

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 289**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2008** E 12169599 (3)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017** EP 2505673

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

30 Prioridad:

28.09.2007 GB 0719034

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

28.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

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

ES 2 620 289 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cebadores polinucleótidos para detectar mutaciones PIK3CA

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para la detección de la presencia o ausencia de mutaciones en un gen, un kit que comprende polinucleótidos y el uso del kit.

Antecedentes de la técnica

10 Las fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3K) son una gran familia de cinasas lipídicas involucradas en la señalización celular. La vía P13K-AKT es activada en varios tipos de tumores, lo que genera anomalías de crecimiento, proliferación y supervivencia celular (agregar referencia de 1 revisión reciente). Recientemente, se han identificado mutaciones en la subunidad catalítica de la clase 1A P13K (PIK3CA) en cánceres humanos^[1]. La función exacta de estas mutaciones en la carcinogénesis aún debe definirse claramente, pero con los constantes desarrollos de varios inhibidores de P13K diana, la detección de las mutaciones será cada vez más importante para la selección de los pacientes. Los desafíos técnicos en la detección de dichas mutaciones surgen debido a las limitaciones de las biopsias tumorales que solamente pueden contener pequeñas cantidades de las secuencias mutadas. Además, el ADN que se extrae del tejido sumergido en parafina a menudo está degradado y es de mala calidad. El nivel mínimo de ADN mutante necesario para la detección mediante secuenciación es del 15-25 % y, por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar ensayos sensibles que puedan detectar pequeñas cantidades de alelos mutados en una muestra heterogénea y los productos necesarios para llevar a cabo los ensayos.

La presente invención intenta abordar esta necesidad.

20 Descripción de la invención

La presente invención proporciona análisis sensibles y sólidos para las mutaciones de PIK3CA transmitidas por tumores.

En una realización, la invención se refiere a un método para la detección de la presencia o ausencia de una mutación en el gen PIK3CA que comprende las etapas de:

25 a) mezclar una muestra de ácido nucleico que comprende al menos un fragmento del gen PIK3CA con un primer cebador y un segundo cebador y llevar a cabo PCR en la mezcla; y

b) detectar hibridación del primer cebador con la muestra de ácido nucleico, en donde la hibridación indica la presencia de una mutación,

30 en donde el primer cebador puede hibridarse con la secuencia mutante E545K del gen PIK3CA pero no es complementario de la secuencia de tipo silvestre y en donde los seis nucleótidos finales en el extremo 3' del primer cebador son idénticos a los seis nucleótidos finales en el extremo 3' de la SEQ ID NO. 14, en donde el cebador se hibrida con la secuencia mutante más fácilmente que con la secuencia de tipo silvestre y en donde el segundo cebador corresponde a una región del fragmento de la secuencia PIK3CA corriente abajo de la región de la que es complementario el primer cebador.

35 Preferiblemente, el segundo cebador comprende una secuencia según la SEQ ID NO. 18

Preferiblemente, el método comprende además la etapa de, antes de la etapa a), amplificar la cantidad de copias del fragmento del gen PIK3CA usando amplificación de ácidos nucleicos por ciclación térmica, preferiblemente PCR.

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

40 Convenientemente, la etapa b) comprende la etapa de mezclar la muestra de ácido nucleico y el polinucleótido con un segundo cebador que corresponde a una región del fragmento de la secuencia de PIK3CA corriente abajo de la región de la que es complementario el polinucleótido y llevar a cabo PCR en la mezcla.

45 De manera alternativa, el método comprende además la etapa de llevar a cabo PCR en la muestra usando cebadores de control y comparar la amplificación del gen PIK3CA con la amplificación usando el polinucleótido y el segundo cebador.

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

50 Convenientemente, el polinucleótido comprende un grupo inactivador y un grupo fluoróforo y en donde la etapa b) comprende exponer la mezcla a la luz de una longitud de onda a la que responde el fluoróforo en ausencia del grupo inactivador y detectar la luz a la longitud de onda emitida por el grupo fluoróforo en ausencia del grupo inactivador.

Es preferible que el gen PIK3CA sea la secuencia disponible como número de acceso GenBank NM 006218, versión número NM 006218.2 GI:54792081.

En la presente memoria descriptiva, "ARMS" es el sistema de mutación refractario a la amplificación descrito en, por ejemplo, EP-A-0332435.

- 5 Cuando se haga referencia en la presente memoria descriptiva a un porcentaje de un polinucleótido en comparación con un polinucleótido de referencia, esto se puede determinar mediante los algoritmos conocidos en la técnica.

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

10 La invención se refiere a un kit que comprende al menos dos cebadores, en donde el primer cebador es un cebador directo, y en donde el segundo cebador es un cebador inverso, en donde el primer cebador puede hibridarse con la secuencia mutante E545K del gen PIK3CA pero no es complementario de la secuencia de tipo silvestre y en donde los seis nucleótidos finales en el extremo 3' del primer cebador son idénticos a los seis nucleótidos finales en el extremo 3' de la SEQ ID NO.14, en donde el cebador se hibrida con la secuencia mutante más fácilmente que con la secuencia de tipo silvestre y en donde el segundo cebador corresponde a una región del fragmento de la secuencia PIK3CA corriente abajo de la región de la que el primer cebador es complementario.

Preferiblemente, el segundo cebador en el kit comprende una secuencia según la SEQ ID NO. 18.

20 La invención también se refiere al uso de un kit de acuerdo con la invención para la detección de una mutación en una muestra de ácido nucleico que contiene al menos un fragmento del gen PIK3CA.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados de llevar a cabo detección y secuenciación Scorpions en muestras que contienen el gen PIK3CA mutante.

Descripción detallada

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

En realizaciones específicas, los cebadores de polinucleótidos son cebadores directos e inversos que se hibridan con el gen PIK3CA para permitir que ocurra una reacción de amplificación por PCR. Por lo tanto, el cebador directo se hibrida corriente arriba de y hacia la cadena opuesta del cebador inverso y los cebadores directos e inversos en conjunto definen una secuencia de amplicon que se amplifica durante la PCR. La secuencia del cebador directo se selecciona de manera de que no sea complementaria de la secuencia de tipo silvestre, pero pueda hibridarse con una secuencia de PIK3CA mutante.

30 A los efectos de detectar la presencia del gen PIK3CA mutante en la muestra, se mezclan los cebadores con la muestra. Luego, los agentes necesarios para la PCR (nucleótidos trifosfatos apropiados, enzima de polimerasa de ADN y una solución amortiguadora) se agregan a la muestra y se lleva a cabo la PCR. Si la muestra contiene la secuencia mutante con la cual se puede hibridar el cebador directo, se amplifica el amplicon durante la PCR y, por lo tanto, se indica la presencia de la secuencia mutante en la muestra, si la muestra no contiene la secuencia mutante, el cebador directo se une a la secuencia de PIK3CA con baja eficacia y, por lo tanto, no se produce amplificación, o muy poca, de la secuencia de amplicon.

35 A los efectos de detectar la mutación E545K, la secuencia de cebador directo es preferiblemente la SEQ ID NO. 14. Sin embargo, debe reconocerse que la secuencia exacta del cebador directo no necesariamente tiene que ser idéntica a esta secuencia, siempre que el cebador directo se hibride con la secuencia mutante más fácilmente que con la secuencia de tipo silvestre. En la secuencia que se estableció anteriormente, son los seis nucleótidos finales (es decir, los nucleótidos en el extremo 3') de los cebadores los que proporcionan la especificidad de unión, por lo tanto, estos nucleótidos deben ser idénticos a la secuencia proporcionada.

40 A los efectos de detectar la presencia de los amplicones formados en la muestra, el cebador inverso es un cebador denominado "Scorpions" en las realizaciones de la presente invención. Se proporcionan detalles de los cebadores Scorpions en WO-A-99/066071. Un cebador Scorpions comprende una secuencia cebadora complementaria de una primera secuencia diana de un gen (en la presente invención, PIK3CA) y una secuencia de cola que comprende una secuencia de sonda flanqueada por dos secuencias mutuamente complementarias. Se proporciona un resto de bloqueo de polimerasa de ADN (tal como el monómero hexetilenglicol (HEG)) entre la secuencia cebadora y la secuencia de cola. Se proporciona un grupo fluoróforo en un extremo de la secuencia de cola y se proporciona un grupo inactivador en el otro extremo de la secuencia de cola. En el uso, la secuencia cebadora del cebador Scorpions actúa como un cebador inverso durante la PCR de la manera normal y, por lo tanto, todo el cebador

Scorpions, incluida la secuencia de cola, se incorpora a cada amplicon. El resto de bloqueo de la polimerasa de ADN evita la duplicación de la secuencia de cola. Por lo tanto, las secuencias mutuamente complementarias en la secuencia de cola tienen la tendencia a hibridarse entre sí, acercando el grupo fluoróforo y el grupo inactivador y evitando la emisión del grupo fluoróforo. Sin embargo, si el amplicon contiene una segunda secuencia diana complementaria de la secuencia de sonda, la secuencia de sonda se une preferiblemente a la segunda secuencia diana, separando las secuencias mutuamente complementarias. Esto hace que el grupo fluoróforo y el grupo inactivador se separen en el espacio de manera que el grupo fluoróforo emita luz de una longitud de onda en respuesta a la luz incidente de otra longitud de onda. Por consiguiente, el cebador Scorpions permite la fácil detección de amplicones y, además, evita los resultados falso positivos (provocados por dímeros cebadores, por ejemplo) dado que solamente se genera una señal cuando el amplicon contiene la segunda secuencia diana.

El grupo fluoróforo puede ser Hex (4,7,2',4',5',7'-hexacloro-(3',6'-dipivaloilfluoresceinil)-6-carboxamidohehil]-1-0-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita), Fam ([3',6'-dipivaloilfluoresceinil)-6-carboxamidohehil]-1-0-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita) o Rox (5,6,-Carboxi-X-Rodamina). El grupo inactivador puede ser Dabcilo (5'-dimetoxitritiloxi-5-[(N-4'-carboxi-4-(dimetilamino)-azobenceno)-aminohexil-3-acrilimido]-2'-desoxiuridina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita).

En realizaciones de la presente invención, se proporciona un cebador Scorpions para la detección de la mutación E545K, donde la secuencia cebadora es la SEQ ID NO. 18.

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

En algunas realizaciones, también se lleva a cabo un ensayo de control para detectar la concentración total del gen PIK3CA en la muestra. Esto se logra realizando una reacción de PCR por separado con cebadores directos e inversos de control que definen un amplicón en otra región del gen PIK3CA. Se prefiere que el cebador directo sea la SEQ ID NO. 37 y el cebador inverso sea un cebador Scorpions, donde la secuencia cebadora es la SEQ ID NO. 39 y la secuencia de sonda es la SEQ ID NO. 38. Luego, la cantidad de ciclos de PCR necesarios para generar una cantidad umbral de amplicones de control se compara con la cantidad de ciclos de PCR necesarios para generar la cantidad umbral de amplicones que contienen la secuencia mutante para evaluar la proporción de copias mutantes del gen PIK3CA en la muestra. En general, dichos ensayos de control se llevan a cabo por separado de los ensayos de prueba.

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

La muestra de prueba de ácido nucleico es convenientemente una muestra de sangre, heces, esputo, lavaje colónico, lavaje bronquial u otro fluido corporal, o tejido obtenido de un individuo. Convenientemente, el individuo es humano, preferentemente, Homo sapiens. Se reconocerá que la muestra de prueba igualmente puede ser una secuencia de ácido nucleico que corresponde a la secuencia en la muestra de prueba. Es decir que la totalidad o una parte de la región en el ácido nucleico de muestra se puede amplificar en primer lugar usando cualquier técnica conveniente, tal como amplificación de ácido nucleico por ciclación térmica, en particular, PCR, o amplificación total del genoma (WGA) antes del uso en el método de la invención.

Se puede utilizar cualquier enzima conveniente para la polimerización, siempre que no afecte la capacidad de la polimerasa de ADN de distinguir entre las secuencias de plantilla normal y mutante hasta algún grado significativo. Ejemplos de enzimas convenientes incluyen enzimas termoestables que no presentan actividad de exonucleasa 3'-5' significativa, por ejemplo, polimerasa de ADN Taq, particularmente, polimerasa de ADN "Ampli Taq Gold" (PE Applied Biosystems), fragmento Stoffel, u otras modificaciones adecuadamente eliminadas de extremo N de polimerasas de ADN Taq o Tth (Thermus thermophilus).

EJEMPLOS

45 Materiales y métodos

Se diseñaron cebadores contra las 4 mutaciones más comunes en el gen PIK3CA (número de acceso: NM_006218). Se diseñaron cebadores ARMS para detectar 2 mutaciones en el exón 20: H1047R y H1047L; y 2 mutaciones en el exón 9: E452K y E454K. Se diseñó un cebador de control en la posición de ADNc 2450 en el gen PIK3CA.

50 También se diseñaron Scorpions. Para permitir la multiplexación de diversos ensayos en cada reacción, se etiquetaron los tres cebadores scorpion con distintos fluoróforos.

Diseño de cebadores

Se diseñaron diversos cebadores ARMS específicos para cada región diana. La región diana para las mutaciones E542K y E545K se muestran a continuación como las SEQ ID NOS. 1 y 2, respectivamente (las bases mutantes se muestran entre paréntesis con la variante normal en primer lugar). Los cebadores directos para las mutaciones

también se muestran a continuación (SEQ ID NOS. 3 a 16). Para potenciar la especificidad de estas reacciones, se utilizaron mal emparejamientos de cebadores adicionales cerca del extremo 3' (que se muestra subrayado en las secuencias cebadoras). Los cebadores óptimos (E542K-2 y E545K-4) se utilizaron para los experimentos descritos. El cebador Scorpions que se puede utilizar con las secuencias cebadoras se muestra como las SEQ ID NOS. 17 y 18. Las regiones de correspondencia entre el cebador Scorpions y las regiones diana se muestran resaltadas o subrayadas de forma idéntica.

Región de exón 9

AACAG AG AATCT CCATTTT AG CACTTACCTGT GACTCCATAG AAAAT CTTTCTCC TG GT
 CAGT G ATTT (C/T)AG AGA.GAG GAT CT CG.TGTAG AAATTGGTTTG AGCT GTT
 CTTTGTCAATTT~CCGTTAATTGATt STCTCTAS CTAGT CT GTTACT CT GTAAAAT A AAAI
 AATATCTTATÁ (SEQ ID NO. 1)

AACAGAG AATCTCC ATTTTAG C ACTTACCTGTG ACT CCATAG AAAAT CTTT CTCC
 TGCTfCmAGTGATTTTCAGAGAGAGGATCTCGTGTAGAAATTGCTTTGAGCTGTT CTTT GT C
 AtTTTCGCTTAAJT GÁTT GTCTCTAG CT AGTCT GTTACT CT GTAAAATA AAAT AAT ÁT
 CTTATATA (SEQ ID NO. 2)

Mutación	Secuencia cebadora	SEQ ID NO.
E542K-0	5'-CI 1 ICICIGCICAGIGAI 1 M-3'	3
E542K-1	5' -CTTT CTCCTG CTC AGT GATTAT-3'	4
E542K-2	5' -CTTT CTCCTG CTC AGTG ATTCT-3'	5
E542K-3	5' -CTTTCTCCTG CTC AGTG ATTGT-3'	6
E542K-4	5'-CmCTCCTGCTCAGTGATATT-3'	7
E542K-5	5'-CTTTCTCCTGCTCAGTGATCTT-3'	8
E542K-6	5'-CTTTCTCCTGCTCAGTGATGTT-3'	9
E545K-0	5' - ACT CCAT AG AAAAT CTTT CTCCTG CTT-3'	10
E545 K-1	5' - ACTCC AT AG AAAAT CTTT CTCCTG C AT-3'	11
E545K-2	5' - ACTCC AT AG AAAAT CTTT CTCCTG CCT-3'	12
E545K-3	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCGT-3'	13
E545K-4	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGATT-3'	14
E545K-5	5'-ACTCCATAGAAAATCMCTCCTGGTT-3'	15
E545K-6	5' - ACT CCAT AG AAAAT CTTT CTCCT GTTT-3'	16
Scorpion de exón 9	Hex-CGCGCTCGTGTAGAAATTGCTTTGAGCGCG-	17 y 18

Región de exón 20

La región diana para las mutaciones H1047R y H1047L se muestran a continuación como la SEQ ID NOS. 19 (las bases mutantes se muestran entre paréntesis con la variante normal en primer lugar). Los cebadores directos para las mutaciones también se muestran a continuación (SEQ ID NOS. 20 a 33). Para potenciar la especificidad de estas reacciones, se utilizaron mal emparejamientos de cebadores adicionales cerca del extremo 3' (que se muestra subrayado en las secuencias cebadoras). Los cebadores óptimos (H1047R-1 y H1047L-1) se utilizaron para los experimentos descritos. El cebador Scorpions que se puede utilizar con las secuencias cebadoras se muestra como las SEQ ID NOS. 34 y 35. Las regiones de correspondencia entre el cebador Scorpions y las regiones diana se muestran resaltadas o subrayadas de forma idéntica.

AGTG CAGTGTGG AAT CCAG AGT GAG CTTTC ATTTT CT CAGTTAT CTTTT C AGTTC
 AAT GCAT G CT GTTT A ATT GTGTGG AAGATCCAAT CC ATTTTT GTT GT CCAG CCAC
 CATGAfT/C/A'GTGCATCATTCAATTTGTTTCATGAAATAüTCCAAAGCCTCTTGCTC
 AGTTTTATCTÁ AGGCTAG GiGT CTTT C G AATGTAT G C AAT GT C AT C AAAAG ATT GT

AGTT CTGGCÁTT CCAGAG CC AAGCATC ATT GAG AAAAGATTT AT G AAGAG ATT G
GCATGCTGTCGAATAGCTAGATAAGCCTT {SEQ ID NO. 19}

Mutación	Secuencia cebadora	SEQ ID NO.
H1047R-0	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGAC-3'	20
H1047R-1	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGCC-3'	21
H1047R-2	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGGC-3'	22
H1047R-3	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGTC-3'	23
H1047R-4	5'-TGTTGTCCAGCCACCATAAC-3'	24
H1047R-5	5'-TGTTGTCCAGCCACCATCAC-3'	25
H1047R-6	5'-TGTTGTCCAGCCACCATTAC-3'	26
H1047L-0	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGAA-3'	27
H1047L-1	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGCA-3'	28
H1047L-2	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGGA-3'	29
H1047L-3	5' -TGTTGT CC AG CC ACC AT GTA-3'	30
H1047L-4	5'-TGTTGTCCAGCCACCATAAAA-3'	31
H1047L-5	5'-TGTTGTCCAGCCACCATCAA-3'	32
H1047L-6	5'-TGTTGTCCAGCCACCATTAA-3'	33
Scorpion de exón 20	Fam-CGCGGCATGAAATACTCCAAAGCCGCG-que-heg-CCCTAG CGTTÁG ATAA AACTGAG CAA	34 y 35

Cebadores de control

- 5 Los cebadores de control se muestran a continuación: Las regiones de correspondencia entre el cebador Scorpions y las regiones diana se muestran resaltadas o subrayadas de forma idéntica.

AGGCTTGAAGAGTGfGGÁÁITÁGTCTCTGCAAAAAGGCCACTGTGGTTGAAT
TGGGAGÁÁCCCÁGÁCÁfÁfGTCAGAGTTACTGTTTCAGAACAATGAGATCATC
TTTAAAAATGGGGATGG {SEQ ID NO. 36}

Mutación	Secuencia cebadora	SEQ ID NO.
Cebador de control	5 '-AG AT G AT CT CATT GTT CT G AAAC AG-3'	37
Scorpion de control	Rox-CCGGCCAATTCAACCACAGTGGCCGG- que-heg-GGCITGAAGAGTG“GGMTTA	38 y 39

10

Todos los cebadores fueron sintetizados y suministrados por Invitrogen. Amortiguador PCR, Taq y magnesio fueron suministrados por Eurogentec y dNTPS fueron adquiridos de Abgene Ltd. Scorpions fueron sintetizados y suministrados por ATDBio.

15

Los ensayos fueron multiplexados en 2 reacciones que contenían un ensayo de control y 2 ensayos de ARMS (1 x exón 9 y 1 x exón 20). Los ensayos fueron realizados en 25 ul de volumen de reacción que contenía amortiguador 1x PCR, 4,0 mM de MgCl₂, 200 uM de mezcla de dNTP, 0,25 uM de cada cebador (cebador de control y 2 cebadores ARMS) y 0,25 uM de cada scorpion (scorpion de control (SEQ ID NOS. 38 y 39), scorpion de exón 20 (SEQ ID NOS. 34 y 35), scorpion de exón 9 (SEQ ID NOS. 17 y 18)). Se agregaron 2,5 ul de plantilla de ADN a cada reacción. Los cebadores H1047R y E542K se multiplexaron con 2,5 de unidades de polimerasa Taq por

reacción. Los cebadores H1047L y E545K se multiplexaron con 3,0 de unidades de polimerasa Taq por reacción. El cebador E542K utilizado fue E542K-2 (SEQ ID NO. 5). El cebador E545K utilizado fue E545K- 4 (SEQ ID NO. 14). El cebador H1047R utilizado fue H1047R-1 (SEQ ID NO. 21). El cebador H1047L utilizado fue H1047L-1 (SEQ ID NO. 28).

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

Se construyeron casetes de ADN con mutaciones puntuales para utilizarlos como controles positivos en función de un método descrito por Higuchi et ál.^[2]. En resumen, se utilizaron cebadores exteriores y de mutámero correspondientes para generar casetes medios con extremos complementarios, donde cada casete medio contiene una base mutante. Estos productos de PCR se mezclaron y amplificaron con cebadores anidados interiores. El autocebado de los casetes medios complementarios y la posterior amplificación crearon un producto final con una base mutada. Los productos se secuenciaron para garantizar que se haya creado la secuencia correcta. Este proceso se repitió para cada mutación de interés. El casete de ADN se mezcló con una cantidad igual de ADN genómico para crear un control positivo 100 %.

15 Ejemplo 1

Para determinar la especificidad de las reacciones y los cebadores, cada ensayo se realizó con 5- 50 ng de ADN genómico por reacción para evaluar la señal de avance provocado por extensión del cebador no emparejado. Para cada reacción, se definió un valor de ACt (Ct de control - mutación Ct) (Ct = ciclo umbral). Las reacciones se realizaron seis veces para cada concentración de ADN y se repitieron por triplicado en distintas ocasiones para definir un valor de ACt de corte por debajo del cual puede decirse que cualquier amplificación se debe a la presencia de una secuencia mutante y no a una señal de avance. Se determinó que el valor de ACt de corte era de 1 Ct por debajo del valor de ACt más bajo observado en todas las reacciones para cada ensayo. Para los ensayos de H1047R y H1047L, el ACt de corte se definió como 12, para el ensayo de E542K, el ACt de corte fue de 9 y para el ensayo de E545K, el ACt de corte fue de 8.

25 Ejemplo 2

Para evaluar la sensibilidad del ensayo, se diluyeron 5 copias de ADN mutante en diversas concentraciones de ADN genómico para proporcionar concentraciones finales de 5, 2, 1, 0,5 y 0,1 % de ADN mutante con respecto al tipo silvestre. La Tabla 1 ilustra la sensibilidad de los 4 ensayos ARMS. La tabla muestra los valores de ACt para la reducción de las concentraciones de ADN mutante en un entorno de ADN de tipo silvestre. Los ACt de corte predefinidos se ilustran en la columna final. Los ensayos de exón 20 pudieron detectar 5 copias de ADN mutante cuando este comprendía solamente 0,1 % del ADN total (dentro del ACt de corte definido previamente). Los ensayos de exón 9 pudieron detectar 5 copias de ADN en una concentración de 1 % con un ACt dentro de los valores de corte predefinidos (Tabla 1).

Tabla 1:

ADN WT/ reacción (copias)	ADN MUT/ reacción (copias)	% relativo de alelos MUT	ΔCT					ΔCt DE CORTE	
			H1047L	H1047R	E542K	E545K			
100	5	5%	5.9	4.3	5.1	5.8			
250	5	2%	7.2	6.7	7.2	6.4	H1047L	12	
500	5	1%	8.3	7.6	8.4	7.0	H1047R	12	
1000	5	0.5%	9.3	9.0	10.2	8.1	E542K	9	
5000	5	0.1%	11.5	10.5	12.1	10.1	E545K	8	

35

Ejemplo 3

Se usaron mezclas de líneas celulares que contenían la mutación H1047R (HCT-116) y E545K (MCF-7) para comparar las sensibilidades relativas de los ensayos ARMS con la secuenciación. Ambas líneas celulares fueron heterocigotas para la mutación. La secuenciación se realizó usando cebadores y condiciones de ciclación por PCR, como lo describen Samuels et ál^[1], los ensayos ARMS y la secuenciación se realizaron en concentraciones del gen mutante de 100 %, 50 %, 30 %, 10 % y 1 % de la mezcla total. Los resultados se muestran en la Figura 1 donde los

40

resultados bajo el título "Scorpions" muestran el aumento de la cantidad de copias de amplicón después de rondas sucesivas de PCR (los resultados que usan cebadores de control y cebadores mutantes se muestran como líneas separadas). Bajo el título "secuenciación de ADN" se muestran los resultados de secuenciación de la cadena inversa del gen en la mezcla. La secuenciación no pudo detectar la presencia de H1047R mutante cuando se encontraba presente en menos del 50 % de la mezcla total y no pudo detectar la presencia de E545K mutante cuando se encontraba presente en menos del 30 % de la mezcla total. Los ensayos que usan los cebadores de la invención, por el contrario, pudieron detectar la presencia de mutantes en una concentración %.

Ejemplo 4

Este ensayo se aplicó a ADN extraído de tejido recientemente congelado de diversos tipos de tumor que se evaluaron para determinar la presencia de mutaciones de PIK3CA usando el ensayo ARMS/Scorpion. En total, había ADN disponible de 279 muestras de tumor. El ensayo registró mutaciones en 5 de 49 (10,2 %) muestras de cáncer colorrectal, 19 de 49 (38,7 %) muestras de cáncer de mama, 1 de 51 (1,9 %) muestras de cáncer de pulmón, y 1 de 34 (2,9 %) muestras de melanoma. No se detectaron mutaciones en 50 muestras de cáncer de próstata o 46 muestras de cáncer de ovario. De las muestras colorrectales positivas para las mutaciones de PIK3CA, 3 fueron H1047R,

1 fue H1047L y 1 fue E542K; de las muestras de cáncer de mama positivas para PIK3CA, 15 fueron H1047R, 1 fue H1047L y 3 fueron E545K; ambas mutaciones en la muestra de cáncer de pulmón y muestra de melanoma positivas para las mutaciones de PIK3CA fueron H1047R. La secuenciación identificó solamente 14 del total de 26 (53 %) de mutaciones detectadas. La secuenciación detectó una mutación en una muestra de cáncer de mama que el ensayo ARMS no estaba diseñado para detectar (aprox. 1634 A>G; p E545G). Esta no es una mutación novedosa y se ha descrito anteriormente en cánceres de mama y colorrectal^[3-5].

La incidencia de mutaciones de PIK3CA en las muestras analizadas fue coherente con los estudios anteriores con excepción de cáncer de ovario^[1, 3-9]. Las mutaciones de PIK3CA se han descrito anteriormente en cánceres de ovario pero se ha sugerido que puede haber una asociación con los cánceres de endometrio y células claras^[8,10]. Todos los cánceres de ovario analizados en este estudio fueron adenocarcinomas serosos que pueden explicar la ausencia de cualquier mutación de PIK3CA.

El ensayo ARMS identificó significativamente más mutaciones en las muestras clínicas que lo que se observó mediante secuenciación directa. Las mezclas de líneas celulares confirman que este ensayo es más sensible que la secuenciación para detectar las mutaciones de PI3KCA de interés. Es probable que la heterogeneidad de las muestras clínicas que contendrán tejido normal y tumoral signifique que, en algunos casos, la incidencia de la mutación se encontrará por debajo de lo detectable por medio de los métodos de secuenciación y, por lo tanto, el ensayo ARMS es más adecuado para la aplicación clínica. El obstáculo es que solamente se detectarán determinadas mutaciones específicas de ARMS. Sin embargo, en esta serie de 279 muestras, solamente se detectó una única mutación en el exón 9 o 20 del gen PI3KCA que el ensayo ARMS no estaba diseñado para detectar.

En resumen, los ejemplos muestran que la presente invención proporciona un ensayo sensible y de alto rendimiento para la detección de las 4 mutaciones más comunes en el gen PIK3CA. Este ensayo se puede aplicar a pequeñas cantidades de ADN y puede detectar niveles bajos de PIK3CA mutante dentro de una muestra.

Texto libre de listado de secuencias

<210 1

<223> región diana E542K <210> 2

<223> región diana E545K

<210> 3

<223> cebador directo E542K-0 <210 4

<223> cebador directo E542K-1 <210> 5

<223> cebador directo E542K-2

<213> 6

<223> cebador directo E542K-3 <210 7

<223> cebador directo E542K-4 <210> 8

<223> cebador directo E542K-5

<210 9

- <223> cebador directo E542K-6 <210> 10
- <223> cebador directo E545K-0 <210> 11
- <223> cebador directo E545K-1
- <210> 12
- 5 <223> cebador directo E545K-2 <210> 13
- <223> cebador directo E545K-3 <210> 14
- <223> cebador directo E459-K-4
- <210> 15
- <223> cebador directo E545K-5 <210> 16
- 10 <223> cebador directo E545K-6
- <210> 17
- <223> Scorpion de exón 9 <210> 18
- <213> Scorpion de exón 9 2 <210> 19
- <223> regiones diana H1047R y H1047L <210> 20
- 15 <223> cebador directo H1047R-0 <210> 21
- <223> cebador directo H1047R-1 <210> 22
- <223> cebador directo H1047R-2 <210> 23
- <223> cebador directo H1047R-3 <210> 24
- <223> cebador directo H1047R-4 <290> 25
- 20 <223> cebador directo H1047R-5 <210> 26
- <223> cebador directo H1047R-6 <210> 27
- <223> cebador directo H1047L O <210> 28
- <223> cebador directo H1047L-1
- <210> 29
- 25 <223> cebador directo H1047L-3 <210> 30
- <223> cebador directo H1047-3
- <210> 31
- <223> cebador directo H1047L-4 <210> 32
- <223> cebador directo H1047L-5
- 30 <210> 33
- <223> cebador directo H10471-6
- <210> 34
- <223> Scorpion de exón 20 <210> 35
- <223> Scorpion de exón 20 2 <210> 36
- 35 <223> región diana de control <210> 37
- <223> cebador de control <210> 38
- <223> Scorpion de control

<210> 39

<223> Scorpion de control 2

Referencias:

5 1. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et ál. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. Science 2004;304(5670):554.

2. Higuchi R, Krummel B, Saiki RK. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. Nucleic Acids Res 1988;16(15):7351-67.

3. Wu G, Xing M, Mambo E, et ál. Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. Breast Cancer Res 2005;7(5):R609-16.

10 4. Levine DA, Bogomolny F, Yee CJ, et ál. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers, Clin Cancer Res 2005;11(8):2875-8.

5. Velho S, Oliveira C, Ferreira A, et ál. The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. Eur J Cancer 2005;41(11):1649-54.

15 6. Lee JW, Soung YH, Kim SY, et ál. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. Oncogene 2005;24(8):1477-80.

7. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, et ál. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. Cancer Biol Ther 2004;3(8):772-5.

8. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, et ál. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. Cancer Res 2004;64(21):7678-81.

20 9. Omholt K, Krockel D, Ringborg U, Hansson J. Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. Melanoma Res 2006;11(2):197-200.

10. Wang Y, Helland A, Holm R, Kristensen GB, Borresen-Dale AL. PIK3CA mutations in advanced ovarian carcinomas. Hum Mutat 2005;25(3):322.

Listado de secuencias

25 <110> Qiagen Manchester Ltd.

<120> Cebadores polinucleótidos

30 <130> B051-MA02EP6

<150> GB0719034.1

<151> 28-09-2007

35 <160> 39

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

40 <211> 180

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

45 <223> región diana E542K

<400> 1

```
aacagagaat ctccatttta gcacttacct gtgactccat agaaaatctt tctcctgctc      60
agtgatttga gagagaggat ctcggttaga aattgctttg agctgttctt tgtcattttc      120
ccttaattca ttgtctctag ctagtctggtt actctgtaaa ataaaataat atcttatata      180
```

50 <210> 2

<211> 180

ES 2 620 289 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> región diana E545K

 <400> 2

 aacagagaat ctccatttta gcacttacct gtgactccat agaaaatctt tctcctgcty 60
 agtgatttca gagagaggat ctcgtgtaga aattgctttg agctgttctt tgtcattttc 120
 ccttaattca ttgtctctag ctagtctggt actctgtaaa ataaaataat atcttatata 180
 10
 <210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> cebador directo E542K-0

 <400> 3
 20 ctttctcctg ctcagtgatt tt 22

 <210> 4
 <211> 22
 25 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador directo E542K-1
 30
 <400> 4

 ctttctcctg ctcagtgatt at 22
 35
 <210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> cebador directo E542K-2

 <400> 5
 45 ctttctcctg ctcagtgatt ct 22

 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 50 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador directo E542K-3
 55
 <400> 6

 ctttctcctg ctcagtgatt gt 22
 60
 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> E542K-4 fwd primer
 5 <400> 7
 ctttctcctg ctcagtgata tt 22
 <210> 8
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> cebador directo E542K-5
 <400> 8
 ctttctcctg ctcagtgatc tt 22
 20 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador directo E542K-6
 <400> 9
 30 ctttctcctg ctcagtgatg tt 22
 <210> 10
 <211> 27
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador directo E545K-0
 <400> 10
 actccataga aaatcttct cctgctt 27
 45 <210> 11
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador directo E545K-1
 <400> 11
 55 actccataga aaatcttct cctgcat 27
 <210> 12
 <211> 27
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador directo E545K-2
 65 <400> 12

actccataga aaatcttct cctgcct 27

5 <210> 13
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador directo E545K-3
 <400> 13

actccataga aaatcttct cctgcgt 27

15 <210> 14
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador directo E454K-4
 <400> 14

25 actccataga aaatcttct cctgatt 27

30 <210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador directo E545K-5

35 <400> 15

actccataga aaatcttct cctggtt 27

40 <210> 16
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cebador directo E545K-6
 <400> 16

50 actccataga aaatcttct cctgttt 27

55 <210> 17
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Scorpion de exón 9
 <400> 17

60 cgcgctcgtg tagaaattgc tttgagcgcg 30

65 <210> 18
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 620 289 T3

<220>
 <223> Scorpion de exón 9 2

5 <400> 18
 caatgaatta agggaaaatg aca 23

10 <210> 19
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Regiones diana H1047R y H1047L

<400> 19

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

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

25 <220>
 <223> cebador directo H1047R-0

<400> 20

30 tgttgtccag ccaccatgac 20

35 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> cebador directo H1047R-1

<400> 21

tgttgtccag ccaccatgcc 20

45 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> cebador directo H1047R-2

<400> 22

55 tgttgtccag ccaccatggc 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador directo H1047R-3
 5 <400> 23
 tggtgtccag ccaccatgct 20
 10 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> cebador directo H1047R-4
 <400> 24
 20 tggtgtccag ccaccataac 20
 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador directo H1047R-5
 30 <400> 25
 tggtgtccag ccaccatcac 20
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador directo H1047R-6
 <400> 26
 tggtgtccag ccaccattac 20
 45 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> H1047L-0 fwd primer
 <400> 27
 55 tggtgtccag ccacatgaa 20
 <210> 28
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador directo H1047L-1
 65 <400> 28

5 tggtgtccag ccaccatgca 20
 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> cebador directo H1047L-3
 <400> 29
 15 tggtgtccag ccaccatgga 20
 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> cebador directo H1047-3
 <400> 30
 25 tggtgtccag ccaccatgta 20
 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> cebador directo H1047L-4
 <400> 31
 35 tggtgtccag ccaccataaa 20
 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador directo H1047L-5
 <400> 32
 45 tggtgtccag ccaccatcaa 20
 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> cebador directo H1047L-6
 <400> 33
 55 tggtgtccag ccaccattaa 20
 <210> 34
 <211> 27
 <212> ADN

ES 2 620 289 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> Scorpion Exón 20
 5 <400> 34
 cgcgcatga aatactcaa agccgcg 27
 10 <210> 35
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Scorpion Exón 20 2
 <400> 35
 20 ccctagcctt agataaaact gagcaa 26
 <210> 36
 <211> 125
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> región diana de control
 30 <400> 36
 aggcttgaag agtgtcgaat tatgtcctct gcaaaaaggc cactgtggtt gaattgggag 60
 aaccagaca tcatgtcaga gttactgttt cagaacaatg agatcatctt taaaaatggg 120
 gatgg 125
 <210> 37
 35 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador de control
 <400> 37
 45 agatgatctc atgttctga aacag 25
 <210> 38
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Scorpion de Control
 <400> 38
 55 ccggccaatt caaccacagt ggccgg 26
 <210> 39
 <211> 21
 60 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

<223> Scorpion de Control 2

<400> 39

5

ggctgaaga ggtcgaatt a 21

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de la presencia o ausencia de una mutación en el gen PIK3CA que comprende las etapas de:

- 5 a) mezclar una muestra de ácido nucleico que comprende al menos un fragmento del gen PIK3CA con un primer cebador y un segundo cebador y llevar a cabo PCR en la mezcla; y
- b) detectar hibridación del primer cebador con la muestra de ácido nucleico, en donde la hibridación indica la presencia de una mutación,

10 en donde el primer cebador puede hibridarse con la secuencia mutante E545K del gen PIK3CA pero no es complementario de la secuencia de tipo silvestre y en donde los seis nucleótidos finales en el extremo 3' del primer cebador son idénticos a los seis nucleótidos finales en el extremo 3' de la SEQ ID NO. 14, en donde el cebador se hibrida con la secuencia mutante más fácilmente que con la secuencia de tipo silvestre y en donde el segundo cebador corresponde a una región del fragmento de la secuencia PIK3CA corriente abajo de la región de la que es complementario el primer cebador.

15 2. Un método según la reivindicación 1, en donde el segundo cebador comprende una secuencia según la SEQ ID NO: 18.

20 3. Un kit que comprende al menos dos cebadores, en donde el primer cebador es un cebador directo, y en donde el segundo cebador es un cebador inverso, en donde el primer cebador puede hibridarse con la secuencia mutante E545K del gen PIK3CA pero no es complementario de la secuencia de tipo silvestre y en donde los seis nucleótidos finales en el extremo 3' del primer cebador son idénticos a los seis nucleótidos finales en el extremo 3' de la SEQ ID NO.14, en donde el cebador se hibrida con la secuencia mutante más fácilmente que con la secuencia de tipo silvestre y en donde el segundo cebador corresponde a una región del fragmento de la secuencia PIK3CA corriente abajo de la región de la que el primer cebador es complementario.

4. Un kit según la reivindicación 3, en donde el segundo cebador comprende una secuencia según la SEQ ID NO: 18.

25 5. El uso de un kit según la reivindicación 3 para la detección de una mutación en una muestra de ácido nucleico que contiene al menos un fragmento del gen PIK3CA.

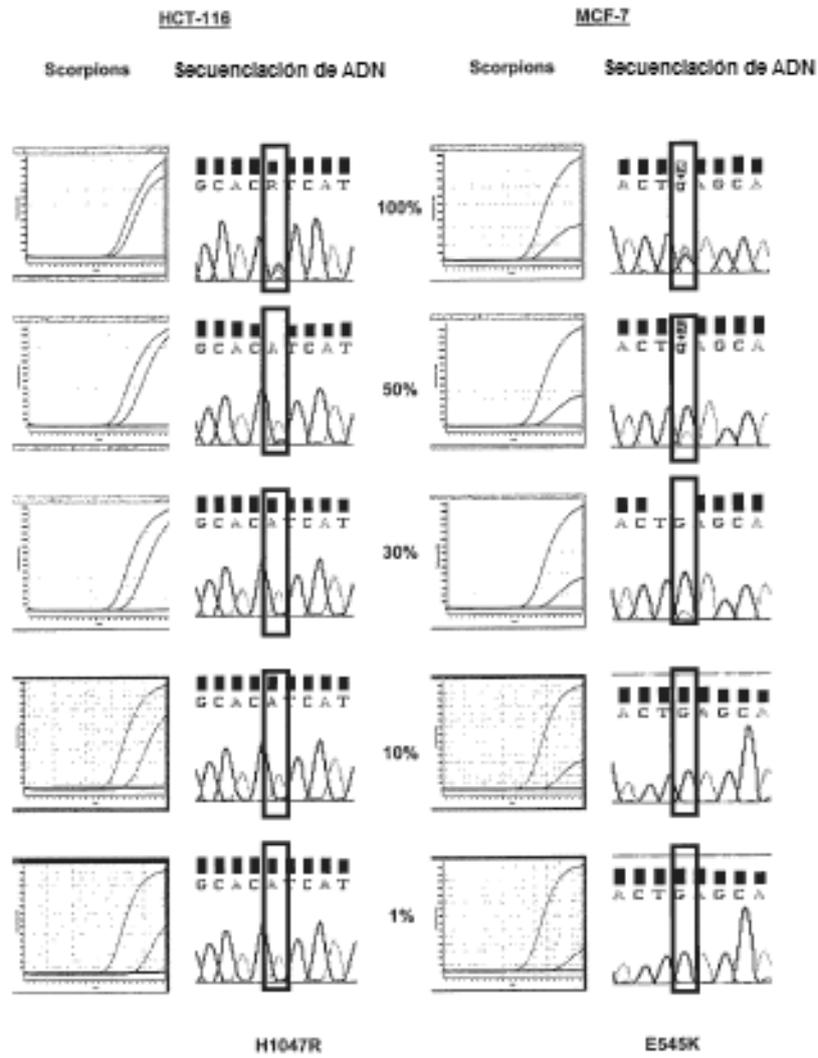


Figura 1