 7300, 7500, 7700 y 7900 Taq Man (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), el SMARTCYCLER™, ROTORGENE 2000™ (Corbett Research, Sydney, Australia), el GENE XPERT™ System (Cepheid, Sunnyvale, Calif.) y el LIGHTCYCLER™ (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Ind.). La velocidad de incremento entre las diferentes temperaturas de reacción no es crítica y en algunas realizaciones se pueden emplear las velocidades de incremento por defecto previamente ajustadas en los termocicladores.

En algunos casos, el método puede incluir además la representación gráfica de la cantidad de segmentación que se produce en cada uno de los ciclos de la segunda serie, proporcionando de este modo una estimación de la abundancia de la diana de ácido nucleico. La estimación se puede calcular determinando el ciclo umbral (es decir, el ciclo en el que dicha fluorescencia aumenta por encima de un umbral predeterminado; el valor "Ct" o valor "Cp"). Esta estimación se puede comparar con un control (que se puede ensayar en la misma mezcla de reacción que el locus genómico de interés) para obtener una estimación normalizada. El termociclador también puede incluir un programa de aplicación para determinar el ciclo umbral para cada una de las muestras. Por ejemplo, en Luu-The et al. (Biotechniques 2005 38: 287-293) se muestra un ejemplo de un método para determinar el ciclo umbral.

También se describe un dispositivo para llevar a cabo análisis de muestras. El dispositivo puede incluir: a) un termociclador programado para llevar a cabo el proceso arriba descrito y b) un recipiente que comprende: reactivos de PCR para amplificar una diana de ácido nucleico, y reactivos de segmentación flap para realizar un ensayo de segmentación flap en la diana de ácido nucleico.

Utilidad

El método descrito puede ser utilizado en diversas aplicaciones, incluyendo dichas aplicaciones por regla general aplicaciones de análisis de muestras en las que se detecta la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana en una muestra dada.

En particular, los métodos arriba descritos se pueden emplear para diagnosticar, para predecir una respuesta a un tratamiento o para investigar una afección cancerosa u otra enfermedad en mamíferos, incluyendo, de forma no exclusiva, leucemia, carcinoma de mama, cáncer de próstata, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, epilepsia, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, apoplejía, autismo, discapacidad intelectual y trastornos de desarrollo. Muchos polimorfismos de nucleótido están asociados con estas enfermedades y son considerados como un factor para la aparición de las mismas. El conocimiento del tipo y la localización del polimorfismo de nucleótido puede ayudar enormemente al diagnóstico, el pronóstico y el entendimiento de diversas enfermedades en mamíferos. Además, las condiciones de ensayo descritas en esta memoria pueden ser empleadas en otras aplicaciones de detección de ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo, detección de enfermedades infecciosas, control de la carga viral, genotipado de virus, pruebas ambientales, pruebas de alimentos, pruebas forenses, epidemiología y otras áreas en las que se utiliza una detección de secuencias de ácidos nucleicos específicas.

En algunas realizaciones se puede obtener una muestra biológica de un paciente, y la muestra se puede analizar utilizando el método. En realizaciones particulares, el método se puede emplear para identificar y/o estimar la cantidad de copias mutantes de un locus genómico que se encuentran en una muestra biológica que contiene tanto copias de tipo silvestre de un locus genómico como copias mutantes del locus genómico que tienen una mutación puntual con respecto a las copias de tipo silvestre del locus genómico. En este ejemplo, la muestra puede contener al menos 100 veces (por ejemplo al menos 1.000 veces, al menos 5.000 veces, al menos 10.000 veces, al menos 50.000 veces o al menos 100.000 veces) más copias de tipo silvestre del locus genómico que copias mutantes de dicho locus genómico.

En estas realizaciones, el método se puede emplear para detectar una mutación oncogénica (que puede consistir en una mutación somática), por ejemplo en PIK3CA, NRAS, KRAS, JAK2, HRAS, FGFR3, FGFR1, EGFR, CDK4, BRAF, RET, PGDFRA, KIT o ERBB2, pudiendo estar asociada dicha mutación con cáncer de mama, melanoma, cáncer de riñón, cáncer endometrial, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, mesotelioma, glioma, meduloblastoma, policitemia, linfoma, sarcoma o mieloma múltiple (véase, por ejemplo Chial 2008 Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. Nature Education 1:1).

En estas realizaciones, la mezcla de reacción puede contener un primer cebador y un segundo cebador, comprendiendo el primer cebador un nucleótido de extremo 3' que se aparea con las bases de la mutación puntual. El primer cebador se puede emplear como el oligonucleótido invasivo en la segunda serie de ciclos o, en algunos casos, la mezcla de reacción puede presentar un oligonucleótido invasivo independiente que también tiene un nucleótido de extremo 3' que se aparea con las bases de la mutación puntual. Dado que la mutación puntual en el locus genómico puede estar directamente asociada con cáncer, por ejemplo cáncer colorrectal, el método en cuestión puede ser empleado para diagnosticar pacientes de cáncer, de forma individual o en combinación con otras técnicas clínicas (por ejemplo un examen físico como una colonoscopia o análisis inmunohistoquímicos) o técnicas moleculares. Por ejemplo, los resultados obtenidos en el ensayo en cuestión se pueden combinar con otra información, por ejemplo información referente al estado de metilación de otros locus, información referente al

mismo locus o a un locus diferente, información citogenética, información referente a transposiciones, información de expresión genética o información sobre la longitud de telómeros, para proporcionar un diagnóstico general de cáncer u otras enfermedades.

5 En una realización se puede tomar una muestra de un paciente en un primer lugar, por ejemplo en un establecimiento clínico, como un hospital o la consulta de un doctor, y la muestra se puede enviar a un segundo lugar, por ejemplo un laboratorio, donde ésta es procesada y se lleva a cabo el método arriba descrito para generar un informe. Un "informe", como se describe en la presente memoria, consiste en un documento electrónico o físico que incluye elementos de informe que proporcionan resultados de ensayo, que pueden incluir un valor Ct o Cp o similar que indica la presencia de copias mutantes del locus genómico en la muestra. Una vez generado, el informe puede ser enviado a otro lugar (que puede ser el mismo que el primer lugar), donde puede ser interpretado por un profesional sanitario (por ejemplo un clínico, un técnico de laboratorio o un médico como un oncólogo, cirujano o patólogo) como parte de un diagnóstico clínico.

Equipos

15 También se describen equipos para poner en práctica el método en cuestión, tal como se describe más arriba. Los componentes del equipo pueden estar presentes en recipientes independientes, o múltiples componentes pueden estar presentes en un solo recipiente.

20 Además de los componentes arriba mencionados, el equipo también puede incluir instrucciones para utilizar los componentes del equipo con el fin de poner en práctica los métodos en cuestión. Por regla general, las instrucciones para poner en práctica los métodos en cuestión están registradas en un soporte de registro adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden estar impresas en un sustrato, como papel o plástico, etc. Como tales, las instrucciones pueden estar presentes en los equipos en forma de un prospecto, en el etiquetado del recipiente del equipo o en componentes de éste (es decir, asociadas con el paquete o subpaquete), etc. Las instrucciones pueden estar presentes como un archivo de datos de almacenamiento electrónico presente en un soporte de almacenamiento adecuado legible por ordenador, por ejemplo CD-ROM, disquete, etc. En otros equipos, las instrucciones reales no están presentes en el equipo, pero se proporcionan medios para obtener las instrucciones desde una fuente remota, por ejemplo por Internet. Un ejemplo de ello consiste en un equipo que incluye una dirección web en la que se pueden ver las instrucciones y/o desde la que se pueden descargar las instrucciones. Como en el caso de las instrucciones, estos medios para obtener las instrucciones están registrados en un sustrato adecuado.

25 Además de las instrucciones, los equipos también pueden incluir una o más muestras de control, por ejemplo analitos de control positivos o negativos para utilizarlos en las pruebas del equipo.

La mención de cualquier publicación se refiere a su divulgación antes de la fecha de presentación y no ha de ser interpretada como un reconocimiento de que la presente invención no tiene derecho a antedatar dicha publicación en virtud de invención anterior.

Ejemplo 1

35 Ensayo G35T de KRAS

El ensayo descrito más abajo está diseñado para detectar secuencias de ácidos nucleicos que contienen la mutación G35T de KRAS sobre un fondo de secuencias de tipo silvestre. Como referencia, más abajo se muestran secuencias de nucleótidos parciales de los alelos de tipo silvestre y mutantes G35T de KRAS.

Secuencia parcial de región de amplificación para KRAS, tipo silvestre (posición 35 subrayada):

ATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAA
 GAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATT^{TT}TGTGGACGAATATGA
 TCCAACAATAGAGGTAATCTTGT^{TT}TTAATATGCATATTACTGG (SEQ ID
 40 N° :1)

Secuencia parcial de región de amplificación para KRAS, mutante G35T (posición 35 subrayada):

ATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTG^{TT}ITGGCGTAGGCAA
 GAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATT^{TT}TGTGGACGAATATGA
 TCCAACAATAGAGGTAATCTTGT^{TT}TTAATATGCATATTACTGG (SEQ ID
 N° :2)

5 La capacidad para detectar la mutación T de KRAS en la posición 35 sobre un fondo de G de tipo silvestre en la posición 35 se analizó utilizando dos protocolos de termociclación diferentes, uno de los cuales emplea una ciclación de una sola etapa y el otro emplea una ciclación en dos etapas (véase la tabla 1). En los dos protocolos, todas las diluciones presentaban aproximadamente 100.000 copias (es decir, 100.000 plásmidos bicatenarios) de la secuencia de tipo silvestre. A las 100.000 copias de tipo silvestre se les añadieron aproximadamente 10.000, 1.000, 100 y 10 copias del gen diana mutante. Como control se utilizó una muestra que contenía 100.000 copias de la secuencia mutante.

10 La tabla 1 resume las condiciones de ciclación para el ensayo basado en segmentación para la termociclación en una etapa y la termociclación en dos etapas. La adquisición de señales fluorescentes tiene lugar a la temperatura de 53 °C, que conduce a la reacción de segmentación de la sonda flap de la diana y la segmentación del fluoróforo del casete FRET mediada por el flap liberado.

Tabla 1. Ciclación en una etapa en comparación con el protocolo en dos etapas (Headstart)

Etapa	Temperatura	Tiempo	Una etapa: número de ciclos	2 etapas (Headstart): número de ciclos	Adquisición de señales fluorescentes
Preincubación (activación enzimática)	95 °C	2 min	1	1	Ninguna
Amplificación (preamp. Headstart)	95 °C	20 s	NINGUNO	10	Ninguna
	67 °C	30 s			Ninguna
	70 °C	30 s			Ninguna
Amplificación	95 °C	20 s	50	45	Ninguna
	53 °C	1 min.			Individual
	70 °C	30 s			Ninguna
Enfriamiento (mantenimiento)	40 °C	30 s	1	1	Ninguna

15 Los cebadores par la amplificación por PCR de la mutación G35T de KRAS fueron 5'-CTATTGTTGGATCATATTCGTC-3' (SEQ ID N°: 3) como el cebador inverso y 5'-ACTTGTGGTAGT TGGAGCTCT-3' (SEQ ID N°: 4) como el cebador directo. Se ha de señalar que, en el cebador directo, la base 3'T (subrayada) corresponde a la posición mutante 35. La penúltima C en la posición 34 también es un mal emparejamiento tanto con la secuencia mutante como con la secuencia de tipo silvestre, y está diseñada para aumentar la discriminación de la base 3' contra la diana de tipo silvestre.

20 La detección homogénea de la mutación G35T de KRAS se llevó a cabo mediante el uso de una sonda flap segmentable por endonucleasa, un casete FRET segmentable y una endonucleasa flap termoestable. La secuencia de la sonda flap para la detección de la mutación G35T era 5'-GACGCGGAGITGGCGTAGGCA-3'/3C6 (SEQ ID N°: 5), en la que la base mutante se muestra subrayada y el extremo 3' está bloqueado con un grupo hexanodiol para inhibir la extensión. La parte flap segmentada, que a continuación se une con el casete FRET y a su vez libera el fluoróforo alejándolo de su extintor, incluye todas las bases desde el extremo 5' hasta la T específica de la mutación. Los cebadores y las sondas flap fueron suministrados como artículos fuera de catálogo por Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, Iowa).

30 El casete FRET utilizado era 5'-FAM/TCT/extintor/AGCCGGTTTTCCGGCT GAGACTCCGCGTCCGT-3'/3C6 (SEQ ID N°: 6), donde FAM es fluoresceína, el extintor es Eclipse® Dark Quencher, y el extremo 3' está bloqueado con un grupo hexanodiol para inhibir la extensión del cebador. El casete FRET fue suministrado por Hologic (Madison, Wisconsin).

35 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en placas LightCycler® 480 Multiwell 96 (Roche, Indianapolis) en MOPS 10 mM pH 7,5, con MgCl₂ 7,5 mM, y dNTPs 250 µM (Promega, Madison, Wisconsin). La Taq polimerasa consistía en la enzima iTaq (BioRad, Hercules, California) y la enzima de segmentación era Cleavase 2.0 (Hologic, Madison, Wisconsin). La concentración del cebador directo era de 50 nM, la concentración del cebador inverso era de 500 nM, la sonda flap se utilizó en una concentración de 500 nM, y el casete FRET se empleó en una concentración final de 200 nM. Toda la amplificación y detección se llevó a cabo en el termociclador óptico LightCycler 480 (Roche, Indianapolis, Indiana).

Las figuras 2 y 3 muestran datos brutos y curvas cinéticas, generadas mediante el LightCycler, para las dos condiciones de ciclación diferentes, tal como se resumen en la tabla 1. La tabla 2 presenta los resultados, que muestran la mejoría de la respuesta cuantitativa lineal del protocolo de ciclación en 2 etapas.

5 La tabla 2 muestra la detección y cuantificación de la mutación G35T de KRAS en presencia de la secuencia de tipo silvestre en niveles, como se indica, comparando dos protocolos de ciclación diferentes. El punto en el que la fluorescencia de una muestra aumenta por encima de la fluorescencia de fondo se denomina "punto de cruce (C_p)" de la muestra (Manual Roche LightCycler 480, Indianapolis, Ind.), y en estos ensayos se calcula como el punto en el que la fluorescencia aumentó al 18% de la fluorescencia máxima. Los niveles de C_p por encima de 40 ciclos no muestran ninguna respuesta detectable a la dosis.

10 Tabla 2. Detección y cuantificación de la mutación G35T de KRAS

Copias 35T mutantes	Copias 35G de tipo silvestre	Relación mutante:tipo silvestre	Punto de cruce (C _p) en 1 etapa	Punto de cruce (C _p) en 2 etapas (Headstart)
0	100.000	N/A	44,56	40,33
0	100.000	N/A	43,87	40,27
10	99.990	1:10.000	43,99	38,89
10	99.990	1:10.000	43,04	38,09
100	99.900	1:1.000	43,39	36,59
100	99.900	1:1.000	43,66	36,31
1.000	99.000	1:100	43,66	31,41
1.000	99.000	1:100	39,70	31,82
10.000	90.000	1:10	39,62	26,71
10.000	90.000	1:10	33,68	26,73
100.000	0	N/A	27,72	20,62
100.000	0	N/A	28,04	20,45

REIVINDICACIONES

1. Un método de análisis de muestras, que comprende:
someter una mezcla de reacción que comprende:
- 5 reactivos de PCR para amplificar una diana de ácido nucleico, y
reactivos de segmentación flap para llevar a cabo un ensayo de segmentación flap en dicha diana de ácido nucleico,
- a las siguientes condiciones de termociclación:
- una primera serie de 5-15 ciclos de:
- 10 i. una primera temperatura de al menos 90 °C;
ii. una segunda temperatura de 60 °C a 75 °C;
iii. una tercera temperatura de 65 °C a 75 °C; seguida por:
- una segunda serie de 20-50 ciclos de:
- 15 i. una cuarta temperatura de al menos 90 °C;
ii. una quinta temperatura que es al menos 10 °C más baja que dicha segunda temperatura;
iii. una sexta temperatura de 65 °C a 75 °C;
- no añadiéndose ningún reactivo adicional a dicha reacción entre dicha primera y dicha segunda serie de ciclos y midiéndose la segmentación de una sonda flap en cada ciclo de dicha segunda serie de ciclos, y
comprendiendo dicho método la medición de la segmentación de dicha sonda flap mientras la mezcla de reacción está a dicha quinta temperatura.
- 20 2. El método según la reivindicación 1, en el que la segmentación de dicha sonda flap se mide detectando la fluorescencia de dicha mezcla de reacción durante cada uno de dichos 20-50 ciclos.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que:
- dichos reactivos de PCR comprenden: un molde de ácido nucleico; un primer cebador de PCR, un segundo cebador de PCR, una polimerasa termoestable, y nucleótidos; y
- 25 dichos reactivos de segmentación flap comprenden: un oligonucleótido invasivo, una sonda flap, un endonucleasa flap termoestable y un casete FRET,
- teniendo dicho primer cebador de PCR y dicho oligonucleótido invasivo secuencias de nucleótidos diferentes.
4. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que:
- dichos reactivos de PCR comprenden: un molde de ácido nucleico; un primer cebador de PCR, un segundo cebador de PCR, una polimerasa termoestable, y nucleótidos; y
- 30 dichos reactivos de segmentación flap comprenden: un oligonucleótido invasivo, una sonda flap, un endonucleasa flap y un casete FRET,
- teniendo dicho primer cebador de PCR y dicho oligonucleótido invasivo la misma secuencia de nucleótidos.
5. El método según la reivindicación 4, en el que dicho primer cebador de PCR está presente en dicha mezcla de reacción en la misma concentración que el segundo cebador de PCR.
- 35 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha quinta temperatura está dentro del intervalo de 50 °C a 55 °C.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas condiciones de termociclación incluyen una primera serie de 8-12 ciclos.
- 40 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha mezcla de reacción tiene un volumen de 5 µl a 50 µl y cada una de dichas primera a sexta temperaturas tiene, independientemente, una duración de 10 segundos a 3 minutos.

9. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas segunda y tercera temperaturas son la misma temperatura.

5 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que adicionalmente comprende la representación gráfica de la cantidad de segmentación que se produce en cada uno de los ciclos de dicha segunda serie, proporcionando de este modo una estimación de la abundancia de dicha mutación en dicha diana de ácido nucleico.

11. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho ensayo de segmentación flap detecta una mutación en dicha diana de ácido nucleico.

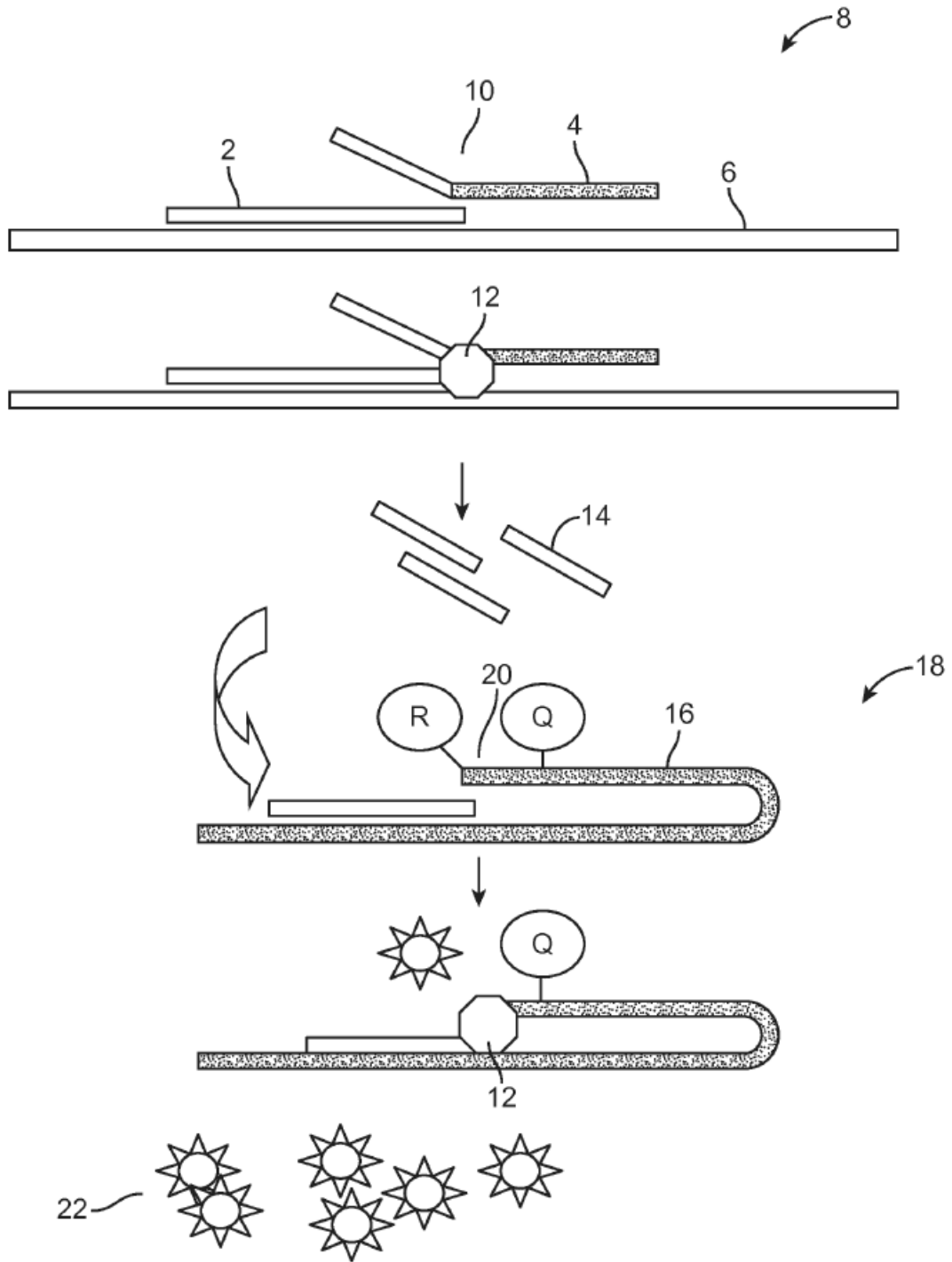


FIG. 1

Curvas de Amplificación

— C1: mutante 1e5	-- C2: 1m:10WT	----- C3: 1m:100WT	— C4: 1m:1000WT
----- C5: 1m:10000WT	--- C6: WT 1e5	----- C7: HGD 1e5	— C8: agua
— D1: mutante 1e5	-- D2: 1m:10WT	----- D3: 1m:100WT	— D4: 1m:1000WT
----- D5: 1m:10000WT	--- D6: WT 1e5	----- D7: HGD 1e5	— D8: w:agua

Nombre de la muestra	Número de copias de mutantes	Valor Cp de alternativa en 1 etapa
WT 1e5	0	44.56
WT 1e5	0	43.87
1M:10000WT*	10	43.99
1M:10000WT	10	43.04
1M:1000WT	100	43.39
1M:1000WT	100	43.66
1M:100WT	1000	39.7
1M:100WT	1000	39.62
1M:10WT	10000	33.68
1M:10WT	10000	34.28
Mutante 1e5	100000	27.72
Mutante 1e5	100000	28.04

*Nota: M y WT representan copia mutante y copia de tipo silvestre, respectivamente.

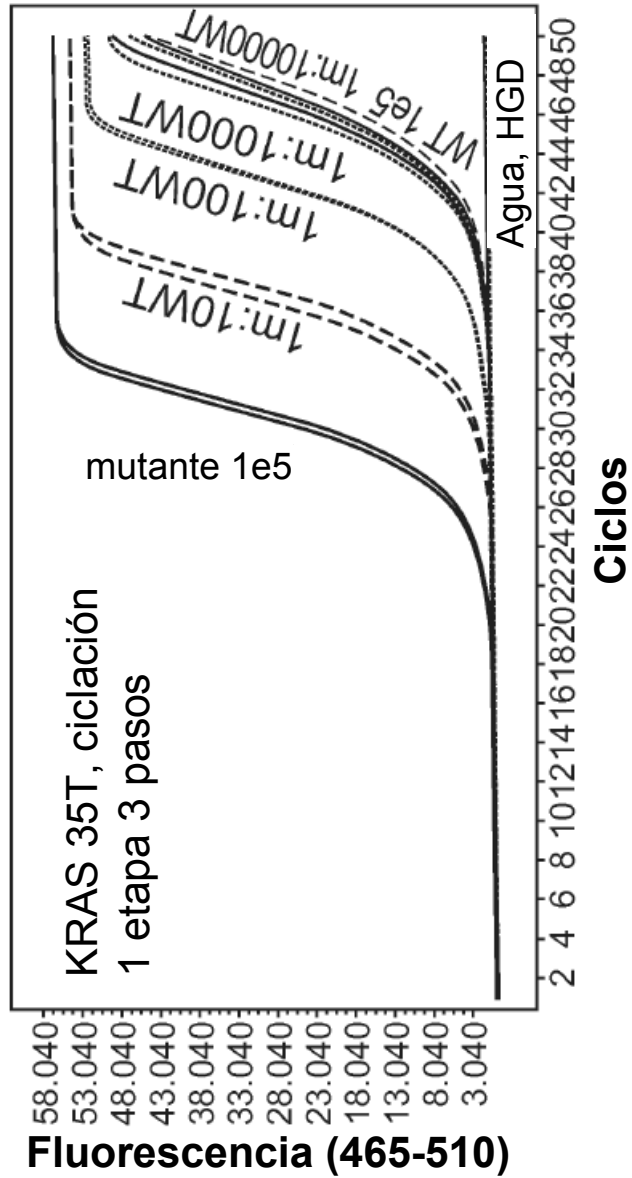
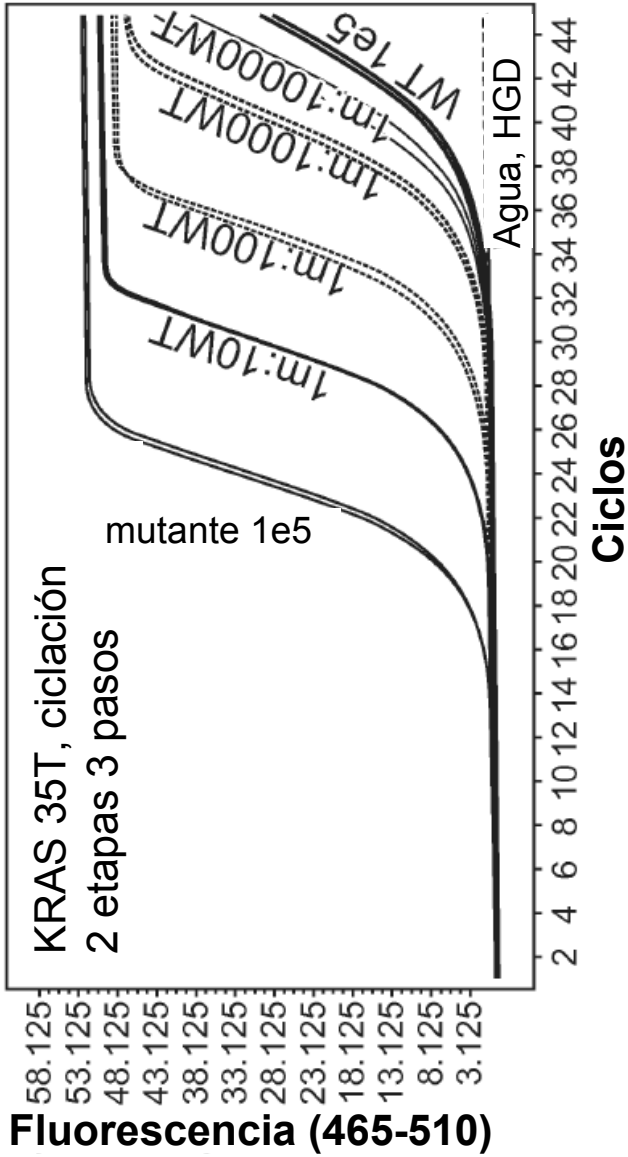


FIG. 2

Curvas de Amplificación

— C1: mutante 1e5	— C2: 1m:10WT	----- C3: 1m:100WT	----- C4: 1m:1000WT
— C5: 1m:10000WT	— C6: WT 1e5	----- C7: HGD 1e5	— C8: agua
— D1: mutante 1e5	— D2: 1m:10WT	----- D3: 1m:100WT	----- D4: 1m:1000WT
— D5: 1m:10000WT	— D6: WT 1e5	----- D7: HGD 1e5	— D8: agua



Nombre de la muestra	Número de copias de mutantes	Valor Cp de alternativa en 2 etapas
WT 1e5	0	40.33
WT 1e5	0	40.27
1M:10000WT*	10	38.89
1M:10000WT	10	38.09
1M:1000WT	100	36.59
1M:1000WT	100	36.31
1M:100WT	1000	31.41
1M:100WT	1000	31.82
1M:10WT	10000	26.71
1M:10WT	10000	26.73
Mutante 1e5	100000	20.62
Mutante 1e5	100000	20.45

*Nota: M y WT representan copia mutante y copia de tipo silvestre, respectivamente.

FIG. 3