

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 563**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2011 PCT/US2011/058993**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12067828**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2011 E 11841491 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 2640856**

54 Título: **Ensayo de detección de mutación**

30 Prioridad:

15.11.2010 US 946752

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

06.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ZOU, HONGZHI;
LIDGARD, GRAHAM, P.;
DOMANICO, MICHAEL, J. y
ALLAWI, HATIM**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 622 563 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 detección de mutación

Antecedentes

5 Varias mutaciones puntuales en el genoma humano tienen una asociación directa con una enfermedad. Por ejemplo, se ha encontrado que varias mutaciones de KRAS de línea germinal 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.: 294-6). Del mismo modo, se encuentran gran cantidad de mutaciones somáticas de KRAS 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 cáncer de pulmón (Tam et al., Clin. Cancer Res. 2006, 12: 1647-53). Muchas mutaciones puntuales en el genoma
10 humano no tienen asociación causal evidente con una enfermedad.

Pueden utilizarse métodos para la detección de mutaciones puntuales, por ejemplo, para proporcionar un diagnóstico para enfermedades que están asociadas con las mutaciones puntuales.

Compendio

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

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una mezcla de reacción como se especifica en la reivindicación 13.

También se describe un kit para la realización del método.

En una realización, el locus genómico es el gen BRAF.

20 Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra esquemáticamente algunos de los principios generales de un método de detección cuantitativa de una estructura de ADN solapado (o ADN flap) denominado aquí en lo sucesivo "ensayo flap".

La figura 2 ilustra esquemáticamente una realización del método en cuestión.

25 Las figuras 3 a 7 proporcionan cada una datos que se describen con mayor detalle en la sección de ejemplos de esta solicitud.

Definiciones

El término "muestra" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un material o mezcla de materiales, típicamente, aunque no necesariamente, en forma líquida, que contiene uno o más analitos de interés.

30 Se entiende que el término "nucleótido" incluye aquellas porciones que contienen no sólo las bases púricas y pirimidínicas 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 las porciones que contienen marcadores de hapteno o fluorescentes y pueden contener no sólo azúcares convencionales de ribosa y desoxirribosa, sino también otros azúcares. Los nucleósidos o nucleótidos modificados también incluyen modificaciones en la porción de azúcar, por ejemplo, en
35 donde uno o más de los grupos hidroxilo están reemplazados por átomos de halógeno o grupos alifáticos, tienen funciones químicas tales como éteres, aminas, o similares.

El término "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente en el presente documento para describir un polímero de cualquier longitud, por ejemplo, superior a aproximadamente 2 bases, superior a aproximadamente 10 bases, superior a aproximadamente 100 bases, superior a aproximadamente 500 bases, superior a 1.000 bases, hasta aproximadamente 10.000 o más bases compuestas de nucleótidos, por ejemplo, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, y pueden producirse enzimática o sintéticamente (por ejemplo, PNA como se describe en la patente estadounidense No. 5.948.902 y las referencias citadas en la misma) que pueden hibridarse con ácidos nucleicos de origen natural de una forma específica de la secuencia análoga a la de dos ácidos nucleicos de origen natural, por ejemplo, pueden participar en interacciones de emparejamiento de bases de Watson-Crick. Los nucleótidos de
40 origen natural incluyen guanina, citosina, adenina y timina (G, C, A y T, respectivamente).

El término "muestra de ácido nucleico", tal como se utiliza en la presente memoria, indica una muestra que contiene ácido nucleico.

El término "polinucleótido objetivo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un polinucleótido de interés en estudio. En ciertas realizaciones, un polinucleótido objetivo contiene uno o más sitios objetivo que son de
50 interés en el estudio.

- 5 El término "oligonucleótido", tal como se utiliza en la presente memoria, indica un multímero de una sola cadena de nucleótidos de aproximadamente 2 a 200 nucleótidos. Los oligonucleótidos pueden ser sintéticos o pueden elaborarse enzimáticamente y, en algunas realizaciones, tienen una longitud de 10 a 50 nucleótidos. Los oligonucleótidos pueden contener monómeros de ribonucleótidos (es decir, pueden ser oligorribonucleótidos) o monómeros de desoxirribonucleótidos. Un oligonucleótido puede ser por ejemplo de 10 a 20, 11 a 30, 31 a 40, 41 a 50, 51 a 60, 61 a 70, 71 a 80, 80 a 100, 100 a 150 o 150 a 200 nucleótidos de longitud.
- 10 El término "dúplex", o "bicatenario", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, describe dos polinucleótidos complementarios que tienen las bases emparejadas, es decir, hibridados entre sí.
- 15 El término "cebador" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región de un polinucleótido diana. Un cebador se une a la región complementaria y se extiende, utilizando el ácido nucleico diana como plantilla, en condiciones de extensión del cebador. Un cebador puede estar en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos, aunque pueden utilizarse cebadores fuera de esta longitud. Un cebador puede extenderse desde su extremo 3' por la acción de una polimerasa. Un oligonucleótido que no puede extenderse desde su extremo 3' por la acción de una polimerasa no es un cebador.
- 20 El término "que se extiende", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier adición de uno o más nucleótidos al extremo de un ácido nucleico, por ejemplo, por ligación de un oligonucleótido o utilizando una polimerasa.
- El término "amplificación", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la generación de una o más copias de un ácido nucleico diana, utilizando el ácido nucleico diana como plantilla.
- El término "desnaturalización", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la separación de un dúplex de ácido nucleico en dos cadenas individuales.
- 25 Los términos "determinar", "medir", "evaluar", "estimar", "ensayar", "detectar" y "analizar" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a cualquier forma de medición e incluyen determinar si un elemento está presente o no. Estos términos incluyen determinaciones cuantitativas y/o cualitativas. La estimación puede ser relativa o absoluta. "Estimar la presencia de" incluye determinar la cantidad de algo presente, así como determinar si está presente o ausente.
- El término "uso" tiene su significado convencional, y, como tal, significa emplear, por ejemplo, poner en servicio, un método o composición para alcanzar un fin.
- 30 Tal como se usa en la presente memoria, el término " T_m " se refiere a la temperatura de fusión de un dúplex de oligonucleótidos en el que la mitad de los dúplex permanecen hibridados y la mitad de los dúplex se disocia en cadenas individuales. El T_m de un dúplex de oligonucleótidos puede determinarse o predecirse experimentalmente utilizando la siguiente fórmula $T_m = 81,5 + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41 (\text{fracción G + C}) - (60/\text{N})$, en donde N es la longitud de la cadena y $[\text{Na}^+]$ es inferior a 1 M. Véase Sambrook y Russell (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, capítulo 10). Existen otras fórmulas para predecir la T_m de los dúplex de oligonucleótidos existentes y una fórmula puede ser más o menos apropiada para una condición dada o conjunto de condiciones.
- 35 Tal como se usa en la presente memoria, el término "con T_m pareja" se refiere a una pluralidad de dúplex de ácido nucleico que tienen T_m parejas que están dentro de un intervalo definido, por ejemplo, que se diferencian 5°C o 10°C.
- 40 Tal como se usa en la presente memoria, el término "mezcla de reacción" se refiere a una mezcla de reactivos que son capaces de reaccionar juntos 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 escisión de una secuencia flap, por ejemplo, cuyas recetas son conocidas independientemente en la técnica.
- 45 El término "mezcla", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una combinación de elementos, que están entremezclados y no en un orden particular. Una mezcla es heterogénea y no espacialmente separable en sus diferentes constituyentes. Ejemplos de mezclas de elementos incluyen una serie de elementos diferentes que se disuelven en la misma solución acuosa, o una serie de elementos diferentes unidos a un soporte sólido al azar o en ningún orden particular en donde los diferentes elementos no sean espacialmente distintos. Una mezcla no es direccionable. Por ejemplo, a manera de ilustración, una matriz de polinucleótidos espacialmente separados enlazados a una superficie, como se conoce comúnmente en la técnica, no es una mezcla de polinucleótidos unidos a una superficie porque las especies de polinucleótidos unidos a una superficie son espacialmente distintos y la matriz es direccionable.
- 50 Tal como se usa en la presente memoria, el término "reactivos de PCR" se refiere a todos los reactivos que se requieren para llevar a cabo una reacción en cadena de polimerasa (PCR) sobre un molde. Como se conoce en la técnica, los reactivos de PCR incluyen esencialmente un primer cebador, un segundo cebador, una polimerasa
- 55

termoestable y nucleótidos. Dependiendo de la polimerasa utilizada, también pueden estar presentes iones (por ejemplo, Mg^{2+}). Los reactivos de PCR pueden contener opcionalmente un molde a partir del cual se puede amplificar una secuencia objetivo.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ensayo flap" se refiere a un ensayo en el que un oligonucleótido flap se escinde de una manera dependiente de solapamiento mediante una endonucleasa flap para liberar una secuencia flap que se detecta a continuación. Los principios de los ensayos flap son bien conocidos y descritos, 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). Por razones de claridad, se describen a continuación algunos reactivos que se emplean en un ensayo flap. Los principios de un ensayo flap se ilustran en la Fig. 1. En el ensayo flap mostrado en la Fig. 1, un oligonucleótido 2 invasivo y un oligonucleótido 4 flap se hibridan a 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 la endonucleasa flap. La endonucleasa 12 flap escinde el oligonucleótido 4 flap para liberar una secuencia flap 14 que se hibrida con el casete 16 de FRET que contiene un inactivador "Q" y un fluoróforo cercano inactivado "R" que se inactiva por el inactivador Q. La hibridación de la secuencia flap 14 con el casete 16 de FRET da como resultado un segundo complejo 18 que contiene una superposición de nucleótidos en la posición 20. El segundo complejo es también un sustrato para la endonucleasa flap. La escisión del casete 16 de FRET por la endonucleasa 12 flap da como resultado la liberación del fluoróforo 22, que produce una señal fluorescente. Estos componentes se describen con más detalle a continuación.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "oligonucleótido invasivo" se refiere a un oligonucleótido que es complementario a una región en un ácido nucleico objetivo. El nucleótido terminal 3' del oligonucleótido invasivo puede o no emparejar las bases de un nucleótido en el objetivo (por ejemplo, que puede ser el sitio de un SNP o una mutación, por ejemplo).

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "oligonucleótido flap" 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 sobre el oligonucleótido invasivo y el oligonucleótido flap se superponen por un único nucleótido de manera que, cuando se hibridan con el ácido nucleico diana, las secuencias complementarias se superponen. Como es sabido, si: a) el nucleótido terminal 3' del nucleótido invasivo y b) el nucleótido que se superpone con ese nucleótido en el oligonucleótido flap ambos emparejan sus bases con un nucleótido en el ácido nucleico diana, entonces se forma una estructura particular. Esta estructura es un sustrato para una enzima, definida a continuación como una endonucleasa flap, que escinde el colgajo de la región complementaria diana del oligonucleótido flap. Si el nucleótido terminal 3' del oligonucleótido invasivo no empareja sus bases con un nucleótido en el ácido nucleico diana, o si el nucleótido de superposición en el oligonucleótido flap no empareja sus bases con un nucleótido en el ácido nucleico diana, el complejo no es un sustrato para la enzima y hay poca o ninguna escisión.

35 El término "endonucleasa flap" o "FEN" para abreviar, como se usa en la presente memoria, se refiere a una clase de enzimas nucleolíticas que actúan como endonucleasas de estructura específica sobre estructuras de ADN con un dúplex que contiene un saliente o flap 5' de una sola hebra, en una de las cadenas que es desplazada por otra cadena de ácido nucleico, es decir, de tal manera que se superponen nucleótidos en la unión entre el ADN de una sola hebra y de dos cadenas. Las FEN catalizan la escisión hidrolítica del enlace fosfodiéster en la unión de ADN mono- y bicatenario, liberando el saliente, o el flap. Las endonucleasas flap son revisadas 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 ser enzimas individuales, enzimas de múltiples subunidades, o pueden existir como una actividad de otro complejo de enzima o de proteína, por ejemplo, una ADN polimerasa. Una endonucleasa flap puede ser termoestable.

45 Tal como se usa en la presente memoria, el término "flap escindido" se refiere a un oligonucleótido monocatenario que es un producto de escisión de un ensayo flap.

50 Tal como se usa en la presente memoria, el término "casete de FRET" se refiere a un oligonucleótido de horquilla que contiene una porción fluoróforo y una porción inactivadora cercana que inactiva el fluoróforo. La hibridación de un flap escindido con un casete de FRET produce un sustrato secundario para la endonucleasa flap. Una vez que se forma este sustrato, la base que contiene el fluoróforo 5' se escinde del casete, generando de este modo una señal de fluorescencia.

55 Como se usa en la presente memoria, el término "reactivos de ensayo flap" se refiere a todos los reactivos que se requieren para realizar un ensayo flap sobre un sustrato. Como se conoce en la técnica, los ensayos flap incluyen un oligonucleótido invasivo, un oligonucleótido flap, una endonucleasa flap y un casete de FRET, como se describió anteriormente. Los reactivos de ensayo flap pueden contener opcionalmente un diana al que se unen el oligonucleótido invasivo y el oligonucleótido flap.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "locus genómico" se refiere a una región definida en un genoma. Un locus genómico existe en la misma ubicación en los genomas de diferentes células del mismo individuo, o en individuos diferentes. Un locus genómico en una célula o individuo puede tener una secuencia de nucleótidos que es idéntica o muy similar (es decir, más de un 99% idéntica) al mismo locus genómico en una célula o individuo

diferente. La diferencia en la secuencia de nucleótidos entre el mismo locus en diferentes células o individuos puede deberse a una o más sustituciones de nucleótidos. Un SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) es un tipo de mutación puntual que se produce en el mismo locus genómico entre diferentes individuos en una población. Las mutaciones puntuales pueden ser somáticas cuando se presentan entre diferentes células en el mismo individuo.

5 Una mutación del locus genómico se puede definir por las coordenadas genómicas, por el nombre, o usando un símbolo.

Como se usa en la presente memoria, un "sitio de mutación" se refiere a la posición de una sustitución de nucleótido en un locus genómico. A menos que se indique otra cosa, el sitio de una mutación en un ácido nucleico puede tener un alelo mutante o un alelo de tipo silvestre de una mutación. El sitio de una mutación puede definirse por

10 coordenadas genómicas, o coordenadas con respecto al codón de inicio de un gen (por ejemplo, en el caso de la "mutación G35T de KRAS").

Como se usa en la presente memoria, el término "mutación puntual" se refiere a la identidad del nucleótido presente en un sitio de una mutación en la copia del mutante de un locus genómico. El nucleótido puede estar en cualquier cadena de una molécula de ADN de doble cadena.

15 Como se utiliza en la presente memoria, el término "tipo silvestre", con referencia a un locus genómico, se refiere a los alelos de un locus que contiene una secuencia de tipo silvestre. En el caso del locus que contiene un SNP, la secuencia de tipo silvestre puede contener el alelo predominante del SNP.

Como se usa en la presente memoria, el término "mutante", con referencia a un locus genómico, se refiere a los alelos de un locus que contienen una secuencia mutante. En el caso de un locus que contiene un SNP, la secuencia mutante puede contener un alelo menor del SNP. El alelo mutante de un locus genómico puede contener una sustitución de nucleótidos que no es silenciosa en el sentido de que o bien altera la expresión de una proteína o cambia la secuencia de aminoácidos de una proteína, lo que provoca un cambio fenotípico (por ejemplo, un fenotipo relacionado con cáncer) en las células que son heterocigotas o homocigotas para la secuencia mutante con respecto a las células que contienen la secuencia de tipo silvestre. Alternativamente, el alelo mutante de un locus genómico

20 puede contener una sustitución de nucleótidos que es silenciosa.

Como se usa en la presente memoria, el término "corresponde a" y sus equivalentes gramaticales en el contexto de, por ejemplo, un nucleótido en un oligonucleótido que corresponde a un sitio de una mutación, tiene la intención de identificar al nucleótido que está posicionado en forma correspondiente con respecto a (es decir, posicionado a través de) un sitio de una mutación cuando dos ácidos nucleicos (por ejemplo, un oligonucleótido y un ADN genómico que contiene la mutación) se hibridan. De nuevo, a menos que se indique lo contrario (por ejemplo, en el caso de un nucleótido que "no empareja las bases" o "empareja las bases" con una mutación puntual) un nucleótido que corresponde a un sitio de una mutación puede emparejar las bases ya sea con el mutante o con el alelo de tipo silvestre de una secuencia.

25

Una muestra que comprende "tanto copias de tipo silvestre de un locus genómico como copias de un mutante del locus genómico" y sus equivalentes gramaticales, se refiere a una muestra que contiene múltiples moléculas de ADN del mismo locus genómico, en donde la muestra contiene tanto copias de tipo silvestre del locus genómico (cuyas copias contienen el alelo de tipo silvestre del locus) como copias del mutante del mismo locus (cuyas copias contienen el alelo mutante del locus). En este contexto, el término "copias" no pretende significar que las secuencias se copiaron entre sí. En vez de eso, el término "copias" pretende indicar que las secuencias son del mismo locus en diferentes células o individuos.

30

Como se utiliza en la presente memoria, el término "secuencia de nucleótidos" se refiere a una secuencia contigua de nucleótidos en un ácido nucleico. Como sería fácilmente evidente, el número de nucleótidos en una secuencia de nucleótidos puede variar en gran medida. En realizaciones particulares, una secuencia de nucleótido (por ejemplo, de un oligonucleótido) puede ser de una longitud que sea suficiente para la hibridación con una secuencia complementaria de nucleótidos en otro ácido nucleico. En estas realizaciones, una secuencia de nucleótidos puede estar en el intervalo de al menos 10 a 50 nucleótidos, por ejemplo, de 12 a 20 nucleótidos de longitud, aunque pueden emplearse en muchas circunstancias longitudes por fuera de estos intervalos.

35

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "totalmente complementario a" en el contexto de un primer ácido nucleico que es totalmente complementario a un segundo ácido nucleico se refiere a un caso en el que cada nucleótido de una secuencia contigua de nucleótidos en un primer ácido nucleico empareja sus bases con un nucleótido complementario en un segundo ácido nucleico. Como se describirá más adelante, un ácido nucleico puede ser totalmente complementario a otra secuencia "con la excepción de una falta de correspondencia de una sola base", significa que las secuencias, o bien, son totalmente complementarias con la excepción de una falta de correspondencia con una sola base (es decir, un único nucleótido que empareja sus bases con el correspondiente nucleótido en el otro ácido nucleico).

40

Como se utiliza en la presente memoria, el término un "par de cebadores" se usa para referirse a dos cebadores que se pueden emplear en una reacción en cadena de polimerasa para amplificar un locus genómico. Un par de cebadores puede en ciertas circunstancias referirse a que contiene "un primer cebador" y "un segundo

45

cebador" o "un cebador directo" y "un cebador inverso". El uso de cualquiera de estos términos es arbitrario y no pretende indicar si un cebador hibrida con una cadena superior o con una cadena inferior de un ácido nucleico de doble cadena.

5 Los nucleótidos de un oligonucleótido pueden designarse por su posición con relación al nucleótido terminal 3' de un oligonucleótido. Por ejemplo, el nucleótido inmediatamente 5' al nucleótido terminal 3' de un oligonucleótido está en la posición
"-1", el nucleótido inmediatamente 5' al nucleótido en la posición -1 es el nucleótido "-2", y así sucesivamente. Los nucleótidos que están "dentro de 6 bases" de un nucleótido terminal 3' están en las posiciones -1, -2, -3, -4, -5 y -6 respecto al nucleótido terminal 3'.

10 Descripción de ejemplos de realizaciones

15 Antes de describir la presente invención con mayor detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que, por supuesto, pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones anexas.

20 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta el décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de dicho intervalo y cualquier otro indicado o el valor intermedio en ese intervalo indicado, está comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños 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 ambos los límites, los intervalos que excluyen uno o ambos límites incluidos también se incluyen en la invención.

25 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica al que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar también métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, en la práctica o prueba de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos.

30 La cita de cualquier publicación es para su descripción antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anticipar tal publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas reales de publicación que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

35 Debe tenerse en cuenta que tal como se usa en la presente memoria, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referencias al plural al menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se observa además que las realizaciones de la descripción pueden ser redactadas para excluir cualquier elemento opcional. Por lo tanto, esta declaración pretende servir como antecedente base para uso de tal terminología exclusiva como "solamente", "únicamente" y similares en relación con lo mencionado en los elementos de la descripción, o el uso de una limitación "negativa".

40 Como será evidente para los expertos en la técnica tras la lectura de esta descripción, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en la presente memoria tiene componentes y características discretas que pueden ser fácilmente separadas de o combinadas con las características de cualquiera de las otras diferentes realizaciones. Cualquier método mencionado puede ser llevado a cabo en el orden de los eventos mencionados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

45 En la siguiente descripción, el experto en la técnica comprenderá que cualquiera entre una cantidad de polimerasas y endonucleasas flap se podrían usar en los métodos, incluyendo sin limitación, los aislados de organismos procariontes, eucariotes o arqueas termoestables o hipertermoestables. El experto en la técnica comprenderá también que las enzimas que se usan en el método, por ejemplo, polimerasa y endonucleasa flap, incluyen no sólo enzimas naturales, sino también enzimas recombinantes que incluyen fragmentos enzimáticamente activos, productos de escisión, mutantes y variantes de enzimas de tipo silvestre.

En la descripción adicional del método, se describirá primero la mezcla de reactivos utilizados en el método, seguido por una descripción de las condiciones de reacción que pueden usarse en el método.

50 Mezcla de reacción

55 La mezcla de reacción utilizada en el método generalmente contiene: a) reactivos de amplificación que son suficientes para amplificar un locus genómico diana de una muestra de ácido nucleico, en donde uno de los cebadores utilizados para la amplificación comprende un nucleótido terminal 3' que empareja sus bases con una mutación puntual en el locus genómico y también comprende una secuencia de nucleótidos que es totalmente complementaria a una secuencia en el locus con la excepción de una falta de correspondencia de una sola base dentro de 6 bases del nucleótido terminal 3'; b) reactivos de ensayos flap que comprenden una endonucleasa flap y

un casete de FRET; c) la muestra de ácido nucleico. La mezcla de reacción se caracteriza porque puede amplificar y detectar la presencia de copias mutantes de un locus genómico en un ambiente de copias de tipo silvestre del locus en la muestra.

5 Específicamente, la mezcla de reacción utilizada en el método puede contener: a) reactivos de amplificación que comprenden una polimerasa termoestable, nucleótidos (por ejemplo, dGTP, dATP, dTTP y dCTP), amortiguador de reacción (que incluye Mg^{2+}), un primer cebador y un segundo cebador para la amplificación de un locus genómico diana a partir de una muestra de ácido nucleico; en donde el primer cebador: i. comprende un nucleótido terminal 3' que empareja sus bases con una mutación puntual en el locus genómico; y ii. comprende una secuencia de nucleótidos que es totalmente complementaria a una secuencia en el locus con la excepción de una falta de correspondencia de una sola base dentro de 6 bases del nucleótido terminal 3'; b) reactivos de ensayos flap que comprende una endonucleasa flap, un casete de FRET y un oligonucleótido flap que comprende un nucleótido que empareja sus bases con dicha mutación puntual; y c) la muestra de ácido nucleico, en donde la muestra de ácido nucleico comprende tanto copias de tipo silvestre del locus genómico como copias mutantes del locus genómico que tienen una mutación puntual con respecto a las copias de tipo silvestre del locus genómico. La mezcla de reacción es
10
15 Caracterizado porque puede amplificar y detectar la presencia de dichas copias mutantes del locus genómico en la muestra.

En ciertas realizaciones, y como se describirá con mayor detalle más adelante, el primer cebador de los reactivos de amplificación puede emplearse como un cebador invasivo en los reactivos del ensayo flap. En otras realizaciones, sin embargo, la mezcla de reacción puede contener opcionalmente un oligonucleótido invasivo que es distinto del primer cebador que tiene un nucleótido terminal 3' que empareja sus bases con la mutación puntual. Por lo tanto, dependiendo de cómo se lleva a cabo el ensayo (es decir, dependiendo de si uno de los usa 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 distinto de los cebadores de PCR.
20

Las identidades y concentraciones exactas de los reactivos presentes en la mezcla de reacción pueden ser similares o iguales a aquellas empleadas independientemente en ensayos de PCR y de escisión del flap, con la excepción de que la mezcla de reacción contiene Mg^{2+} a una concentración que es más alta que la empleada en mezclas de reacción convencionales de PCR (que contienen Mg^{2+} a una concentración entre aproximadamente 1,8 mM y 3 mM). En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción descrita en la presente memoria contiene Mg^{2+} a una concentración en el intervalo de 4 mM a 10 mM, por ejemplo, 6 mM a 9 mM. Los ejemplos de tampones de reacción y ADN polimerasas que pueden emplearse en la mezcla de reacción diana incluyen aquellos 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, NY). Los tampones de reacción y las ADN polimerasas adecuadas para PCR pueden adquirirse a través de una variedad de proveedores, por ejemplo, Invitrogen (Carlsbad, CA), Qiagen (Valencia, CA) y Stratagene (La Jolla, CA). Los ejemplos de polimerasas incluyen *Taq*, *Pfu*, *Pwo*, *UITma* y *Vent*, aunque se pueden emplear muchas otras polimerasas en ciertas realizaciones. La guía para los componentes de reacción adecuados para uso con una polimerasa, así como las condiciones adecuadas para su uso se encuentran en la bibliografía suministrada con la polimerasa. El diseño del cebador se describe en una variedad de 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: 999-1.005). Los programas de software para diseño del cebador y la sonda también se encuentran comercialmente disponibles, incluyendo, sin limitación, Primer Detective (ClonTech, Palo Alto, CA), Lasergene, (DNASTAR, Inc., Madison, WI); y Software Oligo (National Biosciences, Inc., Plymouth, MN) e iOligo (Caesar Software, Portsmouth, NH).
25
30
35
40

Ejemplos de reactivos de ensayo de escisión flap se encuentran 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). Las condiciones apropiadas para las reacciones de endonucleasa flap son o bien ya conocidas o pueden determinarse fácilmente usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Kaiser et al., J. Biol. Chem. 274: 21387-94, 1999). Ejemplos de endonucleasas flap que pueden usarse en el método incluyen, sin limitación, ADN polimerasa I de *Thermus aquaticus*, ADN polimerasa I de *Thermus thermophilus*, FEN-1 de mamífero, FEN-1 de *Archaeoglobus fulgidus*, el FEN-1 de *Methanococcus jannaschii*, FEN-1 de *Pyrococcus furiosus*, FEN-1 de *Methanobacterium thermoautotrophicum*, FEN-1 de *Thermus Thermophilus* FEN-1 de CLEAVASE^{MR} (Third Wave, Inc., Madison, WI), RTH1 de *S. Cerevisiae*, RAD27 de *S. Cerevisiae*, Rad2 de *Schizosaccharomyces pombe*, exonucleasa 5'-3' del bacteriófago T5, FEN-1 de *Pyrococcus horikoshii*, exonucleasa 1 humana, exonucleasa 5'-3' de timo de ternera, incluyendo sus homólogos en eubacterias, eucariotas y archaeas, tales como miembros de la Familia clase II de enzimas específicas de la estructura, así como mutantes enzimáticamente activos o variantes de los mismos. Las descripciones de enzimas de escisión se pueden encontrar en, entre otros lugares, 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.
45
50
55
60

En realizaciones particulares, la mezcla de reacción puede contener reactivos para evaluar 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 que tienen flaps diferentes y múltiples casetes de FRET diferentes para detectar los diferentes flaps, una vez que se escinden. En una realización, los oligonucleótidos en una mezcla pueden tener flaps comunes, pero diferentes secuencias de unión para permitir, por ejemplo, un conjunto de mutaciones para escindir un casete de FRET común e informar una señal en la que un único fluoróforo es indicativo de la presencia de una mutación. En esta realización, cuya mutación está presente en la muestra, puede determinarse después de que se haya identificado la presencia de una mutación. Opcionalmente, la reacción puede contener múltiples oligonucleótidos invasivos, si uno de los cebadores de PCR no se utiliza como oligonucleótido invasivo. Tras la escisión de los casetes de FRET, pueden observarse múltiples señales fluorescentes distinguibles. El fluoróforo puede seleccionarse a partir, por ejemplo, de 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 y 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 podrían emplearse muchas otras. En ciertos casos, al menos uno de los pares de cebadores de PCR, oligonucleótidos flap y casetes de FRET puede ser para la detección de un control interno.

Como se ha indicado anteriormente, uno de los cebadores de PCR (arbitrariamente designado como el "primer" cebador), comprende un nucleótido terminal 3' que empareja sus bases con una mutación puntual (es decir, el alelo mutante) en el locus genómico y también comprende una secuencia de nucleótidos que es totalmente complementaria a una secuencia en el locus con la excepción de falta de correspondencia de una sola base dentro de 6 bases del nucleótido terminal 3' (por ejemplo, en la posición -1, la posición -2, la posición -3, la posición -4, la posición -5 o la posición -6, respecto al nucleótido terminal 3'). En otras palabras, además de tener un nucleótido terminal 3' que empareja sus bases solamente con el alelo mutante de la mutación en el locus genómico, el cebador también tiene una falta de correspondencia desestabilizadora cerca del extremo 3' que ni empareja las bases con el alelo mutante ni el alelo de tipo silvestre de la región genómica. Sin estar limitado a ninguna teoría en particular, se cree que la falta de correspondencia desestabilizadora, desestabiliza la hibridación del extremo 3' del primer cebador con la secuencia de tipo silvestre a una extensión mayor que la secuencia mutante, dando como resultado por lo tanto una amplificación preferencial de la secuencia mutante. Como se describirá con mayor detalle más adelante, la presencia del producto amplificado usando el primer y el segundo cebadores puede detectarse usando un ensayo flaps que emplea el primer cebador u otro oligonucleótido que tiene la mutación desestabilizadora y un nucleótido terminal que empareja las bases solamente con el alelo mutante en el locus genómico. El uso de dicha secuencia (es decir, una secuencia que contiene la mutación desestabilizadora y un nucleótido terminal que empareja las bases únicamente con el alelo mutante en el locus genómico) en la etapa de detección proporciona una discriminación adicional entre secuencias de tipo mutante y silvestre en los productos de amplificación. Sin estar ligado a ninguna teoría en particular, se cree que la discriminación entre tipo mutante y tipo silvestre se produce en gran parte en las primeras rondas de amplificación ya que la secuencia amplificada (es decir, el amplicón) proporciona una secuencia perfectamente complementaria para que los cebadores de la PCR se hibriden con ella. La secuencia de tipo silvestre no debe amplificarse, mientras que la secuencia mutante debe ser eficientemente amplificada.

La falta de correspondencia desestabilizadora puede hacerse sustituyendo un nucleótido que empareja las bases con la mutación puntual con otro nucleótido. El nucleótido que es sustituido en la secuencia puede ser otro nucleótido natural (por ejemplo, dG, dA, dT o dC), o, en ciertas circunstancias, un nucleótido modificado. En ciertas realizaciones, el extremo 3' del primer cebador puede contener más de 1, por ejemplo, 2 o 3, faltas de correspondencia. En realizaciones particulares, el tipo de falta de correspondencia usada (por ejemplo, si la falta de correspondencia es una falta de correspondencia de G:T o una falta de correspondencia de C:T, etc.), afecta la capacidad de un cebador para discriminar entre secuencias de tipo silvestre y mutantes. En términos generales, el orden de las estabildades (de la más estable a la menos estable) de varias faltas de correspondencia es el siguiente: G:T > G:G = A:G > T:G > G:A = T:T > T:C > A:C > C:T > A:A > C:A > C:C (como se describe en Gaffney y Jones (Biochemistry, 1989, 26: 5881-5889)), aunque los pares de bases que rodean la falta de correspondencia pueden afectar este orden en ciertas circunstancias (véase, por ejemplo, Ke et al. Nucleic Acids Res., 1993, 21: 5137-5143). La falta de correspondencia utilizada puede optimizarse experimentalmente para proporcionar la discriminación deseada.

Como sería evidente, los diversos oligonucleótidos utilizados en el método están diseñados de manera que no interfieran entre sí. Por ejemplo, en realizaciones particulares, el oligonucleótido flap puede estar cubierto en su extremo 3', impidiendo de este modo su extensión. Del mismo modo, en ciertas realizaciones, el oligonucleótido invasivo también puede estar tapado 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, entonces el oligonucleótido invasivo puede estar presente en una concentración que está en el 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 porción flap y las regiones complementarias diana del oligonucleótido flap pueden ser independientemente al menos 10°C menores (por ejemplo, 10-20°C menores) que las T_m de los cebadores de PCR, lo que da lugar a, a) menor hibridación del oligonucleótido flap con el ácido nucleico diana a temperaturas más altas (65°C a 75°C) y b) menor hibridación de cualquier colgajo escindido con el casete de FRET a temperaturas más altas (60°C a 75°C), permitiendo de este modo que el locus genómico sea amplificado por PCR a una temperatura a la cual el colgajo no

hibrida eficientemente.

En una reacción multiplex, los cebadores pueden estar diseñados para tener propiedades termodinámicas similares, por ejemplo, las T_m , contenido de G/C, estabilidad de horquilla similares, y en ciertas realizaciones pueden ser todas de una longitud similar, por ejemplo, de 18 a 30 nt, por ejemplo, de 20 a 25 nt de longitud. Los otros reactivos usados en la mezcla de reacción también pueden coincidir en T_m .

La mezcla de ensayo puede estar presente en un recipiente, incluyendo, sin limitación, un tubo; una placa de múltiples pozos, tal como una placa de 96 pozos, una placa de 384 pozos, una placa de 1.536 pozos; y un dispositivo de microfluidos. En ciertas realizaciones, se realizan múltiples reacciones de multiplex en el mismo recipiente de reacción. Dependiendo de cómo se lleve a cabo la reacción, la mezcla de reacción puede ser de un volumen de 5 μ l a 200 μ l, por ejemplo, de 10 μ l a 100 μ l, aunque se prevén volúmenes fuera de este intervalo.

En ciertas realizaciones, una mezcla de reacción diana puede contener además una muestra de ácido nucleico. En realizaciones particulares, la muestra puede contener ADN genómico o una versión amplificada del mismo (por ejemplo, ADN genómico amplificado usando los métodos de Lage et al., Genome Res. 2003, 13: 294-307 o la solicitud de patente estadounidense publicada No. 2004/0241658, por ejemplo). En ejemplos de realizaciones, la muestra genómica puede contener ADN genómico de una célula de mamífero, tal como una célula humana, de ratón, de rata o de mono. La muestra puede elaborarse a partir de células cultivadas o células de una muestra clínica, por ejemplo, una biopsia de tejido, de raspado o lavado o células de una muestra forense (es decir, células de una muestra recogida en una escena de crimen). En realizaciones particulares, la muestra genómica puede ser de una muestra fijada en parafina fijada en formalina (FFPE).

En realizaciones particulares, la muestra de ácido nucleico puede obtenerse a partir de una muestra biológica tal como células, tejidos, fluidos corporales y heces. Los fluidos corporales de interés incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, plasma, saliva, mucosa, flema, líquido cefalorraquídeo, fluido pleural, lágrimas, líquido del conducto lácteo, linfa, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina, líquido amniótico, y semen. En realizaciones particulares, se puede obtener una muestra de un sujeto, por ejemplo, un ser humano, y puede procesarse antes de su uso en el ensayo en cuestión. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede extraer de la muestra antes del uso, a través de métodos conocidos.

Por ejemplo, el ADN se puede extraer de las heces a partir de 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 las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.463.782, 7.005.266, 6.303.304 y 5.741.650. Los kits comerciales de extracción de ADN para la extracción de ADN de las heces incluyen el mini kit para heces QIAamp (QIAGEN, Hilden, Alemania), Instagene Matrix (BioRad, Hercules, CA) y el kit de aislamiento de ADN genómico RapidPrep Micro (Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ), entre otros.

Método de análisis de muestras

En la realización del método de interés, la mezcla de reacción descrita anteriormente puede ser sometida a una o más series de condiciones de termociclado. Los ejemplos de condiciones incluyen, por ejemplo, las descritos en Allawi et al. (J. Clin Microbiol., 2006, 44: 3443-3447). En una realización, la mezcla de reacción puede ser sometida a termociclado de PCR convencional (es decir, múltiples rondas de desnaturalización a una temperatura de más de 90°C, por ejemplo, aproximadamente a 95°C, hibridación a una temperatura de 65°C a 75°C y extensión a una temperatura de 65°C a 75°C) seguido de un período a temperatura elevada para desnaturalizar la polimerasa termoestable (por ejemplo, aproximadamente 99°C), y luego un período a una temperatura que está aproximadamente a 10°C por debajo de la temperatura de extensión durante la cual se detecta fluorescencia.

En otras realizaciones, la mezcla de reacción puede estar sometida a condiciones de ciclación en las que un aumento en la cantidad de producto amplificado (indicado por la cantidad de fluorescencia) se puede medir en tiempo real, donde el término "tiempo real" se refiere a una medición que se hace a medida que la reacción avanza y se acumulan los productos. La medición puede expresarse como un número absoluto de copias o una cantidad relativa cuando se normaliza a un ácido nucleico de control en la muestra. En una realización en tiempo real, la reacción puede someterse a las condiciones de termociclado descritas, por ejemplo, en Tadokoro (J. Vir. Methods 2009, 155: 182-186). En esta realización, la mezcla de reacción puede someterse a ciclos múltiples de cuatro etapas que incluyen una etapa de desnaturalización a una temperatura de más de 90°C, por ejemplo, aproximadamente a 95°C, hibridación a una temperatura en el intervalo de 61°C a 69°C, escisión flap a una temperatura de 50°C y extensión a una temperatura de 72°C. En esta realización, se puede controlar la fluorescencia en cada ciclo para proporcionar una medición en tiempo real de la cantidad de producto que se acumula en la mezcla de reacción.

En una realización alternativa, la mezcla de reacción puede someterse a las siguientes condiciones de termociclado: un primer conjunto de 5 a 15 ciclos (por ejemplo, 8 a 12) 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; seguido de: un segundo conjunto de 20-50 ciclos de: i. una cuarta temperatura de al menos 90°C; ii. una quinta temperatura que es al menos 10°C menor 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. No se necesita añadir reactivos adicionales a la mezcla de reacción durante el termociclado, por ejemplo, entre el primer y segundo conjuntos de ciclos. En realizaciones particulares, la polimerasa termoestable no se inactiva entre el primer y el segundo conjuntos de condiciones, permitiendo así que la diana sea amplificada durante cada ciclo del segundo conjunto de ciclos. En realizaciones particulares, la segunda y tercera temperaturas son las mismas temperaturas de tal modo que se realizan condiciones de termociclado de "dos etapas". Cada uno de los ciclos puede ser independientemente de una duración en el intervalo de 10 segundos a 3 minutos, aunque las duraciones fuera de este intervalo se emplean fácilmente. En cada ciclo del segundo conjunto de ciclos (por ejemplo, mientras la reacción está en la quinta temperatura), se puede medir una señal generada por escisión de la sonda flap para proporcionar una medición en tiempo real de la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra.

Algunos de los principios del objeto del método de análisis de muestras se ilustran esquemáticamente en la Fig. 2. Con referencia a la Fig. 2, el método incluye amplificar el producto 30 de la muestra 32 que comprende tanto copias de tipo silvestre de un locus genómico 34 como copias mutantes del locus genómico 36 que tienen una mutación puntual 38 con respecto a las copias de tipo silvestre del locus genómico 34 para producir una muestra amplificada. La amplificación se realiza usando un primer cebador 40 y un segundo cebador 42, en donde el primer cebador comprende un nucleótido terminal 3' 44 que empareja sus bases con la mutación puntual y también comprende una secuencia de nucleótidos que es totalmente complementaria a una secuencia en el locus con la excepción de una falta de correspondencia de una sola base 46 (es decir, una base que no es complementaria a la base correspondiente en el locus genómico diana) dentro de 6 bases del nucleótido terminal 3' 44. La presencia del producto 30 en la muestra amplificada se detecta usando un ensayo flap que emplea un oligonucleótido invasivo 48 que tiene un nucleótido terminal 3' que empareja las bases con la mutación puntual. Como se muestra en la Fig. 2, el primer cebador 40 se emplea como el oligonucleótido invasivo 48 en el ensayo flaps, aunque, en realizaciones alternativas, se puede usar un segundo oligonucleótido que es distinto del primer cebador. Como se ha descrito anteriormente y en la Fig. 1, el ensayo flap se basa en la escisión del complejo 32 que contiene un oligonucleótido 50 flap, un oligonucleótido 48 invasivo y un producto 30 por una endonucleasa flap (no mostrada) para liberar el colgajo 52. El colgajo 52 liberado se hibrida entonces con el casete de FRET 54 para formar un segundo complejo que es escindido por la endonucleasa flap para escindir el fluoróforo del complejo y generar la señal fluorescente 56 que puede medirse para indicar la cantidad de producto en la muestra amplificada.

La cantidad de producto en la muestra puede normalizarse con relación a la cantidad de un ácido nucleico de control presente en la muestra, determinando de este modo una cantidad relativa de las copias mutantes en la muestra. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de control puede ser un locus diferente al locus genómico y, en ciertos casos, puede ser detectado usando un ensayo flap que emplea un oligonucleótido invasivo que tiene un nucleótido terminal 3' que empareja las bases con las copias de tipo silvestre del locus genómico en el sitio de la mutación puntual, detectando así la presencia de copias de tipo silvestre del locus genómico en dicha muestra. El control se puede medir en paralelo con la medición del producto en la misma mezcla de reacción o una mezcla de reacción diferente. Si se mide el control en la misma mezcla de reacción, el ensayo flap puede incluir reactivos adicionales, particularmente un segundo oligonucleótido invasivo, una segunda sonda flap que tiene un segundo colgajo y un segundo casete de FRET que produce una señal que es distinguible del casete FRET usado para detectar la secuencia mutante. En realizaciones particulares, la mezcla de reacción puede comprender además reactivos de PCR y reactivos flap para amplificar y detectar un segundo locus genómico o para detectar una segunda mutación puntual en el mismo locus genómico.

En ciertos casos, la fluorescencia que indica la cantidad de flap escindido se puede detectar mediante un fluorómetro automatizado diseñado para realizar PCR en tiempo real que tiene las siguientes características: una fuente de luz para excitar el fluoróforo del casete de FRET, un sistema para calentar y enfriar las mezclas de reacción y un fluorómetro para medir la fluorescencia mediante el casete de FRET. Esta combinación de características, permite la medición en tiempo real del colgajo escindido, permitiendo así cuantificar la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra. Los fluorómetros automatizados para realizar reacciones PCR en tiempo real son conocidos en la técnica y pueden adaptarse para su uso en este ensayo específico, por ejemplo, el ICYCLER^{MR} de BioRad Laboratories (Hercules, California), el Mx3000P^{MR}, el MX3005P^{MR} y el MX4000^{MR} de Stratagene (La Jolla, CA), el ABI PRISM^{MR} 7300, 7500, 7700 y 7900 Taq Man (Applied Biosystems, Foster City, CA), el SMARTCYCLER^{MR}, ROTORGENE 2000^{MR} (Corbett Research, Sidney, Australia) y el sistema GENE XPERT^R (Cepheid, Sunnyvale, California) y el LIGHTCYCLER^{MR} (Roche Diagnostics Corp., Indianápolis, Indiana). La velocidad de la rampa entre las diferentes temperaturas de reacción no es crítica y, en ciertas realizaciones, pueden emplearse las velocidades de rampa por defecto que están preestablecidas en los termocicladores.

En ciertos casos, el método puede implicar además representar gráficamente la cantidad de escisión que se produce en los diferentes ciclos, proporcionando de este modo una estimación en tiempo real de la abundancia del ácido nucleico diana. La estimación puede calcularse determinando el ciclo de umbral (es decir, el ciclo en el que aumenta esta fluorescencia por encima de un umbral predeterminado; el valor "Ct" o el valor "Cp"). Esta estimación se puede comparar con un control (el cual puede ser ensayado en la misma mezcla de reacción que el locus genómico de interés) para proporcionar una estimación normalizada. El termociclador también puede contener una aplicación de software para determinar el ciclo de umbral para cada una de las muestras. Un ejemplo de un método para determinar el ciclo de umbral se expone, por ejemplo, en Luu-The et al. (Biotechniques, 2005, 38: 287-293).

También se proporciona un dispositivo para realizar el análisis de las muestras. En ciertas realizaciones, el dispositivo comprende: a) un termociclador programado para llevar a cabo el método descrito anteriormente y b) un recipiente que comprende la mezcla de reacción descrita anteriormente.

Utilidad

- 5 El método descrito encuentra uso en una variedad de aplicaciones, donde tales aplicaciones generalmente incluyen aplicaciones de análisis de muestras en las que se detecta la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra dada.

10 En particular, los métodos descritos anteriormente se pueden emplear para diagnosticar, predecir una respuesta al tratamiento, o para investigar un estado canceroso u otra enfermedad de un mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, leucemia, carcinoma de mama, cáncer de próstata, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, epilepsia, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, accidente cerebrovascular, autismo, retraso mental y trastornos del desarrollo. Muchos polimorfismos de nucleótidos están asociados con y se cree que son un factor en la producción de estos trastornos. Conocer el tipo y la ubicación del polimorfismo del nucleótido puede ayudar en gran medida al diagnóstico, pronóstico y comprensión de diversas enfermedades de mamíferos. Además, las condiciones de ensayo descritas en este documento pueden emplearse en otras aplicaciones de detección de ácidos nucleicos incluyendo, por ejemplo, la detección de enfermedades infecciosas, el control de la carga viral, la genotipificación viral, comprobaciones medioambientales, comprobaciones de alimentos, medicina forense, epidemiología y otras áreas donde se usa la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos.

20 En algunas realizaciones, se puede obtener una muestra biológica de un paciente y se puede analizar la muestra utilizando el método de la invención. En realizaciones particulares, puede emplearse el método para identificar y/o estimar la cantidad de copias mutantes de un locus genómico que están 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 relativa 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.

25 En estas realizaciones, puede emplearse el método para detectar una mutación oncogénica (que puede ser una mutación somática), por ejemplo, en PIK3CA, NRAS, KRAS, JAK2, HRAS, FGFR3, FGFR1, EGFR, CDK4, BRAF, RET, PGDFRA, KIT o ERBB2, cuya mutación puede estar asociada con cáncer de mama, melanoma, cáncer renal, cáncer endometrial, cáncer ovárico, cáncer pancreático, 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).

35 En estas realizaciones, la mezcla de reacción puede contener un primer cebador y un segundo cebador en el que el primer cebador comprende un nucleótido terminal 3' que empareja las bases con la mutación puntual. El primer cebador puede emplearse como el oligonucleótido invasivo en el segundo conjunto de ciclos o, en ciertos casos, puede ser un oligonucleótido invasivo separado presente en la mezcla de reacción que también tiene un nucleótido terminal 3' que empareja las bases con la mutación puntual. Dado que la mutación puntual en el locus genómico puede tener una asociación directa con el cáncer, por ejemplo, cáncer colorrectal, el método de la presente invención se puede emplear para diagnosticar pacientes con cáncer, o una condición precancerosa (por ejemplo, adenoma, etc.), solo, o en combinación con otras técnicas clínicas (por ejemplo, un examen físico, tal como, una colonoscopia) o técnicas moleculares (por ejemplo, un análisis inmunohistoquímico). Por ejemplo, los resultados obtenidos a partir del ensayo en cuestión pueden combinarse con otra información, por ejemplo, información relativa al estado de metilación de otros loci, información relativa a reordenamientos o sustituciones en el mismo locus o en un locus diferente, información citogenética, información sobre reordenamientos, información sobre expresión génica o información sobre la longitud de los telómeros, para proporcionar un diagnóstico general del cáncer u otras enfermedades.

40 En una realización, se puede recoger una muestra de un paciente en un primer lugar, por ejemplo, en un entorno clínico tal como en un hospital o en el consultorio de un médico, y la muestra puede reenviarse a un segundo lugar, por ejemplo, un laboratorio donde se procesa y se realiza el método arriba descrito para generar un informe. Un "informe" tal como se describe aquí, es un documento electrónico o tangible que incluye elementos del informe que proporcionan resultados de la prueba que pueden incluir un valor de 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 lugar que la primera ubicación), donde puede ser interpretado por un profesional de la salud (por ejemplo, un clínico, un técnico de laboratorio o un médico tal como un oncólogo, cirujano, patólogo), como parte de un diagnóstico clínico.

Kits

También se proporcionan kits para practicar el método en cuestión, como se ha descrito anteriormente. Los componentes del kit pueden estar presentes en contenedores separados, o pueden estar presentes múltiples

componentes en un solo contenedor. En realizaciones particulares, un kit puede comprender: a) reactivos PCR que incluyen un primer cebador y un segundo cebador, en donde el primer cebador comprende un nucleótido terminal 3' que empareja sus bases con una mutación puntual en un locus genómico y también comprende una secuencia de nucleótidos que es totalmente complementaria a una secuencia en el locus genómico con la excepción de una falta de correspondencia de una sola base dentro de 6 bases del nucleótido terminal 3'; y b) reactivos del ensayo flap que incluyen un oligonucleótido invasivo que tiene un nucleótido terminal 3' que empareja sus bases con la mutación puntual. Las particularidades de estos reactivos se describen más arriba. El kit comprende además reactivos flap y PCR para amplificación y detección de un ácido nucleico de control.

Además de los componentes mencionados anteriormente, el kit puede incluir además instrucciones para usar los componentes del kit para practicar los métodos en cuestión. Las instrucciones para practicar los métodos en cuestión se graban generalmente en un medio de grabación adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden imprimirse en un sustrato, tal como papel o plástico, etc. Por lo tanto, las instrucciones pueden estar presentes en los kits como un inserto en el empaque, en la marcación del contenedor del kit o sus componentes (es decir, asociado con el empaque o empaques secundarios dentro del empaque principal), etc. En otras realizaciones, las instrucciones pueden estar presentes como un archivo de datos de almacenamiento electrónico presente en un medio de almacenamiento legible para un ordenador adecuado, por ejemplo, CD-ROM, disquete, etc. En otros kits, las instrucciones concretas no están presentes en el kit, sino en medios para obtener las instrucciones de una fuente remota, por ejemplo, a través de Internet. Un ejemplo de esta realización es un kit que incluye una dirección web donde se pueden ver las instrucciones y/o desde donde se pueden descargar las instrucciones. Como con las instrucciones, este medio para obtenerlas se graba sobre un sustrato adecuado. Además de las instrucciones, los kits también pueden incluir una o más muestras de control, por ejemplo, analitos de controles positivos o negativos para usar en la prueba del kit.

Ejemplo 1

Ensayo de G35A de KRAS

El ensayo descrito a continuación está diseñado para detectar secuencias de ácido nucleico que contienen la mutación G35A de KRAS en un medio de secuencias de tipo silvestre. Como referencia, se muestran a continuación secuencias parciales de nucleótidos para los alelos mutantes de tipo silvestre y G35A de KRAS.

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

CATTATTTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCA
AGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGA (SEQ ID NO: 1)

Secuencia parcial de la región de amplificación para KRAS, mutante G35A (posición 35 subrayada):

CATTATTTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGATGGCGTAGGCAA
GAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGA (SEQ ID NO: 2)

En este experimento, toda la carga de especificidad para la detección y discriminación de la mutación G35A descansaba sobre la sonda flap. Las regiones de unión del cebador directo e inverso estaban fuera de la mutación en la posición 35. El oligonucleótido invasivo no era la misma secuencia de cualquiera de los cebadores. Los cebadores para la amplificación de esta región fueron 5'-AGGCCTGCTGAAAATGACTG-3' (SEQ ID NO: 3) y 5'-TTGTTGGATCATATTCGTCCAC-3' (SEQ ID NO: 4).

La detección homogénea de la mutación G35A de KRAS se realizó mediante el uso de una sonda flap escindible por la endonucleasa, una sonda de oligonucleótido invasivo, un casete de FRET escindible y una endonucleasa flap estable al calor. Para la detección de la mutación G35A, la secuencia de la sonda flap era 5'-CGCCGAGGATGGCGTAGGCA-3'/3C6/ (SEQ ID NO: 5), donde la base mutante se muestra subrayada y el extremo 3' se bloquea con un grupo hexanodiol con el fin de inhibir la extensión del cebador. La porción flap escindida, que posteriormente se une al casete de FRET y, a su vez, libera el fluoróforo de su inactivador, incluye todas las bases desde el extremo 5' hasta la A específica de la mutación. El oligonucleótido invasivo utilizado en este ejemplo era 5'-TGTGGTAGTTGGAGCTGg-3' (SEQ ID NO: 6), donde la g de 3' no es específica para la G35A. Los cebadores, oligos invasivos y sondas flap se suministraron como elementos no catalogados por Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, Iowa).

El casete de FRET utilizado fue /Red/TCT/Inactivador/TCGGCCTTTTGGCCGAGAGACCTCGGCGCG/3C6/ (SEQ ID NO: 7), donde Redmond Red es el colorante fluorescente, el inactivador es el inactivador Eclipse® Dark y el extremo 3' se bloquea con un grupo hexanodiol con el fin de inhibir la extensión del cebador. El casete de FRET fue suministrado por Hologic (Madison, Wisconsin). Este casete de FRET se puede denominar como un casete de FRET Arm 1 Red).

El posicionamiento relativo de los cebadores, de la sonda invasiva y de la región de unión de la sonda flap puede observarse como regiones subrayadas en la secuencia siguiente, con la región de unión de la sonda flap mostrada en cursiva:

CATTATTTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGT

TGGAGCTGATGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCC
AACAATAGA (SEQ ID NO: 8)

5 Las condiciones de ciclación fueron 95°C durante 2 min; 50 ciclos a 95°C durante 20 segundos, 50°C durante 1 min y 70°C durante 30 segundos, a 40°C para mantener. La adquisición de la señal fluorescente se realizó en el punto de 50°C del ciclo. Las reacciones PCR se realizaron en placas LightCycler® 480 Multiwell 96 (Roche, Indianápolis) en MOPS 10 mM pH 7,5, con MgCl₂ 7,5 mM y dNTP 250 μM (Promega, Madison, Wisconsin). La Taq polimerasa fue la enzima iTaq (BioRad, Hercules, California) y la enzima de escisión fue Cleavase 2.0 (Hologic, Madison, Wisconsin). La concentración de cebador directo fue de 500 nM, la concentración de cebador inverso fue de 500 nM, la sonda flap fue de 500 nM, la sonda de oligo invasiva fue de 70 nM y el casete de FRET se usó a una concentración final de 200 nM. Se realizó toda la amplificación y detección en el termociclador óptico LightCycler 480 (Roche, Indianápolis, Indiana).

15 Se usaron plásmidos que contenían fragmentos del gen KRAS, ya sea el tipo silvestre o el mutante, para evaluar la capacidad del sistema experimental para detectar copias mutantes 35A de KRAS introducidas en copias de tipo silvestre en 4 niveles diferentes del mutante, incluyendo 10⁴ copias mutantes en 10⁵ copias de tipo silvestre (1:10), 10³ copias mutantes en 10⁵ copias de tipo silvestre (1:100), 10² copias mutantes en 10⁵ copias de tipo silvestre (1:1.000) y 10 copias mutantes en 10⁵ copias de tipo silvestre (1:10.000).

20 En la Figura 3 se presentan los datos que muestran las curvas de amplificación cinética y el "punto de cruce" (Cp; Roche LightCycler 480 Manual, Indianápolis, IN) de las diferentes relaciones de mutante a tipo silvestre en las muestras de amplificación. En estos ensayos el Cp se calcula como el punto en el que la fluorescencia se elevó hasta el 18% de la fluorescencia máxima. El diseño de cebadores, sonda invasiva y sonda flap usados en este ejemplo no fueron capaces de detectar la mutación G35A cuando había más de 100 veces más tipo silvestre que las formas mutantes del gen.

Ejemplo 2

25 Ensayo de G35A de KRAS

Como en el Ejemplo 1, este ensayo se diseñó para detectar la mutación G35A en presencia de diversos niveles de la secuencia de tipo silvestre. La secuencia mutante y de tipo silvestre son como se describe en el Ejemplo 1 (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2). En este ensayo, el cebador directo sirvió también para funcionar como el oligonucleótido invasivo. Los 3' del cebador directo y la posición de giro en la sonda flap contienen ambos la base A de tipo mutante.

30 Los cebadores utilizados fueron 5'-TTGTGGTAGTTGGAGCTGA-3' (SEQ ID NO: 9), donde la base 3' subrayada corresponde a la mutación, y 5'-CTATTGTTGGATATATTCTCTC-3' (SEQ ID NO: 10). La sonda flap usada fue la misma que en el Ejemplo 1, 5'-CGCCGAGGATGGCGTAGGCA-3'/3C6/ (SEQ ID NO: 5), donde la base mutante se muestra subrayada y el extremo 3' se bloquea con un grupo hexanodiol con el fin de inhibir la extensión del cebador. Los cebadores y sondas flap se suministraron como artículos no catalogados por Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, Iowa).

El posicionamiento relativo de los cebadores, de la sonda invasiva y de la región de unión de la sonda flap pueden observarse como regiones subrayadas en la secuencia siguiente, con la región de unión de la sonda flap mostrada en cursiva:

40 CATTATTTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGATGGCGTAGGCAA
GAGTGCCTTGACGATACAGCTA ATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGA (SEQ ID NO: 11)

El casete de FRET utilizado fue

45 /Red/TCT/Inactivador/TCGGCCTTTTGGCCGAGAGACCTCGGCGCG/3C6/ (SEQ ID NO: 25) donde Redmond Red es el colorante fluorescente, el Inactivador es el Inactivador Eclipse® Dark y el extremo 3' se bloquea con un grupo hexanodiol con el fin de inhibir la extensión del cebador. El casete de FRET fue suministrado por Hologic (Madison, Wisconsin).

50 Las condiciones de ciclación fueron de 95°C durante 2 min; 50 ciclos a 95°C durante 20 segundos, 53°C durante 1 min y 70°C durante 30 s; y 40°C para mantener. La adquisición de la señal fluorescente se realizó en el punto de 53°C del ciclo. Las reacciones PCR se realizaron en placas LightCycler® 480 Multiwell 96 (Roche, Indianápolis) en MOPS 10 mM pH 7,5, con MgCl₂ 7,5 mM y dNTP 250 μM (Promega, Madison, Wisconsin). La Taq polimerasa fue la enzima iTaq (BioRad, Hercules, California) y la enzima de escisión fue Cleavase 2.0 (Hologic, Madison, Wisconsin). La concentración del cebador directo fue de 500 nM, la concentración del cebador inverso fue de 500 nM, la sonda flap fue a 500 nM y el casete de FRET se usó a una concentración final de 200 nM. Se realizó toda la amplificación y detección en el termociclador óptico LightCycler 480 (Roche, Indianápolis, Indiana).

Se usaron plásmidos que contenían fragmentos del gen KRAS, ya sea el tipo silvestre o el mutante, para evaluar la

capacidad del sistema experimental para detectar copias mutantes 35A de KRAS introducidas en copias de tipo silvestre en 4 niveles diferentes del mutante, incluyendo 10^4 copias mutantes en 10^5 copias de tipo silvestre (1:10), 10^3 copias mutantes en 10^5 copias de tipo silvestre (1:100), 10^2 copias mutantes en 10^5 copias de tipo silvestre (1:1.000) y 10 copias mutantes en 10^5 copias de tipo silvestre (1:10.000).

5 En la Figura 4 se presentan los datos que muestran las curvas de amplificación cinética y el "punto de cruce" (Cp; Roche LightCycler 480 Manual, Indianápolis, IN) de las diferentes relaciones de mutante a tipo silvestre en las muestras de amplificación. En estos ensayos, el Cp se calcula como el punto en el que la fluorescencia se elevó hasta el 18% de la fluorescencia máxima. El diseño de cebadores y la sonda flap usados en este ejemplo no fueron capaces de detectar la mutación G35A en presencia del tipo silvestre, y no hay respuesta a la dosis real.

10 Ejemplo 3

Ensayos de G35A, G35T y G35C de KRAS con faltas de correspondencia secundarias

En este ejemplo, se añadieron faltas de correspondencia secundarias al cebador directo, que también actúa como sonda invasiva en estos ensayos de escisión. Se añadió la segunda falta de correspondencia a la cuarta base, contando desde la base del extremo 3' que coincide con la mutación. En todos los casos, la segunda base de falta de correspondencia era una A, que correspondía a un C en la secuencia, y generando así un emparejamiento A:G errado en las secuencias mutantes y de tipo silvestre. La falta de correspondencia desestabilizante de A se empleó con cebadores (que son también la sonda invasiva) que tenían extremos 3' con A, T o C, correspondientes a todas las tres mutaciones encontradas en la posición 35 de KRAS.

La secuencia diana para el KRAS de tipo silvestre es como en el Ejemplo 1 (SEQ ID NO: 1). La secuencia G35A detectada fue la mostrada en el Ejemplo 1 (SEQ ID NO: 2).

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

CATTATTTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGITGGCGTAGGCAA
GAGTGCCTTGACGATACAGCTA ATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGA (SEQ ID NO: 12)

Secuencia parcial de la región de amplificación para KRAS, G35C mutante (posición 35 subrayada):

25 CATTATTTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGCTGGCGTAGGCAA
GAGTGCCTTGACGATACAGCTA ATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGA (SEQ ID NO: 13)

El cebador inverso usado para todos los tres de estos diseños de detección de mutación fue el mismo que el del Ejemplo 2, 5'-CTATTGTTGGATCATATTCGTC-3' (SEQ ID NO: 10). El cebador directo para la detección del G35A fue 5'-TTGTGGTAGTTGGAGATGA-3' (SEQ ID NO: 14) donde la base subrayada del extremo 3' corresponde a la mutación dirigida y la base subrayada cuatro posiciones desde el extremo 3' es la falta de correspondencia desestabilizadora destinada a aumentar el efecto de la falta de correspondencia del extremo 3'. La sonda flap utilizada para G35A fue la misma que en el Ejemplo 1, 5'-CGCCGAGGATGGCGTAGGCA-3'/3C6/ (SEQ ID NO: 5), donde la base mutante se muestra subrayada y el extremo 3' se bloquea con un grupo hexanodiol con el fin de inhibir la extensión del cebador.

35 El cebador directo para detección del G35T fue 5'-TTGTGGTAGTTGGAGATGI-3' (SEQ ID NO: 15) donde la base subrayada del extremo 3' corresponde a la mutación dirigida y la base subrayada a cuatro posiciones desde el extremo 3' es la falta de correlación desestabilizante destinada a aumentar el efecto de la falta de correlación del extremo 3'. La sonda flap usada para G35T fue 5'-CGCCGAGGITGGCGTAGGCA-3'/3C6/ (SEQ ID NO: 16), donde la base mutante se muestra subrayada y el extremo 3' se bloquea con un grupo hexanodiol con el fin de inhibir la extensión del cebador.

40 El cebador directo para detección del G35C fue 5'-TTGTGGTAGTTGGAGATGC-3' (SEQ ID NO: 17) donde la base subrayada del extremo 3' corresponde a la mutación dirigida y la base subrayada, a cuatro posiciones desde el extremo 3' es la falta de correlación desestabilizante destinada a aumentar el efecto de la falta de correlación del extremo 3'. La sonda flap utilizada para G35C fue 5'-CGCCGAGGCTGGCGTAGGCA-3'/3C6/ (SEQ ID NO: 18), donde la base mutante se muestra subrayada y el extremo 3' se bloquea con un grupo hexanodiol con el fin de inhibir la extensión del cebador.

La configuración espacial de los cebadores y la sonda flap es similar a aquella mostrada en el Ejemplo 2 (SEQ ID NO: 11).

50 Los cebadores y las sondas flap fueron suministradas como artículos no catalogados por Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, Iowa).

El casete de FRET utilizado, para todos estos sistemas de detección de mutaciones utilizaron /Rojo/TCT/Inactivador/TCGGCCTTTTGGCCGAGAGACCTCGGCGCG/3C6/ (SEQ ID NO: 25), donde Redmond Red es el fluoróforo, el inactivador es el Inactivador Eclipse® Dark y el extremo 3' se bloquea con un grupo hexanodiol con el fin de inhibir la extensión del cebador. El casete de FRET fue suministrado por Hologic (Madison, Wisconsin).

Las condiciones de ciclación fueron 95°C durante 2 min; 50 ciclos a 95°C durante 20 segundos, 53°C durante 1 min y 70°C durante 30 s; y 40°C para mantener. La adquisición de la señal fluorescente se realizó en el punto de 53°C en el ciclo. Las reacciones PCR se realizaron en placas LightCycler® 480 Multiwell 96 (Roche, Indianápolis) en MOPS 10 mM pH 7,5, con MgCl₂ 7,5 mM y dNTP 250 μM (Promega, Madison, Wisconsin). La Taq polimerasa fue la enzima iTaq (BioRad, Hercules, California) y la enzima de escisión fue Cleavase 2.0 (Hologic, Madison, Wisconsin). La concentración del cebador directo fue de 500 nM, la concentración del cebador inverso fue de 500 nM, la sonda flap fue a 500 nM y el casete de FRET se usó a una concentración final de 200 nM. Se realizó toda la amplificación y detección en el termociclador óptico LightCycler 480 (Roche, Indianápolis, Indiana).

Se usaron plásmidos que contenían fragmentos del gen KRAS, ya sea el tipo silvestre o respectivamente uno de los tres mutantes, para evaluar la capacidad del sistema experimental para detectar las copias mutantes G35A, T o C de KRAS incluidas en las copias de tipo silvestre a 4 niveles diferentes del mutante, incluyendo 10⁴ copias del mutante en 10⁵ copias de tipo silvestre (1:10), 10³ copias de mutante en 10⁵ copias de tipo silvestre (1:100), 10² copias del mutante en 10⁵ copias de tipo silvestre (1:1.000) y 10 copias mutantes en 10⁵ copias de tipo silvestre (1:10.000).

En la Figura 5 se presentan los datos que muestran las curvas de amplificación cinética y el "punto de cruce" (Cp; Roche LightCycler 480 Manual, Indianápolis, IN) de las diferentes relaciones de mutante a tipo silvestre en las muestras de amplificación. En estos ensayos, el Cp se calcula como el punto en el que la fluorescencia se elevó hasta el 18% de la fluorescencia máxima. El diseño de los cebadores y la sonda flap usados en este ejemplo podría discriminar la secuencia mutante de la secuencia de tipo silvestre y su eficacia de amplificación no fue suprimida por cantidades excesivas de secuencias de tipo silvestre hasta una relación de mutante/tipo silvestre de aproximadamente 1:100. Sin embargo, el ensayo no podía detectar con fiabilidad las secuencias mutantes en una relación mutante/tipo silvestre de 1:1.000 (Figura 5).

Ejemplo 4

Ensayos de G35A, G35T y G35C de KRAS con otras faltas de correspondencia secundarias

En este ejemplo, se analizaron las faltas de correspondencia secundarias, en forma similar al Ejemplo 3, excepto las faltas de correspondencia que se sabe que son más desestabilizantes para el emparejamiento de bases, específicamente se analizaron las faltas de correspondencia AC y CC en la penúltima posición, adyacente a la falta de correspondencia en el extremo 3', para G35A y G35T, respectivamente. Se usó el mismo conjunto de cebadores como el utilizado en el Ejemplo 3 para la detección de G35C. Además, se utilizó un brazo flap diferente de la sonda flap, así como un casete de FRET emparejado en forma correspondientemente.

Las secuencias diana para las tres mutaciones son las mismas que las descritas en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 3. El cebador inverso utilizado para los tres experimentos de detección de mutación fue el mismo que en el Ejemplo 2, 5'-CTATTGTTGGATATATTCTCTC-3' (SEQ ID NO: 10).

El cebador directo para la detección de G35C es el mismo que el descrito en el Ejemplo 3, 5'-TTGTGGTAGTTGGAGATGC-3' (SEQ ID NO: 17) donde la base subrayada del extremo 3' corresponde a la mutación dirigida y la base subrayada, cuatro posiciones desde el extremo 3' es la falta de correspondencia desestabilizante destinada a aumentar el efecto de la falta de correspondencia del extremo 3'.

El cebador directo para detección del G35A fue 5'-TTGTGGTAGTTGGAGCTAA-3' (SEQ ID NO: 19) donde la base subrayada del extremo 3' corresponde a la mutación dirigida y la penúltima base subrayada es la falta de correspondencia desestabilizante destinada a aumentar el efecto de la falta de correspondencia del extremo 3'. El cebador directo para la detección del G35T fue 5'-TTGTGGTAGTTGGAGCTCT-3' (SEQ ID NO: 20) donde la base subrayada del extremo 3' corresponde a la mutación dirigida y la penúltima base subrayada es la falta de correspondencia desestabilizante destinada a aumentar el efecto de la falta de correspondencia del extremo 3'.

La sonda flap para la detección de G35A fue 5'-GACGCGGAGATGGCGTAGGCA-3'/3C6/ (SEQ ID NO: 21) donde la base mutante se muestra subrayada y el extremo 3' se bloquea con un grupo hexanodiol con el fin de inhibir la extensión del cebador. La sonda flap para la detección de G35T fue 5'-GACGCGGAGTTGGCGTAGGCA-3'/3C6/ (SEQ ID NO: 22) donde la base mutante se muestra subrayada y el extremo 3' se bloquea con un grupo hexanodiol con el fin de inhibir la extensión del cebador. La sonda flap para la detección de G35C fue 5'-GACGCGGAGCTGGCGTAGGCA-3'/3C6/ (SEQ ID NO: 23) donde la base mutante se muestra subrayada y el extremo 3' se bloquea con un grupo hexanodiol con el fin de inhibir la extensión del cebador.

El casete de FRET utilizado, para la detección de mutaciones en este ejemplo, fue 5'-FAM/TCT/Inactivador/AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACTCCGCGTCCGT-3'/3C6 (SEQ ID NO: 24), donde FAM es fluoresceína, el Inactivador es el Inactivador Eclipse® Dark y el 3' se bloquea con un grupo hexanodiol para inhibir la extensión del cebador. El casete de FRET fue suministrado por Hologic (Madison, Wisconsin). Las condiciones de ciclación fueron de 95°C durante 2 min; 50 ciclos a 95°C durante 20 segundos, 53°C durante 1 min y 70°C durante 30 s; y 40°C para mantener. La adquisición de la señal fluorescente se realizó en el punto de 53°C en el ciclo. Las reacciones PCR se realizaron en placas LightCycler® 480 Multiwell 96 (Roche, Indianápolis) en MOPS 10 mM pH 7,5, con MgCl₂ 7,5 mM y dNTP de 250 μM (Promega, Madison, Wisconsin). La Taq polimerasa fue la enzima iTaq (BioRad, Hercules, California) y la enzima de escisión fue Cleavase 2.0 (Hologic, Madison, Wisconsin). La concentración del cebador

directo fue de 500 nM, la concentración del cebador inverso fue de 500 nM, la sonda flap fue a 500 nM y el casete de FRET se usó a una concentración final de 200 nM. Se realizó toda la amplificación y detección en el termociclador óptico LightCycler 480 (Roche, Indianápolis, Indiana).

5 Se usaron plásmidos que contenían fragmentos del gen KRAS, ya sea el tipo silvestre o respectivamente uno de los tres mutantes, para evaluar la capacidad del sistema experimental para detectar las copias mutantes G35A, T o C de KRAS incluidas en las copias de tipo silvestre a 4 niveles diferentes del mutante, incluyendo 10^4 copias del mutante en 10^5 copias de tipo silvestre (1:10), 10^3 copias de mutante en 10^5 copias de tipo silvestre (1:100), 10^2 copias del mutante en 10^5 copias de tipo silvestre (1:1.000) y 10 copias mutantes en 10^5 copias de tipo silvestre (1:10.000).

10 En la Figura 6 se presentan los datos que muestran las curvas de amplificación cinética y el "punto de cruce" (Cp; Roche LightCycler 480 Manual, Indianápolis, IN) de las diferentes relaciones de mutante a tipo silvestre en las muestras de amplificación. En estos ensayos, el Cp se calcula como el punto en el que la fluorescencia se elevó hasta el 18% de la fluorescencia máxima. El diseño de los cebadores y la sonda flap usados en este ejemplo podría discriminar la secuencia mutante de la secuencia de tipo silvestre y su eficacia de amplificación no fue suprimida por cantidades excesivas de secuencias de tipo silvestre. Los ensayos con G35A y G35C de KRAS pudieron detectar linealmente la secuencia mutante hasta una relación de 1:1000 de la relación de mutante/tipo silvestre, y el ensayo de G35T podría detectar linealmente hasta una relación de 1:100 de relación de mutante/tipo silvestre (Figura 6).

Ejemplo 5

Determinación experimental adicional de las mejores faltas de correspondencia secundarias para la detección de G35A de KRAS

20 En este ejemplo, similar al de los ejemplos anteriores, se analizó el efecto desestabilizante de las faltas de correspondencia secundarias en el cebador directo, que también funciona como sonda invasiva, usando la mutación en la posición 35 de KRAS. Como en los otros ejemplos, la detección de la mutación G35A se evaluó en varias proporciones en comparación con un exceso de la secuencia de tipo silvestre. Las secuencias de la región de amplificación diana fueron las mismas que en el Ejemplo 1 (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2). El cebador inverso usado para los tres experimentos de detección de mutaciones fue el mismo que en los Ejemplos 2, 3 y 4: 5'-CTATTGTTGGATATATTCTCTC-3' (SEQ ID NO: 10).

30 La sonda flap (SEQ ID NO: 21) y el casete de FRET (SEQ ID NO: 24) fueron los mismos que aquellos utilizados para la detección de G35A en el Ejemplo 4. Se enumeran la serie de sondas directas, que también sirven como oligos invasivos para el ensayo de escisión, donde la base subrayada del extremo 3' corresponde a la mutación dirigida y la otra base subrayada es la falta de correspondencia desestabilizante destinada a aumentar el efecto de la falta de correspondencia del extremo 3':

KRAS 35A P2C: 5'-TTGTGGTAGTTGG AGCTCA-3' (SEQ ID NO: 25)

KRAS 35A P4A: 5'- AACTTGTGGTAGTTGGAGATGA-3' (SEQ ID NO: 26)

KRAS 35A P6T: 5'-CTTGTGGTAGTTGGIGCTGA-3' (SEQ ID NO: 27)

35 KRAS 35A P5C: 5'-AACTTGTGGTAGTTGGACCTGA-3' (SEQ ID NO: 28)

KRAS 35A P3A: 5'-CTTGTGGTAGTTGGAGCAGA-3' (SEQ ID NO: 29)

40 Las condiciones de ciclación fueron 95°C durante 2 min; 50 ciclos a 95°C durante 20 segundos, 53°C durante 1 min y 70°C durante 30 s; y 40°C para mantener. La adquisición de la señal fluorescente se realizó en el punto de 50°C en el ciclo. Las reacciones PCR se realizaron en placas LightCycler® 480 Multiwell 96 (Roche, Indianápolis) en MOPS 10 mM pH 7,5, con MgCl₂ 7,5 mM y dNTP 250 μM (Promega, Madison, Wisconsin). La Taq polimerasa fue la enzima iTaq (BioRad, Hercules, California) y la enzima de escisión fue Cleavase 2.0 (Hologic, Madison, Wisconsin). La concentración del cebador directo fue de 500 nM, la concentración del cebador inverso fue de 500 nM, la sonda flap fue a 500 nM y el casete de FRET se usó a una concentración final de 200 nM. Se realizó toda la amplificación y detección en el termociclador óptico LightCycler 480 (Roche, Indianápolis, Indiana).

45 Se usaron plásmidos que contenían fragmentos del gen KRAS, ya sea el tipo silvestre o respectivamente uno de los tres mutantes, para evaluar la capacidad del sistema experimental para detectar las copias mutantes G35A, T o C de KRAS incluidas en las copias de tipo silvestre a 4 niveles diferentes del mutante, incluyendo 10^4 copias del mutante en 10^5 copias de tipo silvestre (1:10), 10^3 copias de mutante en 10^5 copias de tipo silvestre (1:100), 10^2 copias del mutante en 10^5 copias de tipo silvestre (1:1.000) y 10 copias mutantes en 10^5 copias de tipo silvestre (1:10.000).

50 En la Figura 7 se presentan los datos que muestran las curvas de amplificación cinética y el "punto de cruce" (Cp; Roche LightCycler 480 Manual, Indianápolis, IN) de las diferentes relaciones de mutante a tipo silvestre en las muestras de amplificación. En estos ensayos, el Cp se calcula como el punto en el que la fluorescencia se elevó hasta el 18% de la fluorescencia máxima. De los 5 diseños de sonda cebadora/invasiva probadas, la penúltima falta de correspondencia, que produce una falta de emparejamiento de C:C, denominada KRAS 35A P2C mostró la mejor

capacidad para cuantificar el mutante en presencia de un exceso de secuencia del gen de tipo silvestre, que muestra una respuesta a la dosis hasta un nivel de 1:1000 de mutante/tipo silvestre (Figura 7).

Listado de secuencias

- 5 <110> Exact Sciences Corporation
Zou, Hongzhi
Lidgard, Graham P.
Domanico, Michael J.
Allawi, Hatim
- <120> Ensayo de Detección de Mutación
- 10 <130> EXAS-003WO
- <140> US 12/946,752
- <141> 15-11-2010
- <160> 30
- <170> FastSEQ for Windows Versión 4.0
- 15 <210> 1
- <211> 139
- <212> ADN
- <213> secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> fragmento KRAS wt
- <400> 1
- cattatTTTT attataaggc ctgctgaaa tgactgaata taaacttgtg gtagttggag 60
- ctggtggcgt aggcaagagt gccttgacga tacagctaata tcagaatcat tttgtggacg 120
- aatatgatcc aacaataga 139
- <210> 2
- <211> 139
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> fragmento KRAS G35A
- <400> 2
- cattatTTTT attataaggc ctgctgaaa tgactgaata taaacttgtg gtagttggag 60
- ctgatggcgt aggcaagagt gccttgacga tacagctaata tcagaatcat tttgtggacg 120
- aatatgatcc aacaataga 139
- 30 <210> 3
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
- <223> Cebador sintético
- <400> 3
- aggcctgctg aaaatgactg 20
- <210> 4
- 40 <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Cebador sintético
- 45 <400> 4
- ttgttgatc atattcgtcc ac 22

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Sonda flap sintética

 <220>
 <221> diferencia_misc
 <222> 20
 10 <223> 3'-C6 hexanodiol modificado

 <400> 5
 cgccgaggat ggcgtaggca 20

 <210> 6
 <211> 18
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético invasivo

 <400> 6
 20 tgggtagtt ggagctgg 18

 <210> 7
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Cassette FRET sintética

 <220>
 <221> diferencia_misc
 <222> 1
 30 <223> fluoróforo modificado 5'-Red Redmond Red

 <220>
 <221> diferencia_misc
 <222> 3
 <223> Nucleótido modificado con inactivador
 35 <220>
 <221> diferencia_misc
 <222> 33
 <223> 3'-C6 hexanodiol modificado

 <400> 7
 40 tcttcggcct ttggccgag agacctcggc gcg 33

 <210> 8
 <211> 139
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> fragmento KRAS G35A

 <400> 8
 cattatTTTT attataaggc ctgctgaaaa tgactgaata taaacttgtg gtagttggag 60
 ctgatggcgt aggcaagagt gccttgacga tacagctaat tcagaatcat tttgtggacg 120
 aatatgatcc aacaataga 139
 50 <210> 9
 <211> 19
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 9

5 ttgtgtagt tggagctga 19

<210> 10

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Cebador sintético

<400> 10

ctattgttg atcatattcg tc 22

<210> 11

<211> 139

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> fragmento KRAS G35A

20 <400> 11

cattatTTTT attataaggc ctgctgaaaa tgactgaata taaacttgtg gtagttggag 60

ctgatggcgt aggcaagagt gccttgacga tacagctaata tcagaatcat tttgtggacg 120

aatatgatcc aacaataga 139

<210> 12

<211> 139

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> fragmento KRAS G35T

<400> 12

cattatTTTT attataaggc ctgctgaaaa tgactgaata taaacttgtg gtagttggag 60

ctgttggcgt aggcaagagt gccttgacga tacagctaata tcagaatcat tttgtggacg 120

aatatgatcc aacaataga 139

30 <210> 13

<211> 139

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> fragmento KRAS G35C

<400> 13

cattatTTTT attataaggc ctgctgaaaa tgactgaata taaacttgtg gtagttggag 60

ctgctggcgt aggcaagagt gccttgacga tacagctaata tcagaatcat tttgtggacg 120

aatatgatcc aacaataga 139

<210> 14

<211> 19

40 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 14

45 ttgtgtagt tggagatga 19

<210> 15

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador sintético

 <400> 15
 ttgtgtagt tggagatgt 19

 <210> 16
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sonda flap sintética

 <220>
 15 <221> diferencia_misc
 <222> 20
 <223> 3'-C6 hexanodiol modificado

 <400> 16
 cgccgagggt ggcgtaggca 20

 20 <210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 25 <223> Cebador sintético

 <400> 17
 ttgtgtagt tggagatgc 19

 <210> 18
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sonda flap sintética

 <220>
 35 <221> diferencia_misc
 <222> 20
 <223> 3'-C6 hexanodiol modificado

 <400> 18
 cgccgaggct ggcgtaggca 20

 40 <210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 45 <223> Cebador sintético

 <400> 19
 ttgtgtagt tggagctaa 19

 <210> 20
 <211> 19
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 20
 ttgtgtagt tggagctct 19

 5 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 10 <223> Sonda flap sintética

 <220>
 <221> diferencia_misc
 <222> 21
 <223> 3'-C6 hexanediol modified

 15 <400> 21
 gacgcggaga tggcgtaggc a 21

 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sonda flap sintética

 <220>
 <221> diferencia_misc
 25 <222> 21
 <223> 3'-C6 hexanodiol modificado

 <400> 22
 gacgcggagt tggcgtaggc a 21

 <210> 23
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sonda flap sintética

 35 <220>
 <221> diferencia_misc
 <222> 21
 <223> 3'-C6 hexanodiol modificado

 <400> 23
 40 gacgcggagc tggcgtaggc a 21

 <210> 24
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Cassette FRET sintética

 <220>
 <221> diferencia_misc
 <222> 1
 50 <223> 5'-FAM modificado

 <220>
 <221> diferencia_misc

<222> 3
 <223> Nucleótido modificado con inactivador

 <220>
 <221> diferencia_misc
 5 <222> 35
 <223> 3'-C6 hexanodiol modificado

 <400> 24
 tctagccggt ttccggctg agactccgcg tccgt 35

 <210> 25
 10 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sonda sintética

 15 <400> 25
 ttgtgtagt tggagctca 19

 <210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sonda sintética

 <400> 26
 aactgtggt agtggagat ga 22

 25 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Sonda sintética

 <400> 27
 cttgtgtag ttgtgctga 20

 <210> 28
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sonda sintética

 <400> 28
 40 aactgtggt agtggacct ga 22

 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Sonda sintética

 <400> 29
 cttgtgtag ttgagcaga 20

 <210> 30
 50 <211> 33
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cassette FRET sintética

<220>

5 <221> diferencia_misc

<222> 1

<223> fluoróforo modificado 5'-Redmond Red

<220>

10 <221> diferencia_misc

<222> 3

<223> Nucleótido modificado con inactivador

<220>

<221> diferencia_misc

<222> 33

15 <223> 3'-C6 hexanodiol modificado

<400> 30

tcttcggcct ttggccgag agacctcggc gcg 33

REIVINDICACIONES

1. Un método de análisis de una muestra que comprende:
- 5 a) amplificar un producto de una muestra que comprende tanto copias de tipo silvestre de un locus genómico como copias mutantes de dicho locus genómico que tienen una mutación puntual con respecto a dichas copias de tipo silvestre del locus genómico, para producir una muestra amplificada;
- en donde:
- i. dicha amplificación se realiza usando un primer cebador y un segundo cebador;
- ii. dicho primer cebador comprende un nucleótido terminal 3' que empareja las bases con dicha mutación puntual y también comprende una secuencia de nucleótidos que es totalmente complementaria a una secuencia en dicho locus con la excepción de una falta de correspondencia de una sola base dentro de las 6 bases de dicho nucleótido terminal 3'; y
- 10 iii. La muestra es ácido nucleico obtenido de heces humanas;
- b) detectar la presencia de dicho producto en dicha muestra amplificada usando un ensayo flap que emplea:
- i. dicho primer cebador; y
- 15 ii. un oligonucleótido flap que comprende un nucleótido que empareja las bases con dicha mutación puntual.
2. Un método según la reivindicación 1, en donde dicha muestra contiene al menos 100 veces más copias de tipo silvestre de dicho locus genómico que copias mutantes de dicho locus genómico.
3. Un método según la reivindicación 1 o 2, que comprende además la normalización de la cantidad de dicho producto en dicha muestra amplificada con respecto a la cantidad de un ácido nucleico de control presente en dicha muestra, determinando de este modo la cantidad de dichas copias mutantes en dicha muestra.
- 20 4. Un método según la reivindicación 3, en donde dicho ácido nucleico de control es un locus diferente de dicho locus genómico.
5. Un método según la reivindicación 3 o 4, en donde dicho ácido nucleico de control se detecta usando un ensayo flap que emplea un oligonucleótido invasivo que tiene un nucleótido terminal 3' que empareja las bases con dichas copias de tipo silvestre de dicho locus genómico en el sitio de dicha mutación puntual, detectando de este modo la presencia de copias de tipo silvestre de dicho locus genómico en dicha muestra.
- 25 6. Un método según la reivindicación 3, 4 o 5, en donde dicho ensayo flap emplea los primeros reactivos de ensayo flap que incluyen el primer cebador de PCR, una primera sonda flap que tiene un primer flap y un primer casete de FRET, y en donde dicho ácido nucleico de control se detecta utilizando los segundos reactivos de ensayo flap que incluyen un segundo cebador de PCR, una segunda sonda flap que tiene un segundo flap y un segundo casete de FRET que produce una señal que puede distinguirse del primer casete de FRET, en donde el primer y segundo reactivos flap están en la misma mezcla de reacción.
- 30 7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la mutación de dicho locus genómico está asociada con cáncer.
- 35 8. Un método según la reivindicación 7, en donde dicho locus genómico es el gen KRAS.
9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además hacer un diagnóstico de cáncer de colon o adenoma con base en si las copias mutantes de dicho locus genómico se identifican en dichas heces.
- 40 10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha falta de correspondencia en dicho primer cebador está en la posición -1, posición -2, posición -3, posición -4 o posición -5 con respecto a dicho nucleótido terminal.
11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha amplificación y etapas de detección se realizan utilizando una mezcla de reacción que contiene tanto reactivos de PCR como reactivos flapsflap, y no se añaden reactivos adicionales a dicha mezcla de reacción entre dichas etapas de amplificación y detección.
- 45 12. Un método según la reivindicación 11, en donde dicha mezcla de reacción comprende además reactivos de PCR y reactivos flap para amplificación y detección de un segundo locus genómico, opcionalmente en donde se detecta una mutación puntual en dicho segundo locus genómico.

13. Una mezcla de reacción que comprende:
- a) reactivos de amplificación que comprenden una polimerasa termoestable, nucleótidos, un primer cebador y un segundo cebador para amplificar un locus genómico diana de una muestra de ácido nucleico obtenida de heces humanas; en donde dicho primer cebador:
 - 5 i. comprende un nucleótido terminal 3' que empareja las bases con una mutación puntual en dicho locus genómico; y
 - ii. comprende una secuencia de nucleótidos que es totalmente complementaria a una secuencia en dicho locus con la excepción de una falta de correspondencia de una sola base dentro de 6 bases de dicho nucleótido terminal 3';
 - b) reactivos de ensayo flap que comprenden una endonucleasa flap, un casete de FRET y un oligonucleótido flap que comprende un nucleótido que empareja las bases con dicha mutación puntual;
- 10 c) dicha muestra de ácido nucleico, en donde dicha muestra de ácido nucleico comprende tanto copias de tipo silvestre de dicho locus genómico como copias mutantes de dicho locus genómico que tiene una mutación puntual con respecto a dichas copias de tipo silvestre del locus genómico; y
- en donde dicha mezcla de reacción se caracteriza porque puede amplificar y detectar la presencia de dichas copias mutantes de dicho locus genómico en dicha muestra.
- 15 14. Una mezcla de reacción según la reivindicación 13, en donde la mezcla de reacción comprende un oligonucleótido invasivo distinto de dicho primer cebador que tiene un oligonucleótido terminal 3' que empareja las bases con dicha mutación puntual.

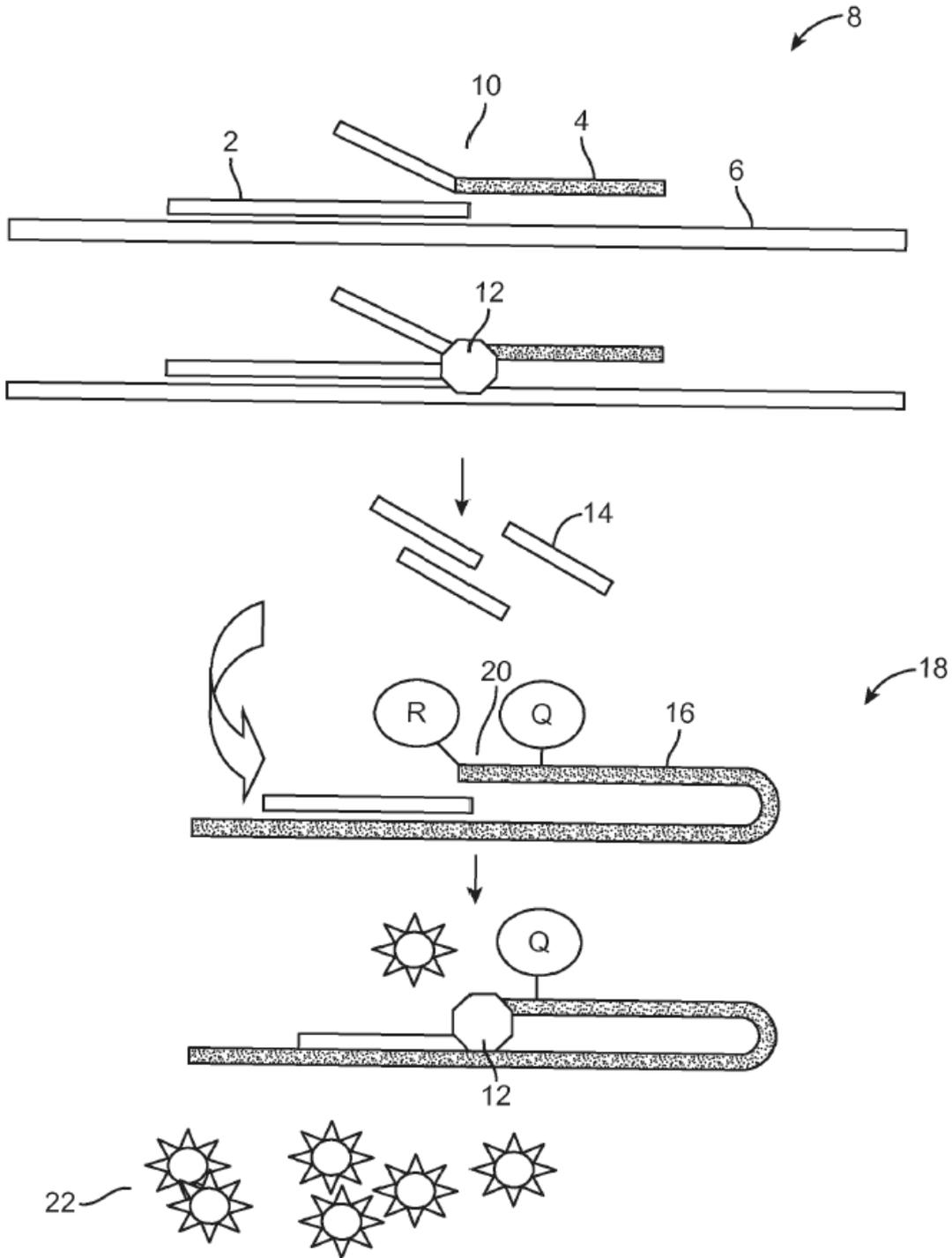


FIG. 1

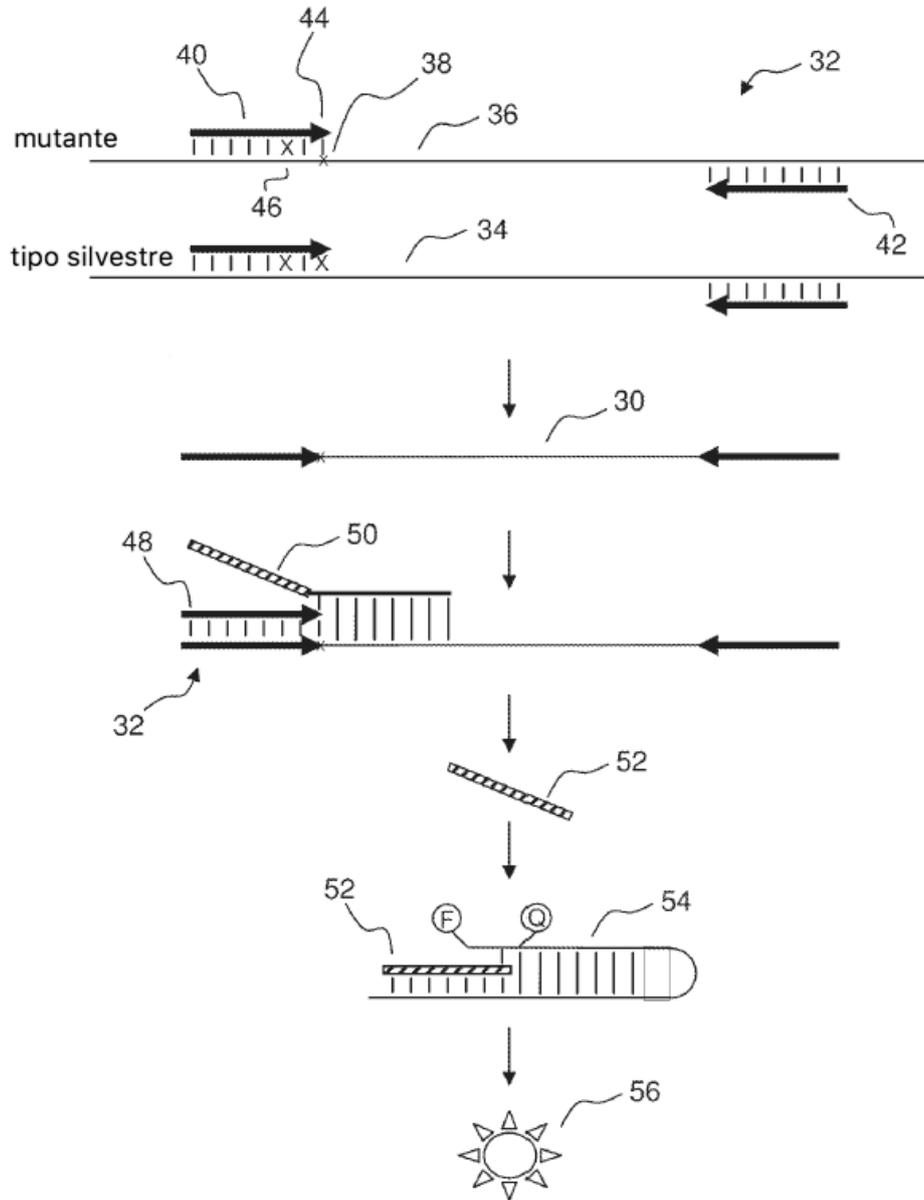


Fig. 2

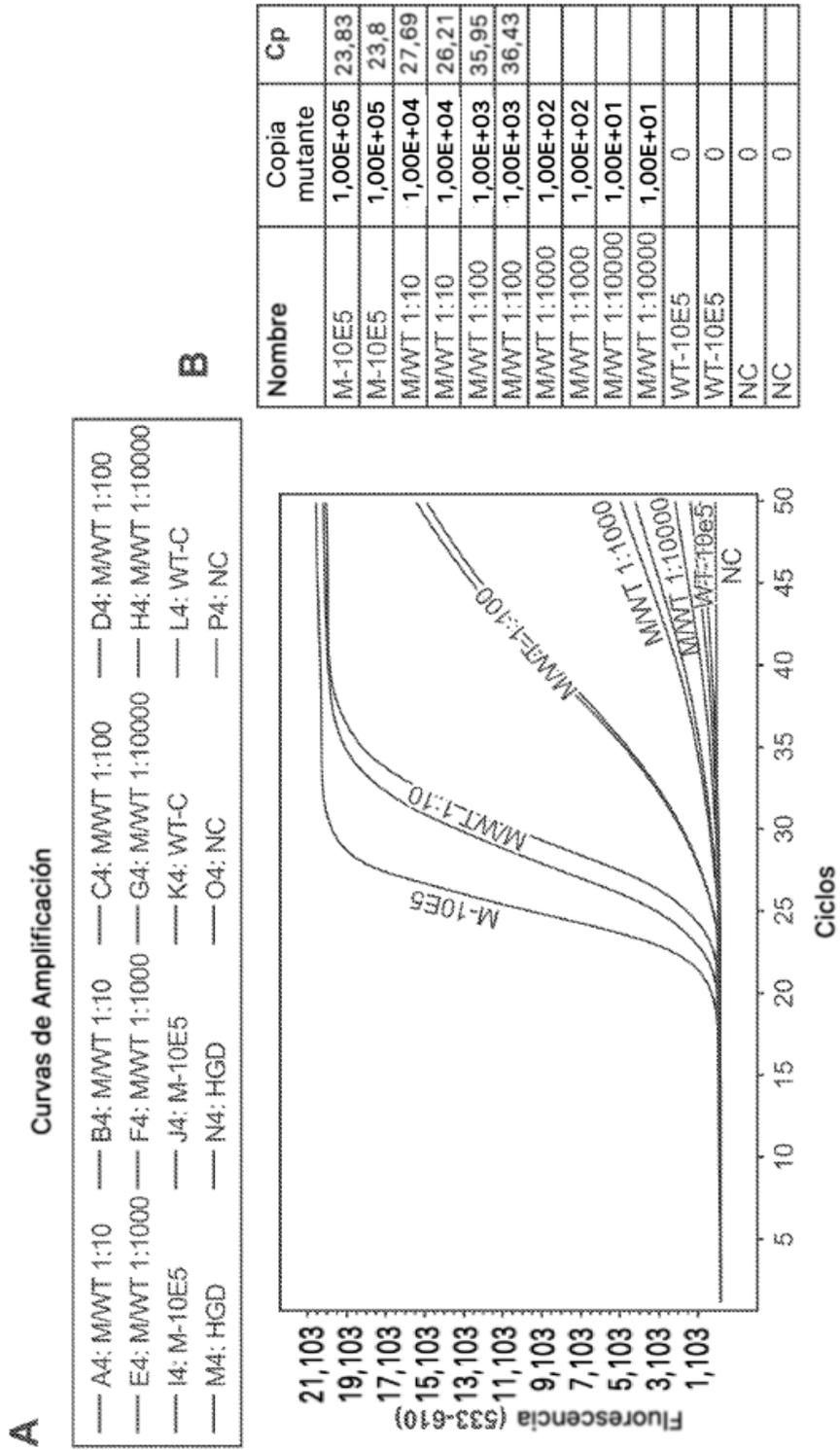


FIG. 3

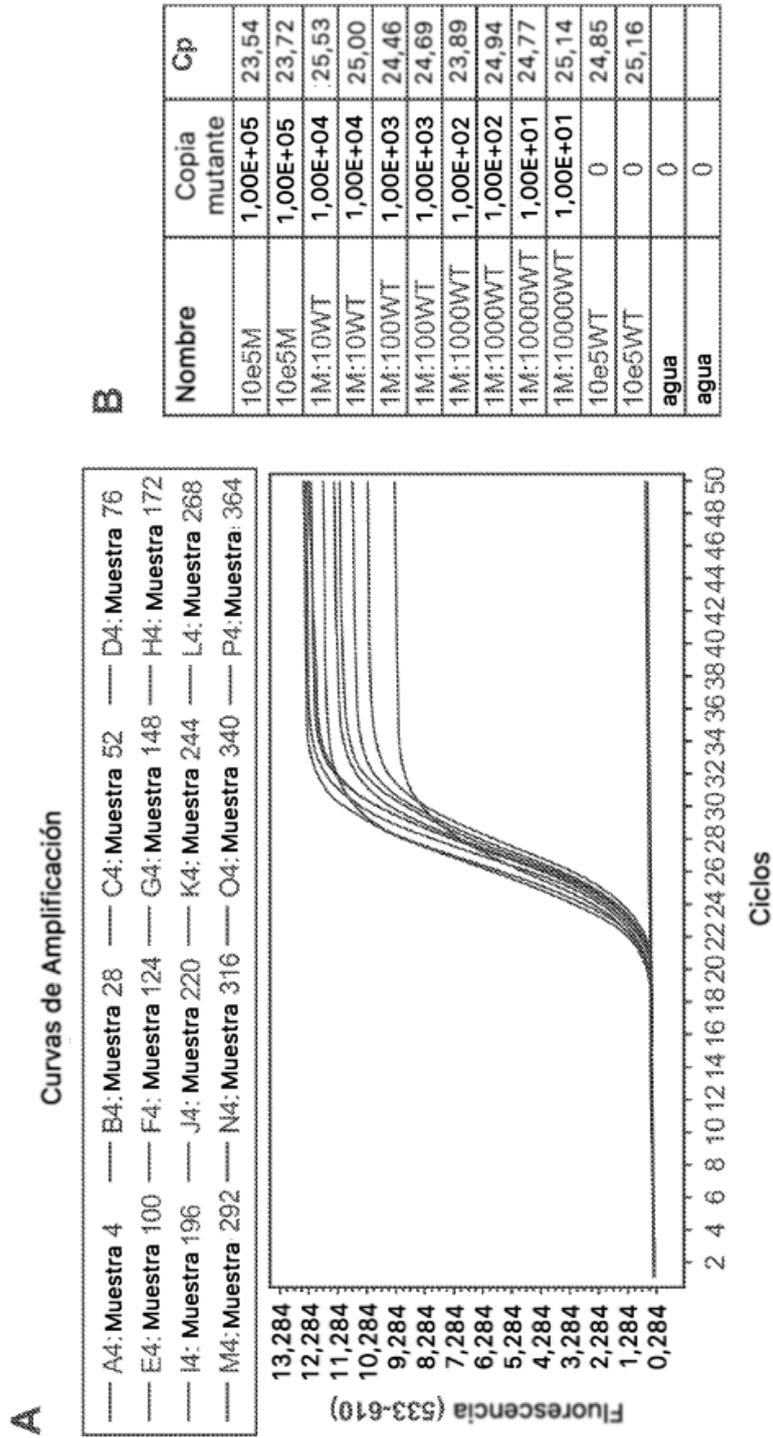
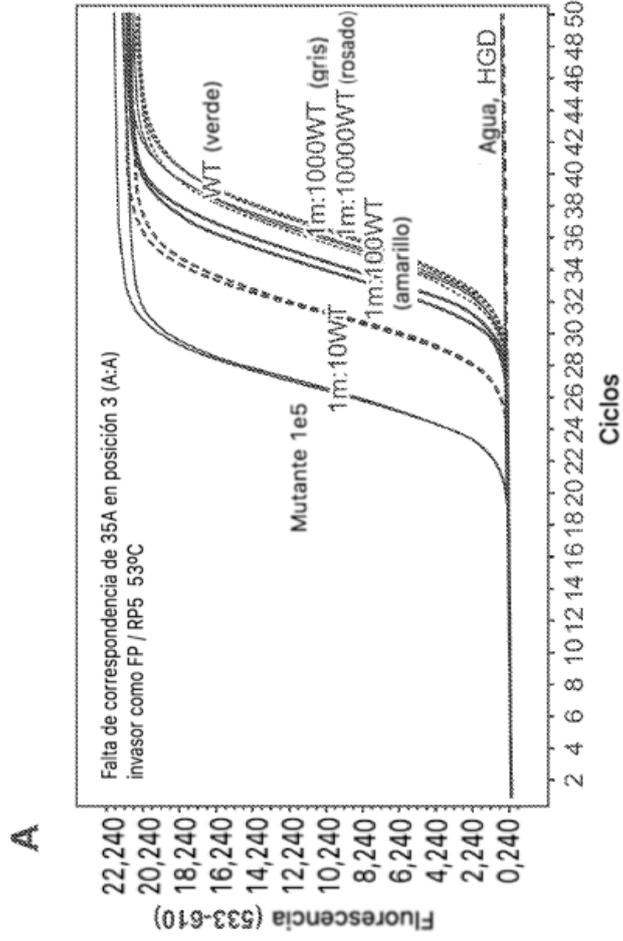


FIG. 4



D

Nombre	Copia mutante	Cp
M10e5	1,00E+05	24,22
M10e5	1,00E+05	24,20
1M:10WT	1,00E+04	28,97
1M:10WT	1,00E+04	28,80
1M:100WT	1,00E+03	31,60
1M:100WT	1,00E+03	32,05
1M:1000WT	1,00E+02	33,25
1M:1000WT	1,00E+02	33,49
1M:10000WT	1,00E+01	33,80
1M:10000WT	1,00E+01	33,39
WT 1e5	0	32,89
WT 1e5	0	32,79
agua	0	
agua	0	

FIG. 5

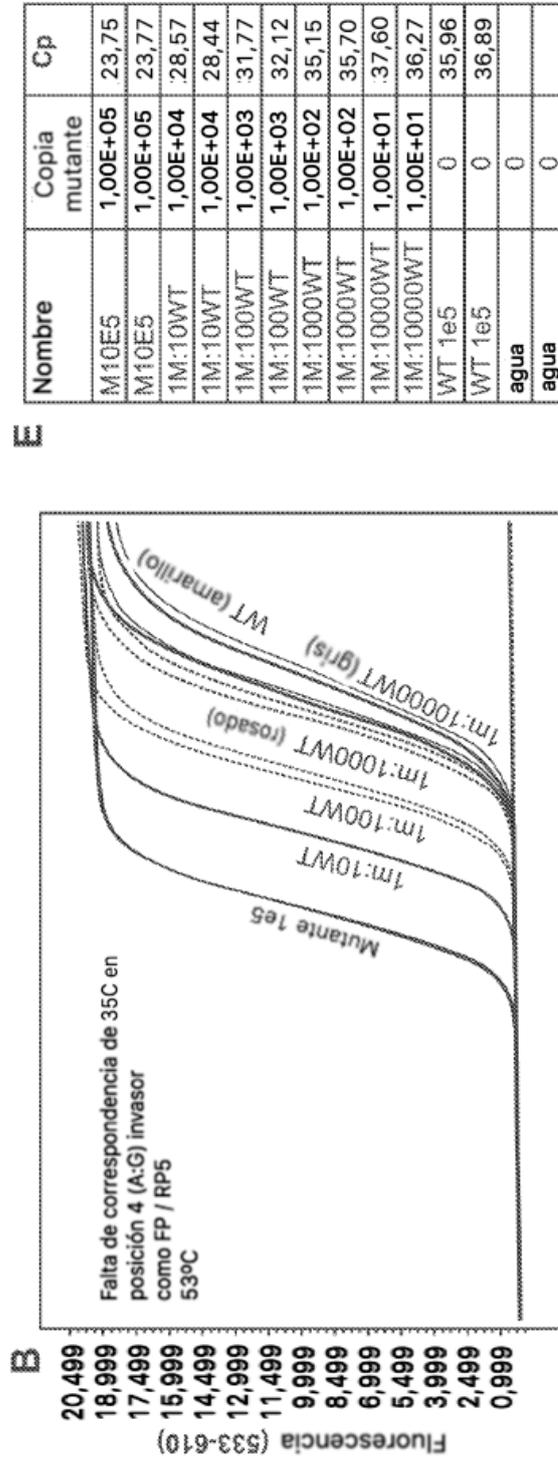


FIG. 5 (Cont. 1)

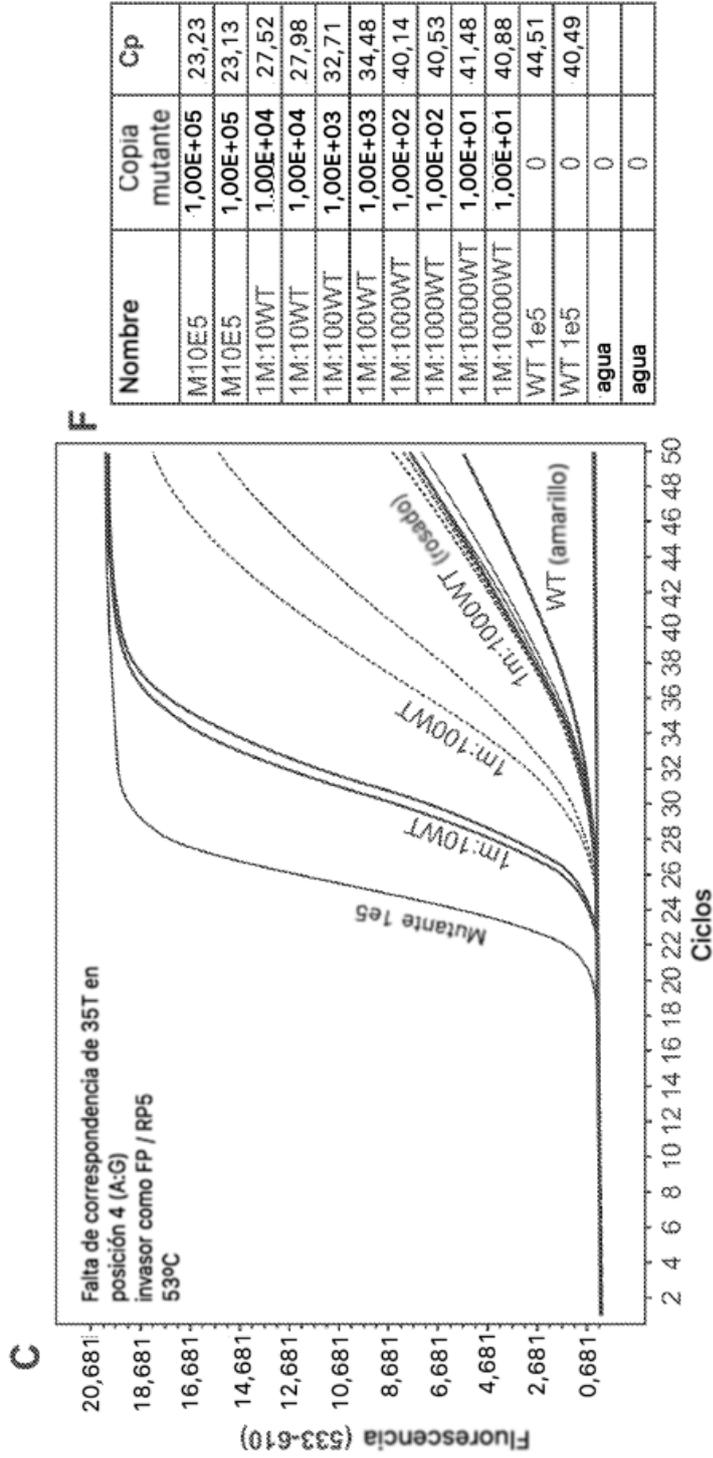


FIG. 5 (Cont. 2)

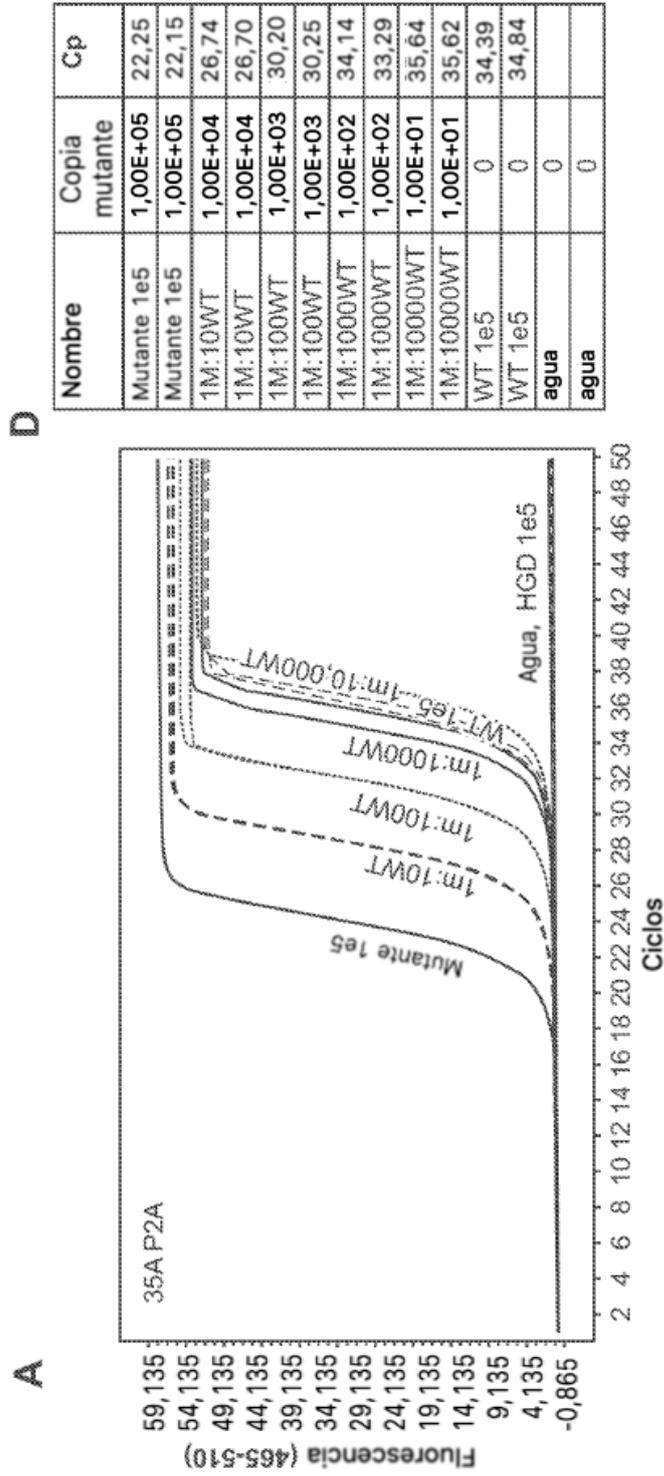


FIG. 6

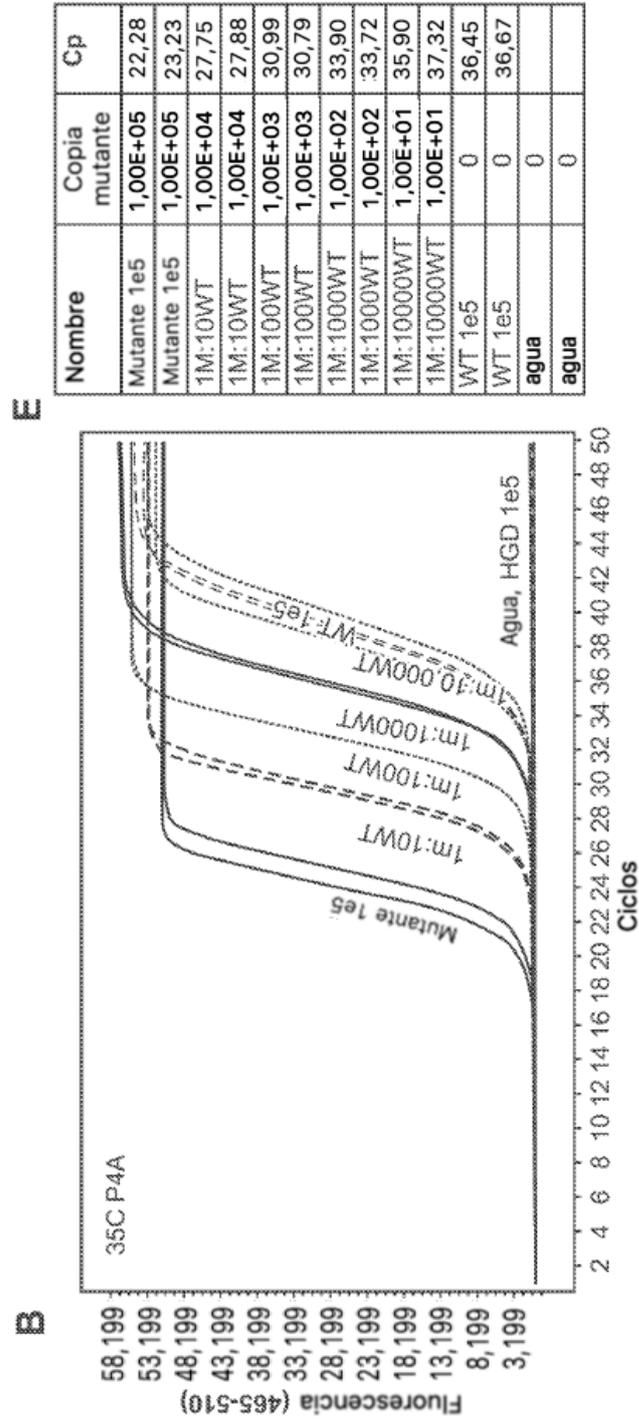


FIG. 6 (Cont. 1)

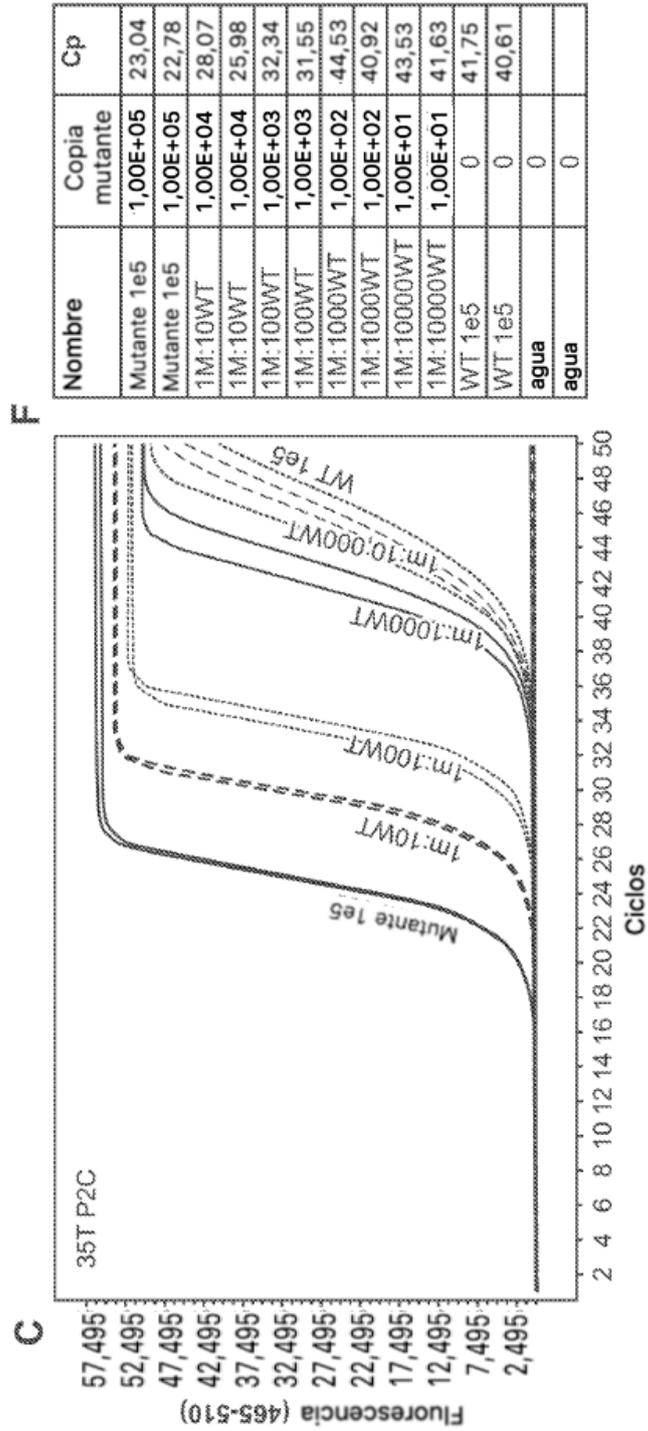


FIG. 6 (Cont. 2)

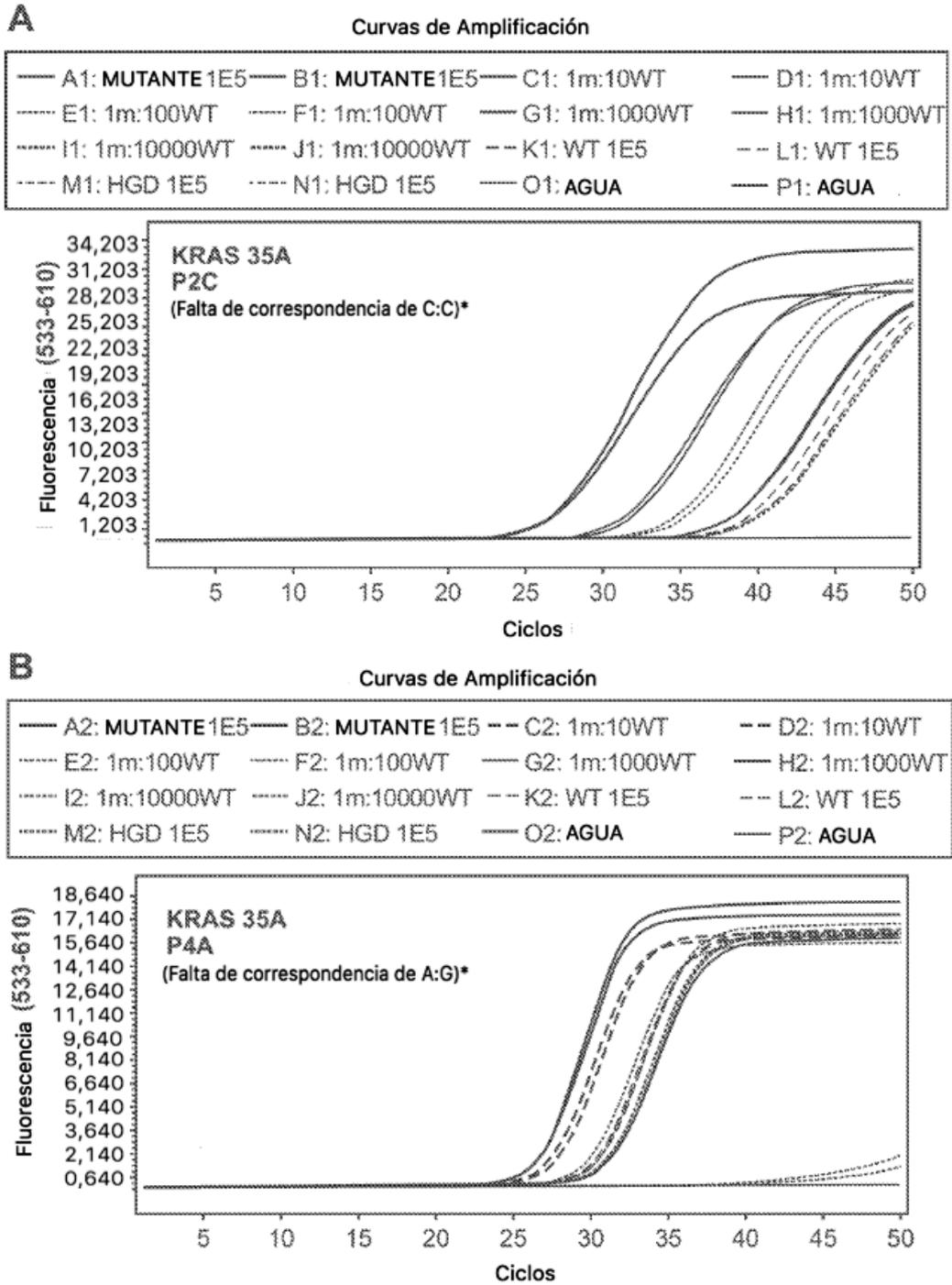
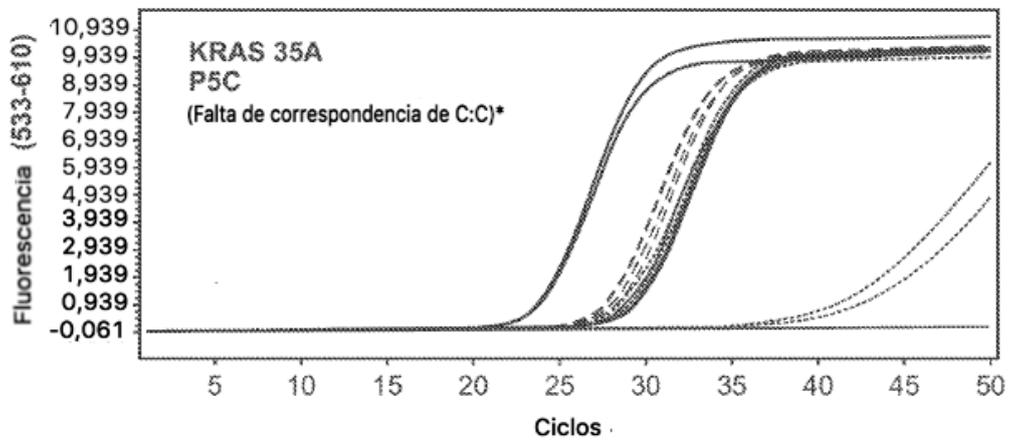
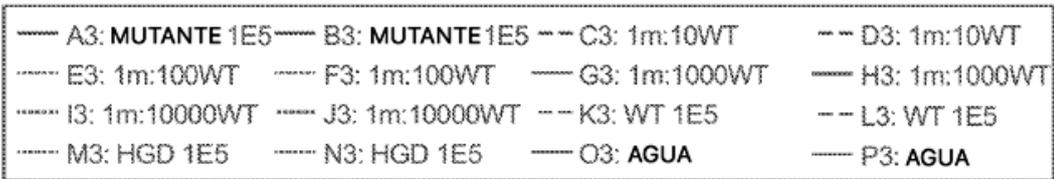


FIG. 7

C

Curvas de Amplificación



D

Curvas de Amplificación

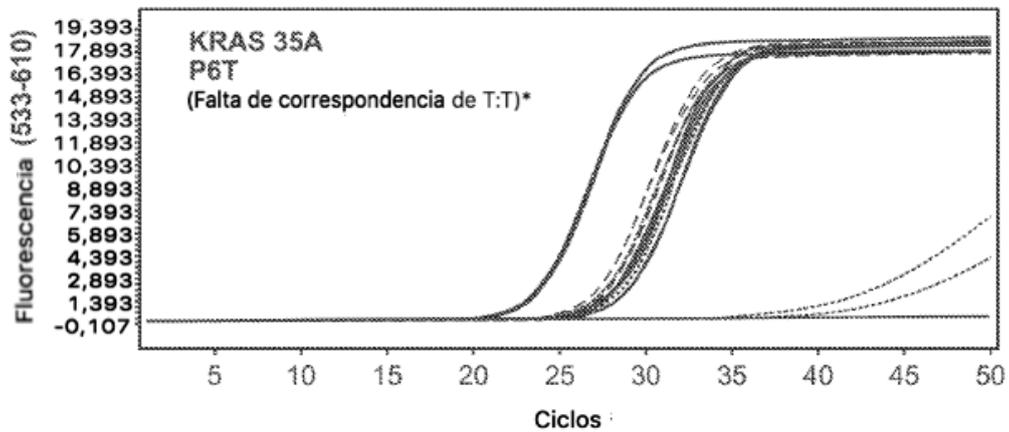
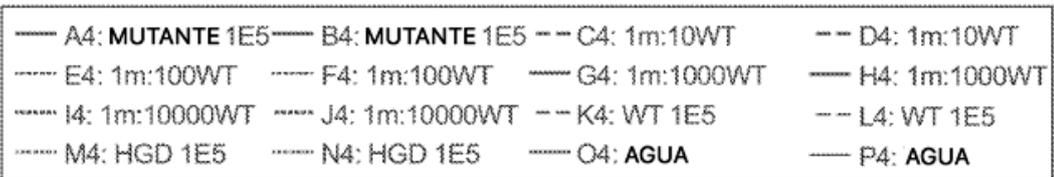
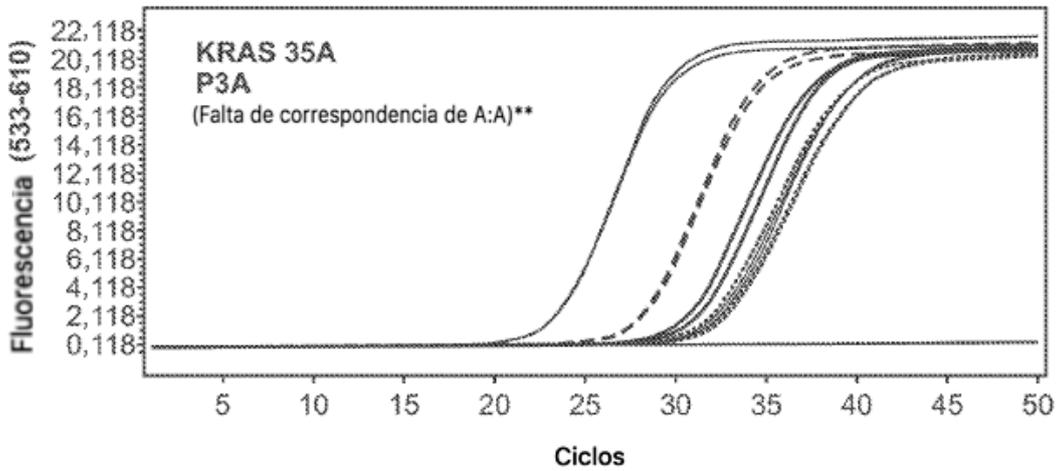
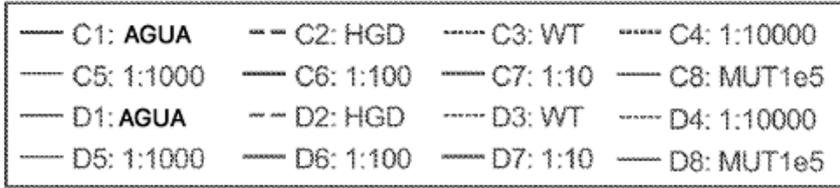


FIG. 7 (Cont. 1)

E

Curvas de Amplificación



F

Nombre	Copia mutante	35A P2C Cp	35A P4A Cp	35A P5C Cp	35A P6T Cp	35A P3A Cp
MUTANTE1E5	1,00E+05	27,23	26,33	23,60	23,58	23,13
MUTANTE1E5	1,00E+05	27,08	26,42	23,61	23,35	23,16
1M:10WT	1,00E+04	32,28	27,49	27,50	27,52	27,94
1M:10WT	1,00E+04	31,73	26,96	27,35	26,82	27,87
1M:100WT	1,00E+03	35,20	30,21	29,03	28,29	30,51
1M:100WT	1,00E+03	35,71	29,54	28,92	27,27	31,04
1M:1000WT	1,00E+02	38,70	30,89	29,28	28,73	32,16
1M:1000WT	1,00E+02	38,83	30,90	28,79	27,78	32,46
1M:10000WT	1,00E+01	40,46	30,89	29,17	28,65	32,62
1M:10000WT	1,00E+01	40,64	30,74	28,47	28,10	32,78
WT 1e5	0	40,52	29,96	28,22	27,94	31,89
WT 1e5	0	39,81	30,16	27,86	26,88	31,81
AGUA	0					39,35
AGUA	0			45,00		19,83

FIG. 7 (Cont. 2)