

CEBADOR**Campo de Invención**

La presente invención se refiere a un cebador y, más
5 específicamente, a un cebador para la detección de una mutación
en una secuencia de polinucleótidos. La presente invención
también se refiere a un kit que comprende el cebador y a un
método para detectar una mutación en una secuencia de
microsatélites.

10

Antecedentes de la Invención

Las mutaciones de desplazamiento de marco pueden
causar enfermedades al alterar la traducción normal de
proteínas. Entre otras patologías, las mutaciones de
desplazamiento de marco se han relacionado con el cáncer y, en
15 particular, con los cánceres relacionados con la inestabilidad
de los microsatélites. La inestabilidad de microsatélites (MSI,
por sus siglas en inglés) es un estado hipermutable de las
células causado por un deterioro en la reparación de errores
de coincidencia del ADN (MMR, por sus siglas en inglés). En
20 otras palabras, las células afectadas por MSI no tienen
mecanismos de reparación que funcionen adecuadamente y, por lo
tanto, acumulan mutaciones espontáneas durante las
replicaciones del ADN, lo que puede causar mutaciones por
desplazamiento de marco. Estos errores se acumulan
25 particularmente en microsatélites, que son secuencias

repetidas de ADN (más comúnmente una repetición de dinucleótidos de los nucleótidos C y A). Por lo tanto, MSI produce mutaciones de inserción y deleción en estas secuencias repetidas llamadas microsatélites.

5 La MSI se ha relacionado con muchos cánceres, incluidos los de colon, gástrico, endometrio, ovario, tracto hepatobiliar, tracto urinario, cerebro y piel (Cortes-Ciriano *et al.* 2017). Se han encontrado mutaciones de desplazamiento de marco en *ASTE1*, *TAF1B*, *KIAA2018* y *SLC22A9*. En particular,
10 la mutación del marco de lectura de *TGFBR2* está presente en un gran número de cánceres colorrectales (CRC, por sus siglas en inglés) y cánceres gástricos (GC, por sus siglas en inglés) causados por la inestabilidad de microsatélites (MSI). También se sabe que la mutación de desplazamiento de marco de *TGFBR2*
15 está asociada con el síndrome de Lynch. La MSI consiste en mutaciones de inserción y eliminación en tramos de repeticiones cortas de ADN en tándem (microsatélites) en todo el genoma. Se informa que más del 95% de las mutaciones de desplazamiento de marco en el CCR son eliminaciones de un solo nucleótido (Maby
20 *et al.* 2015).

En vista de lo anterior, las mutaciones de desplazamiento de marco ofrecen un objetivo terapéutico para el tratamiento de enfermedades asociadas con tales mutaciones, incluidos muchos cánceres. Sin embargo, no todos los pacientes
25 que padecen la enfermedad tendrán esta mutación,

particularmente los pacientes con cáncer, en donde se sabe que la enfermedad es muy heterogénea. Por lo tanto, es importante poder detectar el subconjunto de pacientes dentro de una población con enfermedad que tengan una mutación en el marco de lectura, para encontrar los pacientes que responderían a la terapia dirigida a la mutación en el marco de lectura.

Por ejemplo, la vacuna contra el cáncer FMPV-1, que consiste en un péptido inmunogénico mutante, se dirige al TGFBR2 mutante con desplazamiento del marco de lectura como se describe en el documento WO/2020239937. No todos los pacientes con MSI-CRC (aproximadamente 75%) y MSI-GC (aproximadamente 80%) tienen TGFBR2 mutado por desplazamiento de marco. Para garantizar el reclutamiento únicamente de pacientes elegibles para estudios clínicos con FMPV-1, sería muy útil llevar a cabo pruebas de detección del mutante TGFBR2 en los pacientes para encontrar los pacientes que se beneficiarán de la terapia. En otras palabras, la detección de mutaciones de desplazamiento de marco puede ayudar a proporcionar un enfoque de medicina personalizada para enfermedades en las que esta mutación puede estar presente o no. Además, la detección de tales mutaciones puede ayudar a reclutar candidatos adecuados para un ensayo clínico para probar terapias dirigidas a las mutaciones de desplazamiento de marco.

Este enfoque de detección y medicina personalizada también sería útil para pacientes con una delección de un solo

nucleótido en el gen ASTE1. En particular, la vacuna contra el
cáncer FMPV-2 (también denominada "fsp8") es un péptido
inmunogénico mutante que se dirige al mutante ASTE1 con
desplazamiento de marco, como se describe en el documento
5 WO2021/239980. Una eliminación de un solo nucleótido en este
gen es la mutación de desplazamiento de marco más dominante,
pero no ocurre en todos los cánceres MSI-H. Por lo tanto, sería
útil seleccionar a los pacientes para la detección del ASTE1
mutante, para encontrar los pacientes que se beneficiarán de
10 la terapia, tal como se mencionó anteriormente con respecto al
TGF β R2.

Actualmente, es necesario secuenciar el genoma del
paciente para comprender su estado de TGFBR2 y ASTE1, o
confiar en la amplificación del ADN seguida de la
15 secuenciación para detectar la presencia o ausencia de la
mutación del marco de lectura. Estos métodos de
secuenciación tardan alrededor de 2 días en completarse y
normalmente deben ser llevados a cabo por un laboratorio
externo, ya que los hospitales generalmente no cuentan con
20 el equipo disponible para llevar a cabo la secuenciación.
Por lo tanto, esto requiere que las muestras se transporten
al laboratorio de pruebas. Por lo tanto, existe la necesidad
de proporcionar un ensayo más sencillo para la detección
específica de mutaciones de desplazamiento de marco,
25 particularmente con fines de medicina personalizada.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una tecnología bien establecida para analizar secuencias de ADN. La especificidad del ADN de una prueba de PCR está determinada por los cebadores diseñados para interactuar con la secuencia de ADN objetivo. Sin embargo, los cebadores de PCR normalmente no pueden apuntar a una región con más de cuatro repeticiones de nucleótidos, lo que significa que el uso de cebadores para detectar un cambio en una región de microsatélite no es trivial.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar una técnica para la detección específica en biopsias de tumores de mutaciones de desplazamiento de marco que pudieran ser relevantes en la enfermedad, en particular en TGFBR2 y ASTE1. Las biopsias de tumores sólidos no son representativas de todo el tumor, ya que los tumores tienden a ser heterogéneos y, de esta manera, las biopsias de tumores son representativas sólo de la parte del tumor de la que se toma la biopsia. Por el contrario, las biopsias líquidas son mucho más representativas de todo el cáncer y son más fáciles de trabajar. Por lo tanto, es deseable que esta técnica sea adecuada para la detección de ADN libre de células (ADNcf) en biopsias líquidas (por ejemplo, plasma).

Breve Descripción de la Invención

La presente invención resuelve las necesidades y objetivos anteriores mediante el diseño de cebadores y ensayos

de amplificación de ADN usando tales cebadores, que son capaces de distinguir entre un microsatélite con una mutación de desplazamiento de marco y un microsatélite sin mutación de desplazamiento de marco (es decir, un microsatélite de tipo salvaje). En particular, estos cebadores permiten el uso de PCR para distinguir entre una mutación de desplazamiento de marco y un microsatélite de tipo salvaje incluso aunque difieren sólo en tan solo un nucleótido único, por ejemplo, al llevar a cabo la PCR en condiciones subóptimas. Estas condiciones subóptimas aumentan la rigurosidad de la reacción de manera que se magnifica la diferencia entre la eficiencia de amplificación entre el microsatélite mutante con desplazamiento de marco y el tipo salvaje, proporcionando una prueba más sensible para el microsatélite mutante con desplazamiento de marco. Estas condiciones subóptimas se pueden lograr de diferentes maneras. Por lo tanto, esta es una invención útil en la detección de mutaciones de desplazamiento de marco, el diagnóstico de enfermedades relacionadas con MSI y/o la detección de sujetos para determinar su idoneidad para el tratamiento contra tales mutaciones de desplazamiento de marco.

En un aspecto de la invención, se proporciona un cebador para la detección de una mutación en un microsatélite contenido en una secuencia objetivo de una molécula de ADN bicatenario, en donde la mutación es un desplazamiento de marco

del microsatélite en comparación con la correspondiente
secuencia de microsatélite de tipo salvaje, y en donde el
cebador comprende una región de al menos 10 nucleótidos que es
complementaria a la secuencia objetivo de la cadena en
5 antisentido o sentido de la molécula de ADN que contiene el
microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de
marco, excepto que el cebador incluye entre uno y cuatro, o
entre uno y tres, nucleótidos que no coinciden con la secuencia
objetivo que contiene la mutación en el microsatélite y que
10 tampoco coinciden con una secuencia correspondiente que
contiene el microsatélite de tipo salvaje. En algunas
modalidades, el cebador incluye entre uno y tres nucleótidos
que no coinciden con la secuencia objetivo que contiene la
mutación en el microsatélite y que tampoco coinciden con una
15 secuencia correspondiente que contiene el microsatélite de tipo
salvaje.

En algunas modalidades, el cebador está configurado
para aparearse a lo largo del microsatélite que tiene una
mutación de desplazamiento de marco, y con al menos un
20 nucleótido, o al menos dos nucleótidos, que flanquean el
extremo 5' y/o al menos un nucleótido que flanquea el extremo
3' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento
de marco. En algunas modalidades, el cebador está configurado
para aparearse a lo largo del microsatélite que tiene una
25 mutación de desplazamiento de marco, y con al menos dos

nucleótidos que flanquean el extremo 5' y/o al menos dos nucleótidos que flanquean el extremo 3' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco.

En algunas modalidades, el cebador consiste en entre
5 16 y 30 nucleótidos.

En algunas modalidades, al menos un nucleótido no coincidente se ubica en una posición del cebador que está configurado para aparearse en 3' cadena abajo del microsatélite o dentro del microsatélite.

10 En algunas modalidades, al menos un nucleótido no coincidente está dentro de tres o cuatro nucleótidos 5' cadena arriba o 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite.

En algunas modalidades, al menos un nucleótido no coincidente es una sustitución de una timina (T) por una
15 adenina (A), una sustitución de una adenina (A) por una guanina (G), una sustitución de una timina (T) por una citosina (C) o una sustitución de una citosina (C) por una guanina (G).

En otro aspecto de la invención, se proporciona un kit para la detección de una mutación en un microsatélite
20 contenido en una secuencia objetivo de una molécula de ADN bicatenario, en donde la mutación es un desplazamiento de marco del microsatélite en comparación con la secuencia de microsatélite de tipo salvaje correspondiente, y en donde el kit comprende un primer cebador de la invención, y un segundo
25 cebador, en donde el segundo cebador está configurado para

aparearse con la secuencia objetivo 3' cadena abajo del microsatélite en la cadena opuesta de la molécula de ADN a la cadena en donde está configurado para aparearse el primer cebador.

5 Debe entenderse que cuando se hace referencia a "3' cadena abajo" esto es con respecto al (primer) cebador, es decir, en la dirección de la extensión de la ADN polimerasa del (primer) cebador. En otras palabras, el término "3' cadena abajo" se refiere a una posición 3' en el cebador, que
10 corresponde a una posición 5' en la secuencia plantilla. Por ejemplo, la expresión "al menos un nucleótido no coincidente está ubicado en una posición del cebador que está configurado para aparearse en 3' cadena abajo del microsatélite", arriba, significa que al menos un nucleótido no coincidente está en 3'
15 cadena abajo, en el cebador, del microsatélite, es decir, 5' cadena arriba del microsatélite en la secuencia plantilla. De manera similar, debe entenderse que cuando se hace referencia al "extremo 3' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco", esto es con respecto al (primer)
20 cebador. En otras palabras, el término "extremo 3'" se refiere al extremo 3' del cebador, que corresponde al extremo 5' de la secuencia plantilla.

De manera similar, debe entenderse que, cuando se hace referencia a "5' cadena arriba", esto es con respecto al
25 (primer) cebador. Por ejemplo, la expresión "el cebador está

configurado para aparearse a lo largo del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco, y con al menos dos nucleótidos que flanquean el extremo 5' y/o al menos dos nucleótidos que flanquean el extremo 3' del microsatélite que

5 tiene una mutación de desplazamiento de marco", arriba, significa que el cebador puede aparearse con al menos dos nucleótidos que flanquean el extremo 5' del microsatélite con respecto al cebador, es decir, con al menos dos nucleótidos que flanquean el extremo 3' del microsatélite con respecto a

10 la plantilla. De manera similar, debe entenderse que cuando se hace referencia al "extremo 5' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco", esto es con respecto al (primer) cebador. En otras palabras, el término "extremo 5'" se refiere al extremo 5' del cebador, que corresponde al

15 extremo 3' de la secuencia plantilla.

En algunas modalidades, la mutación de desplazamiento de marco está en un microsatélite en el gen TGFBR2 y comprende la secuencia de acuerdo con los residuos 270 a 278 de SEC ID NO: 20, y en donde el primer cebador comprende la secuencia

20 definida por cualquiera de SEC ID NO: 3, 4, 5 o 7, y/o el segundo cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 2.

En algunas modalidades, la mutación de desplazamiento de marco está en un microsatélite en el gen ASTE1 y comprende

25 la secuencia de acuerdo con los residuos 328-337 de SEC ID NO:

32, y en donde el primer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 15 o 31, y/o el segundo cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 10.

En algunas modalidades, el kit comprende además:

5 un tercer cebador, en donde el tercer cebador está configurado para aparearse 5' cadena arriba de la región con la que el segundo cebador está configurado para aparearse, y en donde el tercer cebador está configurado para aparearse con la misma cadena que el primer cebador y la cadena opuesta con
10 el segundo cebador, u otro par de cebadores de control.

En algunas modalidades, la secuencia que contiene el microsatélite de tipo salvaje comprende la secuencia definida en SEC ID NO: 19, y preferiblemente el tercer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 1.

15 En algunas modalidades, la secuencia que contiene el microsatélite de tipo salvaje comprende la secuencia definida en SEC ID NO: 32, y preferiblemente el tercer cebador comprende la secuencia definida en SEC ID NO: 11 o SEC ID NO: 38.

En algunas modalidades, el kit comprende además los
20 componentes para llevar a cabo la amplificación de ADN, preferiblemente en donde los componentes comprenden al menos uno de: un amortiguador, dNTP y Taq-polimerasa.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un cebador para la amplificación de ADN que comprende la secuencia
25 definida por cualquiera de SEC ID NO: 3, 4, 5, 7, 15, 31, 39,

40 o 41, preferiblemente una de SEC ID NO: 3, 15, 31, 39, 40 o 41, más preferiblemente una de SEC ID NOs: 3, 15 y 31.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar una mutación en un microsatélite contenido en una secuencia objetivo de una molécula de ADN bicatenario, en donde la mutación es un desplazamiento de marco del microsatélite en comparación con la secuencia de microsatélite de tipo salvaje correspondiente, y en donde el método comprende:

10 a) proporcionar una primera alícuota de una muestra que comprenda ADN humano,

 b) añadir a la primera alícuota los componentes necesarios para la amplificación del ADN, un primer cebador y un segundo cebador; en donde el primer cebador es adecuado para la detección de una mutación en un microsatélite contenido en una secuencia objetivo de una molécula de ADN bicatenario y comprende una región de nucleótidos que es complementaria a la secuencia objetivo que contiene el microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco excepto entre uno y cuatro, o uno y tres, nucleótidos que no coinciden con la secuencia objetivo que contiene el microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco y que tampoco coinciden con una secuencia correspondiente que contiene el microsatélite de tipo salvaje y en donde el primer cebador está configurado para aparearse a lo largo de la longitud del microsatélite que tiene

15
20
25

una mutación de desplazamiento de marco y para aparear con al menos un nucleótido que flanquea el extremo 3' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco y al menos un nucleótido que flanquea el extremo 5' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco; y el segundo cebador está configurado para aparearse con la secuencia objetivo 3' cadena abajo del microsatélite, para formar una primera mezcla de reacción;

en donde el primer cebador está configurado para aparearse con la cadena en sentido de la molécula de ADN y el segundo cebador está configurado para aparearse con la cadena en antisentido de la molécula de ADN, o el primer cebador está configurado para aparearse con la cadena en antisentido de la molécula de ADN y el segundo cebador está configurado para aparearse con la cadena en sentido de la molécula de ADN,

c) llevar a cabo la amplificación del ADN en la primera mezcla de reacción,

d) detectar la presencia de la mutación de desplazamiento de marco en la muestra cuando se produzca un producto de amplificación a partir de la amplificación del ADN de la primera mezcla de reacción. En algunas modalidades, el cebador comprende entre uno y tres nucleótidos que no coinciden con la secuencia objetivo que contiene el microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco y que tampoco coinciden con una secuencia correspondiente que contiene el

microsatélite de tipo salvaje.

En algunas modalidades, el método comprende además:

a) añadir también a la primera alícuota:

I) el segundo cebador y un tercer cebador, en
5 donde el tercer cebador está configurado para aparearse 5'
cadena arriba de la región con la cual el segundo cebador está
configurado para aparearse, y en donde el tercer cebador está
configurado para aparearse con la misma cadena que el primero
cebador y la cadena opuesta al segundo cebador o

10 II) un par de cebadores de control, para formar
la primera mezcla de reacción o

b) proporcionar una segunda alícuota de la muestra
que comprenda ADN humano y agregar a la segunda alícuota los
componentes necesarios para la amplificación del ADN y:

15 I) el segundo cebador y un tercer cebador, en
donde el tercer cebador está configurado para aparearse 5'
cadena arriba de la región con la cual el segundo cebador está
configurado para aparearse, y en donde el tercer cebador está
configurado para aparearse con la misma cadena que el primero
20 cebador y la cadena opuesta al segundo cebador o

II) un par de cebadores de control, para formar
una segunda mezcla de reacción

llevar a cabo la amplificación de ADN en la mezcla
de reacción, y detectar que la amplificación de ADN se haya
25 llevado a cabo con éxito cuando se produzca un producto de

amplificación a partir de la amplificación del ADN de la segunda mezcla de reacción.

En algunas modalidades, la amplificación de ADN es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en donde la PCR
5 comprende una pluralidad de ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión.

En algunas modalidades, la mezcla de reacción comprende amortiguador 1x o 0.5x, dNTP 0.4 mM, cebador directo 0.2 μ M y cebador inverso 0.2 μ M. En algunas modalidades, la(s)
10 mezcla(s) de reacción comprende una concentración final de dNTP de 200 μ M. En algunas modalidades, la mezcla de reacción comprende, tal como concentración final, amortiguador 1x o 0.5x, dNTP 200 μ M, cebador directo 0.2 μ M y cebador inverso 0.2 μ M.

15 En algunas modalidades, el paso d) comprende además ejecutar el producto de la reacción de PCR en un gel y visualizar una banda para confirmar que la amplificación del ADN ha sido exitosa.

En algunas modalidades, el método comprende además
20 el paso f) de cortar la banda para la secuenciación del ADN.

En algunas modalidades, la mutación de desplazamiento de marco está en un microsatélite en el gen TGFBR2 y la secuencia objetivo comprende la secuencia de acuerdo con los residuos 270 a 278 de SEC ID NO: 20, y en donde el primer
25 cebador comprende la secuencia definida por cualquiera de SEC

ID NO: 3, 4, 5, 7 o 39 y/o el segundo cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 2; o la mutación de desplazamiento de marco está en un microsatélite en el gen ASTE1 y la secuencia objetivo comprende la secuencia de acuerdo con los residuos 328-337 de SEC ID NO: 33, y en donde el primer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 15, 31, 40 o 41, y/o el segundo cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 10.

En algunas modalidades, el microsatélite está en un gen TGFBR2, la secuencia que comprende el microsatélite de tipo salvaje consiste en la secuencia de acuerdo con SEC ID NO: 19, y en donde el tercer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 1; o el microsatélite está en un gen ASTE1, la secuencia que comprende el microsatélite de tipo salvaje comprende la secuencia de acuerdo con SEC ID NO: 32, y en donde el tercer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 11 o SEC ID NO: 38.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad asociada con una mutación de desplazamiento de marco de lectura en un microsatélite, que comprende llevar a cabo el método para detectar una mutación en un microsatélite de acuerdo con la invención.

En algunas modalidades, el método comprende además determinar que un paciente que padezca una enfermedad o

trastorno asociado con una mutación en el marco de lectura sea adecuado para un tratamiento dirigido a la mutación en el marco de lectura si la mutación en el marco de lectura se detecta en el paso d) en una muestra del paciente.

5 En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno asociado con una mutación de desplazamiento de marco es un cáncer.

 En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es cáncer colorrectal o cáncer gástrico, y el tratamiento dirigido
10 a la mutación de desplazamiento de marco es FMPV-1, en donde la mutación de desplazamiento de marco está en un microsatélite en el gen TGFBR2 y comprende la secuencia de acuerdo con los residuos 270 a 278 de SEC ID NO: 20; o la enfermedad o trastorno es cáncer de endometrio o cáncer gástrico y el tratamiento
15 dirigido a la mutación de desplazamiento de marco es FMPV-2, y la mutación de desplazamiento de marco está en un microsatélite en el gen ASTE1 y comprende la secuencia de acuerdo con los residuos 328 a 337 de SEC ID NO: 33.

 En algunas modalidades, el método comprende además
20 el paso e) de tratar al paciente con FMPV-1 o FMPV-2.

 En algunas modalidades, el microsatélite está en un gen TGFBR2, la secuencia que comprende el microsatélite de tipo salvaje comprende la secuencia de acuerdo con SEC ID NO: 19, y el tercer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID
25 NO: 1.

En algunas modalidades, el microsatélite está en un gen ASTE1, la secuencia que comprende el microsatélite de tipo salvaje comprende la secuencia de acuerdo con SEC ID NO: 32, y el tercer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 11 o SEC ID NO: 38.

En algunas modalidades, el primer cebador comprende la secuencia definida por cualquiera de SEC ID NO: 3, 4, 5, 7 o 39, y/o el segundo cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 2; o el primer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 15, 31, 40 o 41, y/o el segundo cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 10.

En algunas modalidades, la muestra es una biopsia líquida que comprende ADN libre de células, preferiblemente en donde la biopsia líquida es plasma.

En algunas modalidades, la amplificación de ADN es PCR, y la PCR se lleva a cabo en condiciones de alta rigurosidad, opcionalmente en donde las condiciones de alta rigurosidad comprenden al menos uno de:

a) llevar a cabo el paso de hibridación de PCR a una temperatura que es al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9° C o 10 °C más alta que la temperatura de apareamiento recomendada de la reacción;

b) llevar a cabo el paso de hibridación de PCR durante sólo 30 segundos, preferiblemente 15 segundos, por ciclo;

c) llevar a cabo la amplificación del ADN en una

concentración de amortiguador inferior a 0.1X, 0.2X, 0.3X, 0.4X, 0.5X, 0.6X o 0.75X;

d) llevar a cabo la amplificación del ADN en un amortiguador que comprenda iones de amonio; y

5 e) llevar a cabo 25, 20, 15 o 10 ciclos de PCR, o menos de 25, menos de 20, menos de 15 o menos de 10 ciclos de PCR.

En algunas modalidades, el amortiguador incluye iones de amonio (NH_4^+).

10 En algunas modalidades, el amortiguador incluye iones de amonio (NH_4^+) y está en una concentración de 1X.

En algunas modalidades, el amortiguador es un amortiguador Key 1X.

Definiciones

15 En esta descripción, los siguientes términos pueden entenderse como sigue:

Los términos "gen", "polinucleótidos" y "moléculas de ácido nucleico" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de múltiples
20 nucleótidos. Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender ácidos nucleicos naturales (es decir, ADN o ARN) o pueden comprender ácidos nucleicos artificiales tales como ácidos nucleicos peptídicos, morfolina y ácidos nucleicos bloqueados, así como ácidos nucleicos de glicol y ácidos nucleicos de
25 treosa.

El término "nucleótido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a nucleótidos de origen natural y análogos de nucleótidos sintéticos que son reconocidos por enzimas celulares.

5 La frase "condiciones de alta rigurosidad" significa condiciones que sólo permiten una amplificación exitosa del ADN cuando existe un nivel muy alto de coincidencia con la secuencia objetivo. En otras palabras, las condiciones son subóptimas para la amplificación del ADN, de manera que los
10 cebadores con menor coincidencia de secuencia con la secuencia objetivo no pueden aparearse. Estas condiciones subóptimas pueden generarse alterando uno o más de la temperatura, el número de ciclos, la fuerza iónica y la presencia de ciertos disolventes orgánicos que permiten el emparejamiento de
15 secuencias de ácidos nucleicos. A continuación, se proporcionan más detalles sobre las condiciones de alta rigurosidad. En particular, las condiciones de alta rigurosidad pueden incluir que el paso de hibridación de la PCR se lleve a cabo a una temperatura que es al menos un 2%, un 5% o un 10% mayor que la
20 temperatura de hibridación recomendada de la reacción. Como alternativa, el paso de hibridación de la PCR se lleva a cabo a una temperatura que está al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C o 10 °C por encima de la temperatura de apareamiento recomendada de la reacción. En algunas
25 modalidades, el paso de hibridación de la PCR se lleva a cabo

a una temperatura que es 4 °C superior a la temperatura de hibridación recomendada de la reacción. Por ejemplo, el paso de apareamiento se puede llevar a cabo a entre 44 °C y 61 °C o 62 °C, como se detalla más adelante. El paso de apareamiento
5 puede llevarse a cabo en forma adicional o como alternativa durante un período más corto que el recomendado para la reacción, por ejemplo, el paso de apareamiento puede reducirse de 45 segundos a 30 segundos o 15 segundos. De manera adicional o como alternativa, las condiciones de alta rigurosidad pueden
10 incluir el uso de una concentración de amortiguador más baja que la recomendada para la reacción, tal como 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% o 75% de la concentración recomendada de un amortiguador en una reacción, en particular la concentración de amortiguador puede ser inferior a 0.1X, 0.2X, 0.3X, 0.4X,
15 0.5X, 0.6X o 0.75X. De manera adicional o como alternativa, las condiciones de alta rigurosidad pueden incluir el uso de un amortiguador más riguroso en la reacción, tal como un amortiguador que incluya iones de amonio (NH_4^+), por ejemplo, amortiguador Key. Se puede usar un amortiguador más estricto a
20 una concentración de 1X. En algunas modalidades, se usa el amortiguador Key 1X. De manera adicional o como alternativa, las condiciones de alta rigurosidad pueden incluir reducir el número de ciclos en una PCR, tal como llevar a cabo 25 ciclos, 20 ciclos, 15 ciclos o incluso 10 ciclos, en comparación con
25 30, 35 o 40 ciclos. En algunas modalidades, se llevan a cabo

30 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos o 10 o menos ciclos de PCR. Se puede usar una o más de las condiciones anteriores.

El término "desplazamiento de marco" significa una
5 mutación genética causada por una eliminación o inserción en una secuencia de ADN que provoca un cambio en la secuencia, lo que significa que los nucleótidos se agrupan en una serie diferente de codones, lo que da como resultado que se traduzca una proteína diferente a partir de esta secuencia. En muchos
10 casos, el desplazamiento de marco puede provocar un codón de parada prematuro en la secuencia de proteínas, lo que da como resultado una secuencia de proteínas truncada. Por ejemplo, una de esas mutaciones de desplazamiento de marco en TGFBR2 es la eliminación de una sola adenina, lo que significa que una
15 secuencia de 10 adeninas (a10; que es un microsatélite) se reduce a 9 adeninas (a9). La secuencia de TGFBR2 de tipo salvaje se muestra en SEC ID NO: 34 y la secuencia de a9 TGFBR2 se muestra en SEC ID NO: 35. Otro desplazamiento de marco de este tipo es la eliminación de una sola adenina en ASTE1, lo que
20 significa que una secuencia de 11 adeninas (a11; que es un microsatélite) se reduce a 10 adeninas (a10). La secuencia de ASTE1 de tipo salvaje se muestra en SEC ID NO: 36 y la secuencia de a10 ASTE1 se muestra en SEC ID NO: 37.

El término "microsatélite" significa una región de
25 ADN en donde se repite una secuencia, normalmente entre 5 y 50

veces. Los microsatélites también pueden ser particularmente vulnerables a la mutación. Los microsatélites también pueden denominarse "repeticiones cortas en tándem (STR, por sus siglas en inglés)". Los microsatélites pueden ser una serie repetida de un único nucleótido como A, G, C o T, o pueden ser una serie repetida de un motivo más largo, tal como TA (repetición de dinucleótido) o GTC (repetición de trinucleótido).

Como es bien conocido en biología molecular, la guanina (G) y la citosina (C), y la adenina (A) y la timina (T), son nucleótidos complementarios y, por tanto, se emparejarán, por ejemplo, durante la replicación del ADN. En la presente invención, un nucleótido "no coincidente" o "no coincidente" puede ser una eliminación de un nucleótido complementario, una adición de un nucleótido o una sustitución de un nucleótido complementario por un nucleótido no complementario (es decir, no coincidente). Por ejemplo, una falta de coincidencia con una guanina objetivo (G) puede ser una adenina (A), una timina (T) u otra guanina (G), pero no una citosina (C). En particular, cuando una mutación de desplazamiento de marco provoca un aumento en la longitud del microsatélite, entonces una adición de un nucleótido es particularmente útil para distinguir el microsatélite mutado por desplazamiento del marco del microsatélite de tipo salvaje. Por el contrario, cuando una mutación de desplazamiento de marco causa una disminución en la longitud del microsatélite,

entonces una eliminación de un nucleótido es particularmente útil para distinguir el microsatélite mutado por desplazamiento de marco del microsatélite de tipo salvaje. En un ejemplo, esta eliminación es una eliminación de un único nucleótido de una
5 secuencia de microsatélites.

Nuevamente, como es bien conocido en el campo de la biología molecular, en los humanos el ADN está formado por una hélice de ADN bicatenario formada por dos cadenas, una en sentido y una en antisentido. Por lo tanto, el experto conocerá
10 el término "cadena en sentido" como la cadena codificante, que lleva nucleótidos transcribibles en una dirección 5' a 3', y el experto conocerá el término "cadena en antisentido" como una cadena que tiene una secuencia complementaria inversa a la cadena codificante en una dirección de 5' a 3', y que es la
15 plantilla para la transcripción del ARNm.

El término "cebador" se refiere a una secuencia corta de ADN monocatenario que se usa para iniciar la amplificación de ADN dirigida. Normalmente tiene una longitud de entre 18 y 24 bases, pero en algunas modalidades es más corta o más larga
20 que esta longitud típica. Un "par de cebadores" son dos de esos cebadores que provocan la amplificación del ADN de una secuencia objetivo específica que se encuentra entre los sitios de hibridación de estos dos cebadores.

El término "tratar" se refiere a cualquier
25 tratamiento parcial o completo e incluye: inhibir la enfermedad

o síntoma, es decir, detener su desarrollo; y aliviar la enfermedad o síntoma, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o síntoma.

Breve Descripción de las Figuras

5 Las **figuras 1A-1B** muestran dos geles de electroforesis de los productos de reacciones de PCR llevadas a cabo en ADN molde de TGFBR2 de microsatélite 10a (es decir, de tipo salvaje) usando el par de cebadores P1 y P2 usando diferentes cantidades de ADN molde. La figura 1A muestra resultados con cantidades crecientes de ADN molde en nanogramos (ng) y la figura 1B muestra resultados con cantidades crecientes de ADN molde en pictogramas (pg).

La **figura 2** muestra un gel de electroforesis de los productos de reacciones de PCR llevadas a cabo en ADN molde de TGFBR2 microsatélite 9a (es decir, mutante) y ADN molde de TGFBR2 microsatélite 10a (es decir, tipo salvaje) para los cebadores P1 y P4 en combinación con el cebador P2, a una condición más rigurosa usando una temperatura de apareamiento de 53 °C y un número de ciclos reducido (25).

20 La **figura 3** muestra un gel de electroforesis de los productos de reacciones de PCR llevadas a cabo en ADN molde de TGFBR2 de microsatélite 9a (es decir, mutante) y ADN molde de TGFBR2 de microsatélite 10a (es decir, tipo salvaje) para el par de cebadores P4 y P2 en unas condiciones aún más rigurosas usando una temperatura de apareamiento de 55 °C.

La **figura 4** muestra un gel de electroforesis de los productos de reacciones de PCR llevadas a cabo en ADN molde de TGFBR2 de microsatélite 9a (es decir, mutante) y ADN molde de TGFBR2 de microsatélite 10a (es decir, tipo salvaje) para los
5 cebadores P6 y P10 en combinación con el cebador P2. En particular, las bandas indicadas con un asterisco (*) eran las de productos de una reacción de PCR llevada a cabo a una concentración de amortiguador baja.

Las **figuras 5A-5C** muestran tres geles de
10 electroforesis de los productos de reacciones de PCR llevadas a cabo en ADN plantilla del microsatélite TGFBR2 9a (es decir, mutante) para los cebadores P4, P6 y P10 en combinación con el cebador P2 (así como el cebador P1 en combinación con el cebador P2 como control positivo) en condiciones de PCR cada vez más
15 rigurosas. Las reacciones de la figura 5A se llevaron a cabo a una temperatura de apareamiento de 55 °C durante 30 ciclos. Las reacciones de la figura 5B se llevaron a cabo a una temperatura de apareamiento de 56 °C durante 25 ciclos. Las reacciones de la figura 5C se llevaron a cabo a una temperatura
20 de apareamiento de 58 °C durante 25 ciclos. Nuevamente, las bandas indicadas con un asterisco (*) eran las de productos de una reacción de PCR llevada a cabo a una concentración de amortiguador baja.

Las **figuras 6A-6B** muestran dos geles de
25 electroforesis de los productos de reacciones de PCR llevadas

a cabo en ADN molde de TGFBR2 de microsatélite 9a (es decir, mutante) y ADN molde de TGFBR2 de microsatélite 10a (es decir, tipo salvaje) para los cebadores P1, P6 y P10 en combinación con el cebador P2. En particular, las bandas indicadas con un asterisco (*) eran las de productos de una reacción de PCR
5 llevada a cabo a una concentración de amortiguador baja. Las reacciones de la figura 6A se llevaron a cabo con pares de cebadores y las reacciones de la figura 6B se llevaron a cabo con tres cebadores.

10 La **figura 7** muestra un gel de electroforesis de los productos de reacciones de PCR llevadas a cabo en ADN molde de TGFBR2 de microsatélite 9a (es decir, mutante) y ADN molde de TGFBR2 de microsatélite 10a (es decir, tipo salvaje) para los cebadores P1, P4 y P10 en combinación con el cebador P2. Esto
15 incluye tres reacciones de cebador que incluyen tanto los cebadores P1 y P2 como también el cebador P4 o P10.

La **figura 8** muestra un gel de electroforesis de los productos de reacciones de PCR llevadas a cabo en ADN molde de microsatélite TGFBR2 9a (es decir, mutante) y ADN molde de
20 microsatélite TGFBR2 10a (es decir, tipo salvaje) para cada una de las combinaciones de cebadores enumeradas, lo que demuestra que todos estos cebadores son funcional.

Las **figuras 9A-9B** muestran dos geles de electroforesis de los productos de reacciones de PCR llevadas
25 a cabo en ADN plantilla de microsatélite TGFBR2 9a (es decir,

mutante) para los cebadores P1, P4.1, P4.2 y P10.1, en donde las reacciones de PCR se han llevado a cabo en amortiguador Taq (KCl) estándar o amortiguador Key (que contiene iones de amonio, NH_4^+). Las reacciones de la figura 9A se llevaron a
5 cabo a una temperatura de apareamiento de 56 °C y las reacciones de la figura 9B se llevaron a cabo a una temperatura de apareamiento de 58 °C.

Las **figuras 10A-10B** muestran una electroforesis en gel de las reacciones de PCR llevadas a cabo en ADN molde de
10 TGFBR2 de microsatélite 9a (es decir, mutante) y ADN molde de TGFBR2 de microsatélite 10a (es decir, tipo salvaje) para los cebadores P4, P4.1, P4.2 y P6 en combinación con el cebador P2. Las reacciones de la figura 10A se llevaron a cabo usando amortiguador Taq estándar y las reacciones de la figura 10B se
15 llevaron a cabo usando amortiguador Key (que comprende amonio, NH_4^+).

Las **figuras 11A-11B** muestran una electroforesis en gel de las reacciones de PCR llevadas a cabo en ADN molde de TGFBR2 microsatélite 9a (es decir, mutante) y ADN molde de
20 TGFBR2 microsatélite 10a (es decir, tipo salvaje) para los cebadores P4, P4.1, P4.2 y P6 en combinación con el cebador P2. Las reacciones en la figura 11A se llevaron a cabo usando amortiguador Taq estándar (que no comprende amonio), y las reacciones en la figura 11B se llevaron a cabo usando
25 amortiguador Key (que comprende amonio, NH_4^+).

La **figura 12** muestra los resultados de la detección de ADNcf de TGFBR2 de pacientes con MSI-CRC y CRC estable con microsatélites (MSS-CRC) usando cebadores que definen un fragmento de TGFBR2 que comprende el microsatélite a10/a9.
5 ¹cebador diseñado para la detección del microsatélite TGFbR2 a9 (mutante); ²cebadores de control para la detección de microsatélites TGFbR2 a9 y a10.

La **figura 13** muestra un gel de electroforesis de los productos de reacciones de PCR llevadas a cabo en ADN molde de
10 TGFBR2 microsatélite 9a (es decir, mutante, F1) y ADN molde de TGFBR2 microsatélite 10a (es decir, tipo salvaje, F2) usando los cebadores P2 y P4 a diferentes temperaturas de hibridación.

Las **figuras 14A-14B** muestran un gel de electroforesis de los productos de reacciones de PCR llevadas a cabo en (figura
15 14A) ADN molde de TGFBR2 microsatélite 9a (es decir, mutante, F1) y (figura 14B) ADN molde de TGFBR2 microsatélite 10a (es decir, tipo salvaje, F2) usando los cebadores P2 y P4 en diferentes temperaturas de apareamiento.

La **figura 15** muestra un gel de electroforesis de los
20 productos de reacciones de PCR llevadas a cabo usando el cebador P4 en ADN molde de TGFBR2 microsatélite 9a (es decir, mutante, F1) y ADN molde de TGFBR2 microsatélite 10a (es decir, tipo salvaje, F2) usando amortiguador Taq (KCl) estándar usando una temperatura de apareamiento de 57 °C. El cebador P2 fue el
25 cebador directo para todas las reacciones y el cebador P1 fue

el cebador inverso del control positivo.

Las **figuras 16A-16B** muestran un gel de electroforesis de los productos de reacciones de PCR llevadas a cabo con los cebadores P11 y P16 en (figura 16A) ADN molde de ASTE1
5 microsatélite 10a (es decir, mutante, F3) y (figura 16B) ADN molde de ASTE1 microsatélite 11a (es decir, tipo salvaje, F4), usando una gama de temperaturas de apareamiento.

Las **figuras 17A-17B** muestran geles de electroforesis de los productos de reacciones de PCR llevadas a cabo con el
10 cebador P24 en (figura 17A) ADN molde ASTE1 de 10 microsatélites (es decir, mutante, F3, denominado "M" en los geles) y (figura 17B) ADN molde ASTE1 de 11a microsatélites (es decir, tipo salvaje, F4, denominado "Wt" en los geles), usando un intervalo de temperaturas de apareamiento.

15 Las **figuras 18A-18B** muestran geles de electroforesis de los productos de reacciones de PCR llevadas a cabo con el cebador P12 en (figura 18A) ADN molde ASTE1 de 10 microsatélites (es decir, mutante, F3, denominado "M" en los geles) y (figura 18B) ASTE1 de microsatélite 11a. ADN molde
20 (es decir, tipo salvaje, F4, denominado "Wt" en los geles), usando un intervalo de temperaturas de apareamiento.

Descripción Detallada de la Invención

En vista de lo anterior, existe la necesidad de desarrollar una herramienta para la detección específica de
25 mutaciones de desplazamiento de marco que puedan ser relevantes

en la enfermedad, tal como una mutación de desplazamiento de marco en el microsatélite de TGFBR2 o ASTE1. Existe una necesidad adicional de que esta herramienta sea adecuada para la detección de ADN libre de células (ADNcf) en biopsias
5 líquidas (por ejemplo, plasma).

Por lo tanto, en un primer aspecto de la invención se proporciona un cebador para la detección de una mutación en un microsatélite contenido en una secuencia objetivo de una molécula de ADN bicatenario, en donde la mutación es un
10 desplazamiento del marco de lectura del microsatélite en comparación con la secuencia de microsatélite tipo salvaje correspondiente, y en donde el cebador comprende una región de al menos 10 nucleótidos que es complementaria a la secuencia objetivo de la cadena en antisentido o en sentido de la molécula
15 de ADN que contiene el microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco, excepto que el cebador incluye entre uno y cuatro, o entre uno y tres, nucleótidos que no coinciden con la secuencia objetivo que contiene la mutación en el microsatélite y que tampoco coinciden con una secuencia
20 correspondiente que contiene el microsatélite de tipo salvaje. En algunas modalidades, el cebador incluye entre uno y tres nucleótidos que no coinciden con la secuencia objetivo que contiene la mutación en el microsatélite y que tampoco coinciden con una secuencia correspondiente que contiene el
25 microsatélite de tipo salvaje.

Como se describe en el presente documento, existen muchos microsatélites en los que pueden ocurrir mutaciones de desplazamiento de marco relevantes para la enfermedad. Por ejemplo, el desplazamiento de marco puede ocurrir en un
5 microsatélite en cualquier gen seleccionado de ASTE1, ACVR22, TAF1B, KIAA2018, SLC22A9 y TGFBR2. En algunas modalidades, el desplazamiento de marco es en un microsatélite en TGFBR2 o ASTE1.

En algunas modalidades, el cebador está configurado
10 para aparearse a lo largo del microsatélite que tenga una mutación de desplazamiento del marco de lectura y con al menos un nucleótido, o al menos dos nucleótidos, que flanquean el extremo 5' del microsatélite y/o al menos un nucleótido que flanquea el extremo 3' del microsatélite que tiene una mutación
15 de desplazamiento de marco. En algunas modalidades, el cebador está configurado para aparearse a lo largo del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco y con al menos dos nucleótidos que flanquean el extremo 5' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco
20 y/o al menos dos nucleótidos que flanquean el extremo 3' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco. El cebador puede aparearse con al menos tres, cuatro o cinco nucleótidos que flanqueen uno o ambos extremos del microsatélite que tenga una mutación de desplazamiento de
25 marco.

Debe entenderse que cuando se hace referencia a "se aparea a lo largo de la longitud del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco", esto significa que el cebador se aparea con la secuencia objetivo al menos durante
5 toda la longitud del microsatélite en la secuencia objetivo (que tiene una mutación de desplazamiento de marco). Por ejemplo, cuando la secuencia objetivo es a9 TGFBR2, el cebador se aparea con la secuencia objetivo en toda la longitud del microsatélite a9. Cuando la secuencia objetivo es a10 ASTE1,
10 el cebador se aparea con la secuencia objetivo en toda la longitud del microsatélite a10.

En algunas modalidades, el cebador no se aparea a lo largo de la correspondiente secuencia de microsatélite de tipo salvaje, y el extremo 3' del cebador no se aparea con la
15 secuencia correspondiente que contiene el microsatélite de tipo salvaje. Esto proporciona la ventaja de que el cebador se aparea con la secuencia que contiene el microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco, pero no se aparea con la secuencia correspondiente que tiene el microsatélite de tipo
20 salvaje.

En algunas modalidades, el cebador se aparea con entre 1 y 15, preferiblemente entre 1 y 13, nucleótidos que flanquean el extremo 3' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco (es decir, el cebador
25 comprende entre 1 y 15, preferiblemente entre 1 y 13,

nucleótidos 3' del microsatélite, con respecto al cebador, que se aparean con la secuencia correspondiente que comprende el microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco). En algunas modalidades, el cebador se aparean con uno, dos, tres, cinco o trece, preferiblemente uno, dos o trece, nucleótidos que flanquean el extremo 3' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco (es decir, el cebador comprende uno, dos, tres, cinco o trece, preferiblemente uno, dos o trece, nucleótidos 3' del microsatélite, con respecto al cebador, que se aparean con la secuencia correspondiente que comprende el microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco). En algunas modalidades, el cebador se aparean con dos o tres nucleótidos que flanquean el extremo 3' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento del marco de lectura y en algunas modalidades estos dos o tres nucleótidos forman una abrazadera de GC. En algunas modalidades, el cebador se aparean a lo largo del microsatélite que tiene la mutación de desplazamiento de marco y, en 3' del microsatélite que tiene la mutación de desplazamiento de marco, con respecto al cebador, el cebador comprende o consiste en dos, tres, cinco o trece, preferiblemente uno, dos, cinco o trece nucleótidos que se aparean con los nucleótidos que flanquean el microsatélite que tiene la mutación de desplazamiento de marco. Esto proporciona la ventaja de que el cebador apareado con la secuencia que

contiene el microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco se puede extender en la dirección de 5' a 3', permitiendo así la replicación de la secuencia que contiene el microsatélite que tiene la mutación de desplazamiento de marco. En algunas modalidades, el cebador se aparea con uno, dos, tres o cinco nucleótidos que flanquean el extremo 3' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco y la mutación de desplazamiento de marco está en un microsatélite en TGFBR2. En algunas modalidades, el cebador se aparea con dos, tres o trece, preferiblemente dos o trece, nucleótidos que flanquean el extremo 3' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco y la mutación de desplazamiento de marco está en un microsatélite en ASTE1.

En algunas modalidades, el cebador se aparea con al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos que flanquean el extremo 5' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco, con respecto a la cartilla. En algunas modalidades, el cebador se aparea con 1, 8 o 12 nucleótidos que flanquean el extremo 5' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco, con respecto al cebador. El cebador puede aparearse con cualquiera de los números de nucleótidos detallados anteriormente que flanqueen el extremo 3' del microsatélite que tenga una mutación de desplazamiento de marco.

En algunas modalidades, el cebador está configurado para aparearse con al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 5 o al menos 12 nucleótidos que flanqueen el extremo 5' del microsatélite que tenga una mutación de desplazamiento de marco y con al menos 2, al menos al menos 3 o al menos 13 nucleótidos que flanqueen el extremo 3' del microsatélite que tenga una mutación de desplazamiento de marco. En algunas modalidades, el cebador está configurado para aparearse con 1, 8 o 12 nucleótidos que flanqueen el extremo 5' del microsatélite que tenga una mutación de desplazamiento de marco y para aparearse con al menos 2, al menos 3 o al menos 13, preferiblemente con 2, 3, 5 o 13 nucleótidos que flanqueen el extremo 3' del microsatélite tenga una mutación de desplazamiento de marco. En algunas modalidades, el cebador está configurado para aparearse con 12 nucleótidos que flanqueen el extremo 5' del microsatélite que tenga una mutación de desplazamiento de marco y con 2 nucleótidos que flanqueen el extremo 3' del microsatélite que tenga una mutación de desplazamiento de marco, con 8 nucleótidos que flanqueen el extremo 5' del microsatélite que tenga una mutación de desplazamiento de marco y con 5 nucleótidos que flanqueen el extremo 3' del microsatélite que tenga una mutación de desplazamiento de marco, con 12 nucleótidos que flanqueen el extremo 5' del microsatélite que tenga una mutación de desplazamiento de marco y con 1 nucleótido que flanquee el extremo 3' del microsatélite

que tenga una mutación de desplazamiento de marco, o con 1
nucleótido que flanquee el extremo 5' del microsatélite que
tenga una mutación de desplazamiento de marco y con 13
nucleótidos que flanqueen el extremo 3' del microsatélite que
5 tenga una mutación de desplazamiento de marco.

En algunas modalidades, al menos el 30%, 35%, 40%,
45%, 50%, 55%, 60% o 65% de los nucleótidos del cebador se
aparean con los nucleótidos que flanquean el extremo 5' del
microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de
10 marco, con respecto al cebador. En otras palabras, al menos el
30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% o 65% de los nucleótidos que
componen el cebador se aparean con los nucleótidos que
flanquean el extremo 5' del microsatélite que tiene una
mutación de desplazamiento de marco de lectura con respecto al
15 cebador (es decir, flanqueando el extremo 3' del microsatélite
que tiene una mutación de desplazamiento de marco con respecto
a la secuencia objetivo). En algunas modalidades, la parte del
cebador que se aparea con los nucleótidos que flanquean el
extremo 5' del microsatélite que tiene una mutación de
20 desplazamiento de marco, con respecto al cebador, también se
aparea con la secuencia correspondiente que contiene el
microsatélite de tipo salvaje. Esto proporciona la ventaja de
que el cebador es específico para la secuencia objetivo
deseada. En algunas modalidades, al menos el 50% de los
25 nucleótidos del cebador se aparean con los nucleótidos que

flanquean el extremo 5' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento del marco de lectura con respecto al cebador (es decir, se aparean con los nucleótidos que flanquean el extremo 3' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco de lectura con respecto a la secuencia objetivo).

En algunas modalidades, los nucleótidos del cebador que se aparean con los nucleótidos que flanquean el extremo 5' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco, con respecto al cebador, son 100% complementarios con los nucleótidos correspondientes en la secuencia objetivo que tiene la mutación de desplazamiento de marco en el microsatélite. Esto proporciona la ventaja de que el cebador es específico de la secuencia objetivo.

En algunas modalidades, el cebador consiste en entre 16 y 30 nucleótidos. Preferiblemente, el cebador consiste en entre 16 y 25 nucleótidos o entre 16 y 24 nucleótidos. Preferiblemente aún, el cebador consiste en entre 17 y 24, o de entre 17 y 23 nucleótidos.

En algunas modalidades, el cebador está aislado o es recombinante. En algunas modalidades, el cebador tiene menos de 50, 30 o 20 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, el cebador consiste en 22, 23 o 24 nucleótidos.

En algunas modalidades, la secuencia de

microsatélites de tipo salvaje es una secuencia de ADN genómico humano.

En algunas modalidades, el cebador comprende 1, 2, 3 o 4 nucleótidos que no coinciden con la secuencia objetivo que contiene la mutación en el microsatélite y que tampoco coinciden con una secuencia correspondiente que contiene el microsatélite de tipo salvaje. Esto significa que el cebador contiene entre 1 y 4 de estas no coincidencias, pero no más de 4 de estas no coincidencias. En algunas modalidades, al menos un nucleótido no coincidente se ubica en una posición del cebador que se aparea en 3' cadena abajo del microsatélite o dentro del microsatélite. En algunas modalidades, al menos un nucleótido no coincidente está ubicado en una posición del cebador que se aparea en 3' cadena abajo del microsatélite y al menos un nucleótido no coincidente está ubicado dentro del microsatélite, con respecto al cebador. En algunas modalidades, el cebador tiene solo un nucleótido no coincidente, que está ubicado en una posición del cebador que se aparea en 3' cadena abajo del microsatélite. En algunas modalidades, el cebador tiene un nucleótido no coincidente ubicado en una posición del cebador que se aparea en 3' cadena abajo del microsatélite y dos nucleótidos no coincidentes ubicados dentro del microsatélite. En algunas modalidades, el cebador tiene un nucleótido no coincidente ubicado en una posición del cebador que se aparea en 3' cadena abajo del microsatélite y un

nucleótido no coincidente ubicado dentro del microsatélite, con respecto al cebador. En algunas modalidades, el cebador tiene tres nucleótidos no coincidentes ubicados dentro del microsatélite, con respecto al cebador. En algunas modalidades, el cebador tiene un nucleótido no coincidente ubicado dentro del microsatélite y dos nucleótidos no coincidentes ubicados en una posición del cebador que se aparea en 3' cadena abajo del microsatélite, con respecto al cebador. En algunas modalidades, todos los nucleótidos no coincidentes están ubicados en una posición del cebador que se aparea en 3' cadena abajo del microsatélite o dentro del microsatélite. En algunas modalidades, todos los nucleótidos no coincidentes están ubicados en una posición del cebador que se aparea dentro del microsatélite.

En algunas modalidades, al menos un nucleótido no coincidente está dentro de tres nucleótidos 5' cadena arriba o 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite con respecto al cebador. En algunas modalidades, al menos un nucleótido no coincidente está dentro de cinco nucleótidos 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite, con respecto al cebador. Preferiblemente, todos los nucleótidos no coincidentes están dentro de tres nucleótidos 5' cadena arriba o 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite con respecto al cebador.

Cada uno de los errores de coincidencia en el cebador puede ser una sustitución de nucleótidos de cualquier

nucleótido (por ejemplo, A, T, C o G) que no coincida con el nucleótido correspondiente en la secuencia objetivo y la secuencia de tipo natural. En algunas modalidades, al menos un nucleótido no coincidente es una sustitución de una timina (T) por una adenina (A), una sustitución de una adenina (A) por una guanina (G), una sustitución de una timina (T) por una citosina (C), o una sustitución de una citosina (C) por una guanina (G).

En algunas modalidades, el cebador tiene un nucleótido no coincidente en el segundo nucleótido 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite, con respecto al cebador. La falta de coincidencia es una sustitución de cualquier nucleótido que no coincide con el nucleótido correspondiente en la secuencia objetivo y la secuencia de tipo salvaje y, en algunas modalidades, el nucleótido no coincidente es G, A o T, preferiblemente G. En algunas modalidades, el cebador tiene un nucleótido no coincidente en el segundo nucleótido 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite y en el primer nucleótido 5' cadena arriba del extremo 3' del microsatélite, con respecto al cebador. En estas modalidades, el segundo nucleótido 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite puede ser G, A o T, preferiblemente G, y el primer nucleótido 5' cadena arriba del extremo 3' del microsatélite puede ser G, C o A, preferiblemente C o A. En algunas modalidades, el cebador tiene un nucleótido no

coincidente en el segundo nucleótido 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite, en el primer nucleótido 5' cadena arriba del extremo 3' del microsatélite y en el segundo nucleótido 5' cadena arriba del extremo 3' del microsatélite, con respecto al microsatélite. En estas modalidades, el segundo nucleótido 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite puede ser G, A o T, preferiblemente G, el primer nucleótido 5' cadena arriba del extremo 3' del microsatélite puede ser G, C o A, preferiblemente C y el segundo nucleótido 5' cadena arriba del extremo 3' del microsatélite puede ser G, C o A, preferiblemente A. En algunas modalidades, el cebador tiene un nucleótido no coincidente en el segundo nucleótido 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite y en el segundo nucleótido 5' cadena arriba del extremo 3' del microsatélite, con respecto al cebador. En estas modalidades, el segundo nucleótido 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite puede ser G, A o T, preferiblemente G, y el segundo nucleótido 5' cadena arriba del extremo 3' del microsatélite puede ser G, C o A, preferiblemente A. En algunas modalidades, el cebador tiene un nucleótido no coincidente en el segundo nucleótido 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite, en el segundo nucleótido 5' cadena arriba del extremo 3' del microsatélite y en el cuarto nucleótido 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite, con respecto al cebador. En estas modalidades, el segundo nucleótido 3' cadena abajo del extremo 3' del

microsatélite puede ser G, A o T, preferiblemente G, el segundo nucleótido 5' cadena arriba del extremo 3' del microsatélite puede ser G, C o A, preferiblemente A, y el cuarto nucleótido 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite puede ser A, G o C, preferiblemente C.

En algunas modalidades, el cebador tiene solo una no coincidencia, que está en el segundo nucleótido 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite, con respecto al cebador, y preferiblemente el segundo nucleótido 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite es G. En algunas modalidades, el cebador comprende o consiste en la secuencia de SEC ID NO: 39, en donde X es A, G o T. En algunas modalidades, el cebador comprende o consiste en la secuencia de SEC ID NO: 3.

En algunas modalidades, el cebador tiene nucleótidos no coincidentes en el primer, tercer y cuarto nucleótidos 5' cadena arriba del extremo 3' del microsatélite, con respecto al cebador. La falta de coincidencia es una sustitución de cualquier nucleótido que no coincide con el nucleótido correspondiente en la secuencia objetivo y la secuencia de tipo salvaje. En algunas modalidades, el cebador tiene solo tres nucleótidos no coincidentes, que están en el primer, tercer y cuarto nucleótidos 5' cadena arriba del extremo 3' del microsatélite, con respecto al cebador. En estas modalidades, se prefiere que el primer nucleótido 5' cadena arriba del extremo 3' del microsatélite sea C, el tercer nucleótido 5'

cadena arriba del extremo 3' del microsatélite sea A, y el
cuarto nucleótido 5' cadena arriba del extremo 3' del
microsatélite sea A. En algunas modalidades, el cebador
comprende o consiste en la secuencia de SEC ID NO: 40, en donde
5 cada uno de X_1 , X_2 y X_3 , independientemente, es A, C o G. En
algunas modalidades, el cebador comprende o consiste en la
secuencia de SEC ID NO: 15.

En algunas modalidades, el cebador tiene nucleótidos
no coincidentes en el segundo nucleótido 5' cadena arriba del
10 extremo 3' del microsatélite, con respecto al cebador, y en el
quinto y duodécimo nucleótidos 3' cadena abajo del extremo 3'
del microsatélite con respecto al cebador. En algunas
modalidades, el cebador tiene solo tres nucleótidos no
coincidentes, que están en el segundo nucleótido 5' cadena
15 arriba del extremo 3' del microsatélite y en el quinto y
duodécimo nucleótidos 3' cadena abajo del extremo 3' del
microsatélite. En estas modalidades, se prefiere que el segundo
nucleótido 5' cadena arriba del extremo 3' del microsatélite
sea C, que el quinto nucleótido 3' cadena abajo del extremo 3'
20 del microsatélite sea G, y que el duodécimo nucleótido 3'
cadena abajo del extremo 3' del microsatélite es C. En algunas
modalidades, el cebador comprende o consiste en la secuencia
de SEC ID NO: 41, en donde X_4 es A, C o G, X_5 es A, C o G y X_6
es C, G o T. En algunas modalidades, el cebador comprende o
25 consiste en la secuencia de SEC ID NO: 31.

Como se explicó anteriormente, el cebador incluye uno, dos, tres o cuatro nucleótidos que no coinciden con la secuencia objetivo que contiene la mutación en el microsatélite y que tampoco coinciden con una secuencia correspondiente que contiene el microsatélite de tipo salvaje. Esto significa que el cebador incluye al menos uno, pero no más de cuatro, nucleótidos que no coinciden con la secuencia objetivo que contiene la mutación en el microsatélite y que tampoco coinciden con una secuencia correspondiente que contiene el microsatélite de tipo salvaje.

El uso exitoso de tales cebadores en el contexto de una mutación de desplazamiento de marco en un microsatélite como se describe en el presente documento fue una sorpresa para los presentes inventores. Antes de esta invención, se pensaba que no sería posible usar un cebador que se aparee a través del microsatélite en la secuencia objetivo para distinguir una mutación de desplazamiento de marco en el microsatélite debido a la naturaleza altamente repetida de estas regiones. Se pensó que tales cebadores no podrían usarse para distinguir entre la secuencia de microsatélite mutada por desplazamiento de marco y la secuencia de tipo salvaje, ya que se pensaría que un cebador diseñado para aparearse con el microsatélite con desplazamiento de marco también se aparearía con la secuencia de tipo salvaje, incluso si la afinidad de unión es baja.

Este enfoque de cebador permite una distinción entre

el mutante de desplazamiento de marco y el microsatélite de tipo salvaje mediante el uso de cebadores que son complementarios a una secuencia objetivo que contiene un microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco, excepto que el cebador tiene al menos una no coincidencia (y hasta cuatro no coincidencias) para esta secuencia, además de no coincidir con una secuencia correspondiente que contiene el microsatélite de tipo natural para que este cebador tenga una no coincidencia adicional con la secuencia objetivo de tipo natural y, por lo tanto, reduzca aún más la afinidad con la secuencia objetivo de tipo natural. En otras palabras, los cebadores se modelan a partir de la secuencia que contiene el microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento del marco de lectura, de manera que comprenden coincidencias erróneas con la secuencia correspondiente que tiene el microsatélite de tipo salvaje. Las no coincidencias adicionales entre el cebador y el microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento del marco dan como resultado una mayor desestabilización y repulsión entre el cebador y la secuencia que contiene el microsatélite de tipo salvaje.

Esta distinción entre un microsatélite con desplazamiento de marco y un microsatélite de tipo natural ofrece una herramienta de detección muy útil, en donde detectar el desplazamiento de marco es importante, tal como en los cánceres en donde los cambios de marco pueden ser un factor de

enfermedad y/o un posible objetivo terapéutico. Como se describe en el presente documento, existen muchos microsatélites en los que pueden ocurrir mutaciones de desplazamiento de marco relevantes para la enfermedad. Por ejemplo, el desplazamiento de marco puede ocurrir en un microsatélite en cualquier gen seleccionado entre ASTE1, ACVR22, TAF1B, KIAA2018, SLC22A9 y TGFBR2. Preferiblemente, el desplazamiento de marco se lleva a cabo en un microsatélite en ASTE1 o TGFBR2.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un kit para la detección de una mutación en un microsatélite contenido en una secuencia objetivo de una molécula de ADN bicatenario, en donde la mutación es un desplazamiento de marco del microsatélite en comparación con la correspondiente secuencia de microsatélite de tipo salvaje, y en donde el kit comprende un primer cebador de la invención y un segundo cebador, en donde el segundo cebador está configurado para aparearse con la secuencia objetivo 3' cadena abajo del microsatélite en la cadena opuesta de la molécula de ADN a la cadena a la cual está configurado para aparearse el primer cebador.

En otras palabras, esto proporciona un par de cebadores para el método de detección de la invención.

En algunas modalidades, la mutación de desplazamiento de marco está en un microsatélite en el gen TGFBR2 y comprende

la secuencia de acuerdo con los residuos 270 a 278 de SEC ID NO: 20, en donde el primer cebador comprende la secuencia definida por una cualquiera de SEC ID NO: 3, 4, 5, 7 o 39 y/o el segundo cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 2. Se entenderá que el uso del término "comprende" también incluye cebadores que consisten en las secuencias enumeradas anteriormente. Los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que estos cebadores son particularmente útiles dentro del alcance de la invención para su uso en la detección de mutaciones de desplazamiento de marco en un microsatélite dentro de TGFBR2 (también denominado a9, en donde a10 es el microsatélite de tipo salvaje). Sin embargo, como alternativa, la mutación de desplazamiento de marco puede estar en un microsatélite en el gen ASTE1, y el primer cebador puede comprender entonces la secuencia definida por cualquiera de SEC ID NOs: 11 a 16 y/o el segundo cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 10. En algunas modalidades, la mutación de desplazamiento de marco está en un microsatélite en el gen ASTE1 y comprende la secuencia de acuerdo con los residuos 328 a 337 de SEC ID NO: 33, en donde el primer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 15, 31, 40 o 41, y/o el segundo cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 10.

En algunas modalidades, el kit comprende además un tercer cebador, en donde el tercer cebador está configurado

para aparearse 5' cadena arriba de la región con la que el segundo cebador está configurado para aparearse y en donde el tercer cebador está configurado para aparearse con la misma cadena que el primer cebador y la cadena opuesta al segundo
5 cebador, o el kit comprende otro par de cebadores de control. Por ejemplo, en el ejemplo en el que la mutación de desplazamiento de marco está en un microsatélite en el gen TGFBR2 y comprende la secuencia de acuerdo con los residuos 270 a 278 de SEC ID NO: 19, entonces el tercer cebador puede
10 comprender la secuencia de acuerdo con SEC ID NO: 1. En el ejemplo en el que la mutación de desplazamiento de marco está en un microsatélite en el gen ASTE1, entonces el tercer cebador puede comprender la secuencia de acuerdo con SEC ID NO: 11 o SEC ID NO: 38.

15 Un par de cebadores de control puede entenderse como un control positivo para cualquier amplificación de ADN que se lleve a cabo con el kit, para comprobar que la amplificación de ADN se ha llevado a cabo con éxito, de manera que, por ejemplo, ninguna detección de una mutación de desplazamiento
20 de marco con los cebadores de la invención puede confirmarse como la ausencia de un desplazamiento de marco en la muestra, en lugar de un error o falla en la propia amplificación del ADN. Un par de cebadores de control puede ser cualquier par de cebadores que sea capaz de amplificar una secuencia objetivo
25 que se sepa que esté presente en la muestra (por ejemplo, una

secuencia conservada entre una mutación de desplazamiento del marco de lectura y una secuencia de tipo salvaje). En lugar de un par de cebadores de control separados, se puede usar un tercer cebador con el segundo cebador de la invención para el mismo propósito (es decir, un control positivo).

Preferiblemente, la secuencia que contiene el microsatélite de tipo salvaje comprende la secuencia definida en SEC ID NO: 19. Como se mencionó anteriormente, este es un microsatélite en TGFBR2 en el cual pueden ocurrir mutaciones que pueden estar relacionadas con enfermedades, tales como cáncer gástrico (GC) y cáncer colorrectal (CRC). En algunas modalidades, la secuencia que contiene el microsatélite de tipo salvaje comprende la secuencia definida en SEC ID NO: 32. Este es un microsatélite en ASTE1 en donde pueden ocurrir mutaciones que pueden estar relacionadas con enfermedades, tales como cáncer de endometrio y cáncer gástrico.

Preferiblemente aún, el tercer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 1. Nuevamente, se entenderá que el uso del término "comprende" también incluye un cebador que consiste en esta secuencia. Como se describe en el presente documento, este es un ejemplo adecuado de un cebador que se puede usar como parte de un par de cebadores de control positivo para la detección del microsatélite a10 en TGFBR2 y se ha demostrado que funciona con éxito de acuerdo con los datos experimentales que se describen a continuación. En algunas

modalidades, el cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 11. Este es un ejemplo adecuado de un cebador que se puede usar como parte de un par de cebadores de control positivo para la detección del microsatélite a11 en ASTE1, y se ha demostrado que funciona correctamente en la figura 18.

En algunas modalidades, la secuencia objetivo que comprende un microsatélite que tiene una mutación de marco de lectura comprende la secuencia de acuerdo con los residuos 270 a 278 de SEC ID NO: 19 o SEC ID NO: 20. Como se mencionó anteriormente, este es el microsatélite con marco de lectura desplazado en TGFBR2 que puede estar relacionado con enfermedades como el cáncer gástrico (CG) y el cáncer colorrectal (CRC). En algunas modalidades, la secuencia objetivo que comprende un microsatélite que tiene una mutación de marco de lectura comprende la secuencia de acuerdo con los residuos 328 a 337 de SEC ID NO: 33. Como se mencionó anteriormente, este es el microsatélite con marco de lectura desplazado en ASTE1 que puede vincularse con enfermedades, tales como cáncer gástrico (CG) y cáncer de endometrio.

Preferiblemente, el kit comprende además instrucciones de uso.

En algunas modalidades, el kit comprende además los componentes para llevar a cabo la amplificación de ADN. Tales componentes serán bien conocidos por el experto que esté bien familiarizado con técnicas para la amplificación de ADN,

incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la aplicación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés), la amplificación a base de secuencias de ácidos nucleicos (NASBA, por sus siglas en inglés o 3SR), la
5 amplificación por desplazamiento de cadena (SDA, por sus siglas en inglés), amplificación por círculo rodante (RCA, por sus siglas en inglés) y reacción en cadena de la ligasa (LCR, por sus siglas en inglés). El experto sabrá que los componentes se pueden proporcionar por separado o se pueden comprar como un
10 producto comercial como una "mezcla preparada" de los componentes necesarios requeridos.

Opcionalmente, estos componentes pueden incluir un amortiguador, dNTP y/o Taq polimerasa. Por ejemplo, este amortiguador se puede proporcionar como un amortiguador 10X y
15 los dNTP se pueden proporcionar en una concentración de 10 mM. En algunas modalidades, el amortiguador incluye iones de amonio (NH_4^+) y, opcionalmente, puede proporcionarse como amortiguador 1X. En algunas modalidades, el amortiguador es un amortiguador Key, opcionalmente un amortiguador Key 1X.

20 En otro aspecto de la invención, se proporciona un cebador para la amplificación de ADN que comprende la secuencia definida por cualquiera de SEC ID NO: 3, 4, 5, 7, 15, 31, 39, 40 o 41. Nuevamente, se entenderá que el uso del término "comprende" también incluye cebadores que consisten en las
25 secuencias enumeradas anteriormente. Como se describió

anteriormente, los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que estos cebadores son particularmente útiles dentro del alcance de la invención para su uso en la detección de mutaciones de desplazamiento de marco en un microsatélite dentro de TGFBR2 (también denominado a9, en donde a10 es el microsatélite de tipo salvaje) y ASTE1 (también conocido como a10, en donde a11 es el microsatélite de tipo salvaje). Como alternativa, el cebador puede comprender la secuencia definida por cualquiera de SEC ID NOs: 11 a 16, 31, 40 y 41. Nuevamente, se entenderá que el uso del término "comprende" también incluye cebadores que consisten en las secuencias enumeradas arriba.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para detectar una mutación en un microsatélite contenido en una secuencia objetivo de una molécula de ADN bicatenario, en donde la mutación es un desplazamiento de marco del microsatélite en comparación con la correspondiente secuencia de microsatélite de tipo salvaje usando cualquiera de los cebadores detallados anteriormente.

El método comprende:

- a) proporcionar una primera alícuota de una muestra que comprenda ADN humano,
- b) añadir a la primera alícuota los componentes necesarios para la amplificación del ADN, un primer cebador y un segundo cebador; en donde el primer cebador es adecuado para

la detección de una mutación en un microsatélite contenido en una secuencia objetivo de una molécula de ADN bicatenario y comprende una región de nucleótidos que es complementaria a la secuencia objetivo que contiene el microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco excepto entre uno y cuatro, o entre uno y tres, nucleótidos que no coinciden con la secuencia objetivo que contiene el microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco y que tampoco coinciden con una secuencia correspondiente que contiene el microsatélite de tipo salvaje; y el segundo cebador está configurado para aparearse con la secuencia objetivo 3' cadena abajo del microsatélite, para formar una primera mezcla de reacción;

en donde el primer cebador está configurado para aparearse con la cadena en sentido de la molécula de ADN y el segundo cebador está configurado para aparearse con la cadena en antisentido de la molécula de ADN, o el primer cebador está configurado para aparearse con la cadena en antisentido de la molécula de ADN y el segundo cebador está configurado para aparearse con la cadena en sentido de la molécula de ADN,

c) llevar a cabo la amplificación del ADN en la primera mezcla de reacción,

d) detectar la presencia de la mutación de desplazamiento de marco en la muestra cuando se produzca un producto de amplificación a partir de la amplificación del ADN de la primera mezcla de reacción. En algunas modalidades, el

cebador comprende entre uno y tres nucleótidos que no coinciden con la secuencia objetivo que contiene el microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco y que tampoco coinciden con una secuencia correspondiente que contiene el
5 microsatélite de tipo salvaje.

Como se mencionó anteriormente, la amplificación de ADN puede incluir reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aplicación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación a base de secuencia de ácido nucleico (NASBA o 3SR),
10 amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación por círculo rodante (RCA) y reacción en cadena de la ligasa (LCR). Sin embargo, preferentemente la amplificación de ADN usada es la PCR.

Preferiblemente, la amplificación del ADN se lleva a
15 cabo en condiciones muy rigurosas. Como se mencionó anteriormente, las condiciones de alta rigurosidad son condiciones en las que la amplificación es subóptima, de manera que la reacción solo permite una amplificación exitosa del ADN cuando hay un nivel muy alto de coincidencia con la secuencia
20 objetivo. En otras palabras, las condiciones son subóptimas para la amplificación del ADN, de manera que los cebadores con menor coincidencia de secuencia con la secuencia objetivo no pueden aparearse. Estas condiciones subóptimas pueden generarse alterando uno o más de la temperatura, el número de
25 ciclos, la fuerza iónica y la presencia de ciertos disolventes

orgánicos que permiten el emparejamiento de secuencias de ácidos nucleicos. En particular, esto puede incluir que el paso de apareamiento de la PCR se lleve a cabo a una temperatura que sea al menos un 2%, un 5% o un 10% superior a la temperatura de apareamiento recomendada de la reacción. Como alternativa, el paso de apareamiento de la PCR se lleva a cabo a una temperatura que es al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C o 10 °C por encima de la temperatura de apareamiento recomendada de la reacción. En algunas modalidades, el paso de apareamiento de la PCR se lleva a cabo a una temperatura que es 4 °C superior a la temperatura de apareamiento recomendada de la reacción. En algunas modalidades, el paso de apareamiento se lleva a cabo a una temperatura de 44 °C, 44.5 °C, 45 °C, 45.5 °C, 46 °C, 46.5 °C, 47 °C, 47.5 °C, 48 °C, 48.5 °C, 49 °C, 49.5 °C, 50 °C, 50.5 °C, 51 °C, 51.5 °C, 52 °C, 52.5 °C, 53 °C, 53.5 °C, 54 °C, 54.5 °C, 55 °C, 55.5 °C, 56 °C, 56.5 °C, 57 °C, 57.5 °C, 58 °C, 58.5 °C, 59 °C, 59.5 °C, 60 °C, 60.5 °C o 61°C. En algunas modalidades, el paso de apareamiento se lleva a cabo a una temperatura de entre 54 °C y 61 °C, preferiblemente entre 56 °C y 60 °C, más preferiblemente entre 56 °C y 59 °C o entre 56° y 58 °C, y preferiblemente en donde el desplazamiento de marco es en un microsatélite en un gen TGFBR2. En algunas modalidades, el paso de apareamiento se lleva a cabo a una temperatura de 56.0 °C, 56.1 °C, 56.2 °C, 56.3 °C, 56.4 °C,

56.5 °C, 56.7 °C, 56.8 °C, 56.9 °C, 57.0 °C, 57.1 °C, 57.2 °C, 57.3 °C, 57.4 °C, 57.5 °C, 57.6 °C, 57.7 °C, 57.8 °C, 57.9 °C o 58.0 °C, y preferiblemente el desplazamiento de marco es en un microsatélite en un gen TGFBR2. En algunas modalidades, el

5 paso de apareamiento se lleva a cabo a una temperatura de 57 °C y preferiblemente el desplazamiento de marco se lleva a cabo en un microsatélite en un gen TGFBR2. En algunas modalidades, el paso de apareamiento se lleva a cabo a una temperatura de entre 44 °C y 58 °C, preferiblemente entre 45 °C y 58 °C o

10 entre 45 °C y 56 °C, más preferiblemente entre 45 °C y 54.5 °C, y preferiblemente en donde el desplazamiento de marco es en un microsatélite en un gen ASTE1. En algunas modalidades, el paso de apareamiento se lleva a cabo a 48 °C, 48.5 °C, 49 °C, 49.5 °C, 50 °C, 50.5 °C, 51 °C, 51.5 °C, 52 °C, 52.5 °C,

15 53 °C, 53.5 °C, 54 °C, 54.5 °C, 55 °C, 55.5 °C, 56 °C, 56.5 °C, 57 °C, 57.5 °C o 58 °C, preferiblemente en donde el desplazamiento del marco es en un microsatélite en un gen ASTE1. En algunas modalidades, el paso de apareamiento se lleva a cabo a 44.5 °C, 45 °C, 45.5 °C, 46 °C, 46.5 °C, 47 °C, 47.5

20 °C, 48 °C, 48.5 °C, 49 °C, 49.5 °C, 50.0 °C, 50.5 °C, 51.0 °C, 51.5 °C, 52.0 °C, 52.5 °C, 53.0 °C, 53.5 °C, 54.0 °C, 54.5 °C, 55.0 °C, 55.5 °C, 56.0 °C, 56.5 °C, 57.0 °C o 57.5 °C, preferiblemente en donde el desplazamiento de marco es en un microsatélite en un gen ASTE1.

25 En algunas modalidades, el paso de apareamiento se

lleva a cabo a una temperatura de 56.0 °C, 56.1 °C, 56.2 °C, 56.3 °C, 56.4 °C, 56.5 °C, 56.7 °C, 56.8 °C, 56.9 °C, 57.0 °C, 57.1 °C, 57.2 °C, 57.3 °C, 57.4 °C, 57.5 °C, 57.6 °C, 57.7 °C, 57.8 °C, 57.9 °C o 58.0 °C, y el primer cebador comprende la

5 secuencia definida por SEC ID NO: 3, 4, 5, 7 o 39, preferiblemente SEC ID NO: 3 o 39. En algunas de estas modalidades, el paso de apareamiento es llevado a cabo a una temperatura de 57 °C.

En algunas modalidades, el paso de apareamiento se

10 lleva a cabo a una temperatura de 48 °C, 48.5 °C, 49 °C, 49.5 °C, 50 °C, 50.5 °C, 51 °C, 51.5 °C, 52 °C, 52.5 °C, 53 °C, 53.5 °C, 54 °C, 54.5 °C, 55 °C, 55.5 °C o 56 °C, y el primer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 15 o 40. Preferiblemente, el paso de apareamiento se lleva a cabo a una

15 temperatura de 50 °C, 50.5 °C, 51 °C, 51.5 °C, 52 °C, 52.5 °C o 53 °C.

En algunas modalidades, el paso de apareamiento se

lleva a cabo a una temperatura de 44.5 °C, 45 °C, 45.5 °C, 46 °C, 46.5 °C, 47 °C, 47.5 °C, 48 °C, 48.5 °C, 49 °C, 49.5 °C,

20 50.0 °C, 50.5 °C, 51.0 °C, 51.5 °C, 52.0 °C, 52.5 °C, 53.0 °C, 53.5 °C, 54.0 °C, 54.5 °C, 55.0 °C, 55.5 °C, 56.0 °C, 56.5 °C, 57.0 °C, 57.2 °C o 57.5 °C, y el primer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 31 o 41. Preferiblemente, el

paso de apareamiento se lleva a cabo a una temperatura de 45

25 °C, 45.5 °C, 46 °C, 46.5 °C, 47 °C, 47.5 °C o 48 °C.

De manera adicional o como alternativa, las condiciones de alta rigurosidad pueden incluir el uso de una concentración de amortiguador más baja que la recomendada para la reacción, tal como 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% o 75% de la concentración recomendada de un amortiguador en una reacción. En algunas modalidades, la concentración de amortiguador que es inferior a la concentración de amortiguador recomendada puede ser inferior a 0.1X, 0.2X, 0.3X, 0.4X, 0.5X, 0.6X o 0.75X. En algunas modalidades, la concentración final de amortiguador en la(s) mezcla(s) de reacción está entre 0.1X y 2X, entre 0.1X y 1.5X, entre 0.1X y 1X, entre 0.2X y 1X, entre 0.3X y 1X, entre 0.4 X y 1X o entre 0.5X y 1X. En algunas modalidades, la concentración final de amortiguador en la(s) mezcla(s) de reacción es de 0.5X, 0.6X, 0.7X, 0.8X, 0.9X, 1X, 1.5X o 2X.

De manera adicional o como alternativa, las condiciones de alta rigurosidad pueden incluir el uso de un amortiguador más riguroso en la reacción, tal como un amortiguador que incluya iones de amonio (NH_4^+). En algunas modalidades, se usa un amortiguador que incluye iones de amonio (NH_4^+) a una concentración estándar, tal como 1X. En algunas modalidades, se usa un amortiguador que incluye iones de amonio (NH_4^+) (es decir, está en la(s) mezcla(s) de reacción) en una concentración final de entre 1X y 2X, preferiblemente 1X. En algunas modalidades, el amortiguador que incluye iones de

amonio (NH_4^+) es un amortiguador Key. En algunas modalidades, el amortiguador es un amortiguador Key 1X.

En algunas modalidades, el amortiguador incluye iones de potasio (K^+). En algunas modalidades, el amortiguador que
5 incluye iones de potasio (K^+) se usa a una concentración final de entre 0.5X y 1X, preferiblemente a 0.5X o 1X. En algunas modalidades, el amortiguador es un amortiguador Taq estándar (KCl).

En algunas modalidades, la concentración final de
10 cada uno de los cebadores directos e inversos en la(s) mezcla(s) de reacción es, independientemente, entre 0.1 μM y 1 μM , entre 0.1 μM y 0.5 μM , entre 0.1 μM y 0.4 μM , entre 0.1 μM y 0.4 μM o entre 0.1 μM y 0.3 μM . En algunas modalidades, la concentración final de cada uno de los cebadores directos e
15 inversos en la(s) mezcla(s) de reacción es, independientemente, de 0.1 μM , 0.2 μM o 0.3 μM , preferiblemente 0.2 μM .

En algunas modalidades, la concentración final de los dNTP en la(s) mezcla(s) de reacción está entre 50 μM y 500 μM , entre 50 μM y 400 μM , entre 50 μM y 300 μM , entre 100 μM y 300
20 μM , entre 100 μM y 200 μM , entre 150 μM y 300 μM , o entre 150 μM y 250 μM . En algunas modalidades, la concentración final de los dNTP en la(s) mezcla(s) de reacción es de 100 μM , 150 μM , 200 μM , 250 μM o 300 μM , preferiblemente 200 μM .

Las condiciones de alta rigurosidad pueden incluir
25 en forma adicional o como alternativa reducir el número de

ciclos en una PCR, tal como llevar a cabo 25 ciclos, 20 ciclos, 15 ciclos o incluso 10 ciclos, en comparación con 30, 35 o 40 ciclos. En algunas modalidades, se llevan a cabo 30 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos o 10 o menos ciclos de PCR.

5 En algunas modalidades, se usa más de una de estas condiciones de alta rigurosidad. Preferiblemente se llevan a cabo 30 o 25 ciclos de PCR.

En algunas modalidades, el fabricante de un cebador obtenido comercialmente proporciona una temperatura de apareamiento recomendada. El experto conoce muchas herramientas disponibles públicamente para calcular una temperatura de apareamiento recomendada para un cebador determinado. El experto también sabe que se puede calcular una temperatura de apareamiento recomendada restando 3, 4, 5 o 6 °C de la T_m (temperatura de fusión) dada para un cebador particular. En una modalidad, la temperatura de apareamiento recomendada para un cebador es 4 °C por debajo de la T_m del cebador en las condiciones de la reacción. Por ejemplo, las calculadoras de T_m las proporciona New England BioLabs® (que se encuentra en <http://tmcalculator.neb.com/#!/main>) o Thermo Fisher Scientific® (que se encuentra en <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>). La calculadora de T_m

10

15

20

25

proporcionada por Thermo Fischer Scientific® también se conocerá como método de Allawi y SantaLucia modificado, de acuerdo con Allawi y SantaLucia, 1997.

Una concentración de amortiguador recomendada para una mezcla de reacción es 1X. Por ejemplo, en algunas modalidades se añaden 5 µl de un amortiguador 10X a una mezcla de reacción hasta un volumen final de 50 µl. En algunas modalidades, el amortiguador incluye iones de amonio (NH_4^+). En algunas modalidades, el amortiguador es un amortiguador Key.

En algunas modalidades, la temperatura de apareamiento es de al menos 57 °C y el amortiguador incluye iones de potasio (K^+). Preferiblemente, el amortiguador es un amortiguador Taq (KCl) estándar. En estas modalidades, la mutación de desplazamiento de marco en un microsatélite es preferiblemente en un gen TGFBR2 (es decir, la secuencia objetivo es TGFBR2 que tiene una mutación de desplazamiento de marco en un microsatélite).

Una muestra que comprende ADN humano puede ser cualquier muestra que se pueda obtener de un paciente, por ejemplo, la muestra puede ser un fluido corporal, un tejido o células. La muestra también puede ser una biopsia líquida, tal como plasma, que contiene ADN libre de células.

En algunas modalidades, el método comprende además:

a) añadir también a la primera alícuota del paso b) del método:

I) el segundo cebador y un tercer cebador, en donde el tercer cebador está configurado para aparearse 5' cadena arriba de la región con la cual el segundo cebador está configurado para aparearse, y en donde el tercer cebador está configurado para aparearse con la misma cadena que el primer cebador y la cadena opuesta al segundo cebador o

II) un par de cebadores de control, para formar la primera mezcla de reacción,

y detectar que la amplificación del ADN se haya llevado a cabo con éxito cuando se produzca un producto de amplificación a partir de la amplificación del ADN usando el segundo y tercer cebadores o el par de cebadores de control; o

b) proporcionar una segunda alícuota de la muestra que comprenda ADN humano, añadiendo a la segunda alícuota los componentes necesarios para la amplificación del ADN y:

I) el primer cebador y un tercer cebador, en donde el tercer cebador está configurado para aparearse en 5' cadena arriba de la región con la cual el segundo cebador está configurado para aparearse, y en donde el tercer cebador está configurado para aparearse con la misma cadena que el primer cebador y la cadena opuesta al segundo cebador o

II) un par de cebadores de control, y llevar a cabo la amplificación de ADN en la segunda mezcla de reacción, y detectar que la amplificación de ADN se haya llevado a cabo con éxito cuando se produzca un

producto de amplificación a partir de la amplificación de ADN de la segunda mezcla de reacción.

En algunas modalidades, el primer cebador es el cebador de la invención descrito anteriormente y, por lo tanto, tiene cualquiera de las características descritas anteriormente. Por ejemplo, en algunas modalidades, el primer cebador está configurado para aparearse a lo largo del microsatélite que tenga una mutación de desplazamiento del marco de lectura, y con al menos dos nucleótidos que flanqueen el extremo 5' y/o al menos dos nucleótidos que flanqueen el extremo 3' del microsatélite que tenga una mutación de desplazamiento de marco. El primer cebador puede aparearse con al menos tres, cuatro o cinco nucleótidos que flanqueen uno o ambos extremos del microsatélite que tenga una mutación de desplazamiento de marco. En algunas modalidades, el primer cebador no se aparea a lo largo de la correspondiente secuencia de microsatélite de tipo salvaje, y el extremo 3' del primer cebador no se aparea con la secuencia correspondiente que contiene el microsatélite de tipo salvaje. Esto proporciona la ventaja de que el primer cebador se aparea con la secuencia que contiene el microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco, pero no se aparea con la secuencia correspondiente que tiene el microsatélite de tipo salvaje. En algunas modalidades, el primer cebador se aparea con uno, dos o tres, preferiblemente dos o tres, nucleótidos que flanquean

el extremo 3' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco (es decir, el primer cebador comprende dos o tres nucleótidos 3' del microsatélite, con respecto al primer cebador, que se aparea con la secuencia correspondiente que comprende el microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco). En algunas modalidades, estos dos o tres nucleótidos forman una abrazadera GC. En algunas modalidades, el primer cebador se aparea a lo largo del microsatélite que tiene la mutación de desplazamiento de marco y, en 3' del microsatélite que tiene la mutación de desplazamiento de marco, con respecto al primer cebador, el primer cebador consiste en dos o tres nucleótidos que se aparean con el nucleótidos que flanquean el microsatélite que tienen la mutación de desplazamiento de marco. Esto proporciona la ventaja de que el primer cebador apareado con la secuencia que contiene el microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco se puede extender en la dirección de 5' a 3', permitiendo así la replicación de la secuencia que contiene el microsatélite que tiene la mutación de desplazamiento de marco. Los nucleótidos que flanquean el extremo 3' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco se describen anteriormente.

En algunas modalidades, el primer cebador se aparea con al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos que flanquean el extremo 5' del microsatélite que tiene una

mutación de desplazamiento de marco, con respecto al primer cebador. En algunas modalidades, al menos el 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% o 65% de los nucleótidos del primer cebador se aparean con los nucleótidos que flanquean el extremo 5' del
5 microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco de lectura, con respecto al primer cebador. En algunas modalidades, la parte del primer cebador que se aparea con los nucleótidos que flanquean el extremo 5' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco, con respecto al
10 primer cebador, también se aparea con la secuencia correspondiente que contiene el microsatélite de tipo salvaje. Esto proporciona la ventaja de que el primer cebador es específico para la secuencia objetivo deseada. Los nucleótidos que flanquean el extremo 5' del microsatélite que tiene la
15 mutación de desplazamiento de marco se describen con más detalle anteriormente.

En algunas modalidades, cada uno de los cebadores consiste en entre 16 y 30 nucleótidos. Preferiblemente, el cebador consiste en entre 16 y 25 nucleótidos. Preferiblemente
20 aún, el cebador consiste en entre 17 y 24 o entre 17 y 23 nucleótidos. Es decir, cada uno de los cebadores de forma independiente consiste en entre 16 y 30 nucleótidos. Preferiblemente, cada uno de los cebadores consta independientemente de entre 1 y 25 nucleótidos. Preferiblemente
25 aún, cada uno de los cebadores consta independientemente de

entre 17 y 24 nucleótidos. Otras longitudes preferidas de los cebadores se describen anteriormente.

En algunas modalidades, al menos un nucleótido no coincidente se ubica en una posición del primer cebador que se
5 aparea en 3' cadena abajo del microsatélite o dentro del microsatélite. Preferiblemente, todos los nucleótidos no coincidentes están ubicados en una posición del primer cebador que se aparea en 3' cadena abajo del microsatélite o dentro del microsatélite. En algunas modalidades, todos los
10 nucleótidos no coincidentes están ubicados en una posición del primer cebador que se aparea dentro del microsatélite. Otras ubicaciones preferidas de al menos una no coincidencia se describen anteriormente.

En algunas modalidades, al menos un nucleótido no
15 coincidente en el primer cebador está dentro de tres nucleótidos 5' cadena arriba o 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite. Preferiblemente, todos los nucleótidos no coincidentes en el primer cebador están dentro de tres nucleótidos 5' cadena arriba o 3' cadena abajo del extremo 3'
20 del microsatélite.

En algunas modalidades, al menos un nucleótido no coincidente en el primer cebador es una sustitución de una timina (T) por una adenina (A), una sustitución de una adenina (A) por una guanina (G), una sustitución de una timina (T) con
25 una citosina (C), o una sustitución de una citosina (C) por

una guanina (G).

En algunas modalidades, la amplificación del ADN es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en donde la PCR comprende una pluralidad de ciclos de desnaturalización, apareamiento y extensión.

En algunas modalidades, la mezcla de reacción comprende 1x amortiguador (o 0.5x amortiguador), dNTP 0.4 mM, cebador directo 0.2 μ M y cebador inverso 0.2 μ M. En algunas modalidades, el amortiguador incluye iones de amonio (NH_4^+) y preferiblemente es un amortiguador Key.

En algunas modalidades, el método comprende además que el paso d) comprende además ejecutar el producto de la reacción de PCR en un gel y visualizar una banda para confirmar que la amplificación del ADN haya sido exitosa.

Este enfoque permite una confirmación visual de si una reacción de PCR ha generado con éxito un amplicón (es decir, ha amplificado una secuencia objetivo de la muestra). El experto sabe muy bien cómo procesar el gel, y esto normalmente implicará mezclar la reacción de PCR con un tinte, cargarlo en un gel a base de agarosa, llevar a cabo electroforesis en el gel de manera que la reacción de PCR teñida migre hacia el extremo positivo del gel formando una banda que se puede visualizar. Esto proporciona una ventaja sobre el enfoque de secuenciación convencional que puede tardar varios días en proporcionar un resultado, ya que este método

de PCR se puede llevar a cabo en varias horas, o incluso menos de una hora. Así, este método tiene la ventaja de que se puede proporcionar a un médico o paciente un hallazgo clínicamente relevante (es decir, la presencia de una mutación relevante en una enfermedad determinada) a mayor velocidad.

En una modalidad adicional, el método comprende además el paso f) de cortar la banda para la secuenciación del ADN. La ventaja de llevar a cabo la reacción de PCR en un gel como se describió anteriormente es que se puede cortar una banda del gel y procesarla de acuerdo con técnicas conocidas por el experto para que pueda secuenciarse. La secuenciación no es esencial; sin embargo, esto puede permitir una confirmación adicional de que la mutación del marco de lectura está realmente presente en la muestra.

Como se describe en el presente documento, existen muchos microsatélites en los que pueden ocurrir mutaciones de desplazamiento de marco relevantes para la enfermedad. Por ejemplo, el desplazamiento de marco puede ocurrir en un microsatélite en cualquier gen seleccionado de ASTE1, ACVR22, TAF1B, KIAA2018, SLC22A9 y TGFBR2. En algunas modalidades, la mutación de desplazamiento de marco está en un microsatélite en TGFBR2 o ASTE1.

En algunas modalidades, la mutación de desplazamiento de marco está en un microsatélite en el gen TGFBR2 y la secuencia objetivo comprende la secuencia de acuerdo con los

residuos 270 a 278 de SEC ID NO: 19 o SEC ID NO: 20, y el primer cebador comprende una secuencia definida por cualquiera de SEC ID NOs: 3, 4, 5, 7 o 39 y/o el segundo cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 2. En algunas modalidades, la mutación de desplazamiento de marco de lectura está en un microsatélite en el gen ASTE1 y el la secuencia objetivo comprende la secuencia de acuerdo con los residuos 328 a 337 de SEC ID NO: 33, y el primer cebador comprende una secuencia definida por SEC ID NO: 15, 33, 40 o 41 y/o el segundo cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 10.

En algunas modalidades, el microsatélite está en un gen TGFBR2, la secuencia que comprende el microsatélite de tipo salvaje comprende la secuencia de acuerdo con SEC ID NO: 19, y el tercer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 1. En algunas modalidades, el microsatélite está en un gen ASTE1, la secuencia que comprende el microsatélite de tipo salvaje comprende la secuencia de acuerdo con SEC ID NO: 32, y el tercer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 11 o SEC ID NO: 38. Como se describió anteriormente, los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que estos cebadores son particularmente útiles dentro del alcance de la invención para su uso en la detección de mutaciones de desplazamiento de marco en un microsatélite dentro de TGFBR2 (también denominado a9, en donde a10 es el microsatélite de tipo salvaje) o ASTE1.

En algunas modalidades, la muestra es una biopsia líquida que comprende ADN libre de células, preferiblemente en donde la biopsia líquida es plasma o suero. Como alternativa, la muestra es una biopsia de tejido. Preferiblemente, la muestra se obtiene de un ser humano. La detección a partir de biopsias líquidas es particularmente beneficiosa, ya que las biopsias se obtienen fácilmente de los pacientes y, a menudo, es más fácil extraer ADN de ellas que, por ejemplo, una biopsia de tejido tumoral que puede ser necrótica y/o tener un contenido de ADN variable, lo que dificulta el análisis. Como se mencionó anteriormente, los tumores suelen ser heterogéneos y, por lo tanto, una biopsia de tumor puede no ser representativa de todo el tumor, sino solo de la parte de la que se tome la muestra. La biopsia líquida supera este problema proporcionando una muestra representativa.

En algunas modalidades, el método comprende además determinar que un paciente que padezca una enfermedad o trastorno asociado con una mutación en el marco de lectura sea adecuado para un tratamiento dirigido a la mutación en el marco de lectura si la mutación en el marco de lectura se detecta en el paso d) en una muestra del paciente. Preferiblemente, la enfermedad o trastorno asociado con una mutación de desplazamiento de marco es un cáncer.

En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es cáncer colorrectal (CRC), cáncer gástrico (GC) o síndrome de

Lynch, y el tratamiento dirigido a la mutación de desplazamiento de marco es FMPV-1, en donde la mutación de desplazamiento de marco está en un microsatélite en el gen TGFBR2 y comprende la secuencia de acuerdo con los residuos
5 270 a 278 de SEC ID NO: 19 o SEC ID NO: 20. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es cáncer de endometrio o cáncer gástrico y el tratamiento dirigido a la mutación de desplazamiento de marco es FMPV-2, en donde la mutación de desplazamiento de marco está en un microsatélite en el gen
10 ASTE1 y comprende la secuencia de acuerdo con los residuos 328 a 337 de SEC ID NO: 33.

Preferiblemente, el método comprende además el paso e) de tratar al paciente con FMPV-1 o FMPV-2. FMPV-1 es una vacuna peptídica como se describe en el documento WO
15 2020/239937A1, que se incorpora en el presente documento como referencia. FPMV-1 también se conoce como fsp2. FMPV-2 es una vacuna peptídica como se describe en el documento WO2021/239980, que se incorpora al presente documento como referencia. FMPV-2 también se conoce como fsp8.

20 Opcionalmente, también se puede usar un tercer cebador u otro par de cebadores de control para la amplificación del ADN de la muestra con el fin de proporcionar un control positivo para los métodos de detección de la invención. En algunas modalidades, el microsatélite está en un
25 gen TGFBR2, la secuencia que comprende el microsatélite de tipo

salvaje comprende o consiste en la secuencia de acuerdo con SEC ID NO: 19 o SEC ID NO: 34, y en donde el tercer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 1. En algunas modalidades, el microsatélite está en un gen ASTE1, la
5 secuencia que comprende el microsatélite de tipo salvaje comprende o consiste en la secuencia de acuerdo con SEC ID NO: 32 o SEC ID NO: 36, y el tercer cebador comprende el secuencia definida por SEC ID NO: 11 o SEC ID NO: 38.

En algunas modalidades, el primer cebador comprende
10 la secuencia definida por cualquiera de SEC ID NO: 3, 4, 5, 7, 15, 31, 39, 40 o 41, y/o el segundo cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 2 o 10.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad asociada con una
15 mutación de desplazamiento de marco de lectura en un microsatélite, que comprende llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención. Como se describió anteriormente, las mutaciones de desplazamiento de marco en microsatélites se han relacionado con una serie de enfermedades, que incluyen, entre
20 otras: síndrome de Lynch, fibrosis quística, enfermedad de Crohn y cáncer, incluyendo cánceres de colon, gástrico, endometrio, ovario, tracto hepatobiliar, tracto urinario y cerebro y piel. En particular, se pueden detectar mutaciones de desplazamiento de marco asociadas al cáncer en
25 microsatélites en cualquier número de genes, incluyendo, pero

no limitados a: ASTE1, ACVR22, TAF1B, KIAA2018, SLC22A9 y TGFBR2.

En cualquiera de los métodos anteriores, es preferible que la muestra sea una biopsia líquida que comprenda
5 ADN libre de células, preferiblemente en donde la biopsia líquida sea plasma.

En cualquiera de los métodos anteriores, es preferible que la amplificación del ADN sea PCR y que la PCR se lleve a cabo en condiciones de alta rigurosidad,
10 opcionalmente en donde las condiciones de alta rigurosidad comprendan al menos uno de:

a) llevar a cabo el paso de apareamiento de PCR a una temperatura que sea al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9° C o 10 °C más alta que la temperatura de
15 apareamiento recomendada de la reacción, preferiblemente a una temperatura de entre 53 °C y 60 °C;

b) llevar a cabo el paso de apareamiento de PCR durante sólo 30 segundos, preferiblemente 15 segundos, por ciclo;

20 c) llevar a cabo la amplificación del ADN en una concentración de amortiguador inferior a 0.1X, 0.2X, 0.3X, 0.4X, 0.5X, 0.6X o 0.75X;

d) llevar a cabo la amplificación del ADN en un amortiguador que comprenda iones de amonio;

25 e) reducir el número de ciclos de PCR a 25, 20, 15 o

10 ciclos, opcionalmente 30 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, o 10 o menos ciclos. Las condiciones de alta rigurosidad pueden ser cualquiera de las descritas anteriormente.

5 Por ejemplo, en algunas modalidades, las condiciones de alta rigurosidad comprenden llevar a cabo el paso de apareamiento a una temperatura que sea al menos 4 °C mayor que la temperatura de apareamiento recomendada y/o llevar a cabo la amplificación del ADN en un amortiguador que comprenda iones
10 de amonio (NH_4^+), y/o llevar a cabo el paso de apareamiento de PCR durante 15 segundos por ciclo, y/o reducir el número de ciclos de PCR a 25 o menos. En algunas modalidades, las condiciones de alta rigurosidad comprenden llevar a cabo el paso de apareamiento a una temperatura que sea al menos 4 °C
15 mayor que la temperatura de apareamiento recomendada, preferiblemente a una temperatura que sea 4 °C mayor que la temperatura de apareamiento recomendada, llevar a cabo la amplificación de ADN en amortiguador que comprenda iones de amonio (NH_4^+) a una concentración de 1X, preferiblemente en
20 donde el amortiguador es amortiguador Key, llevando a cabo el paso de apareamiento de PCR durante 15 segundos y reduciendo el número de ciclos de PCR a 25.

 En algunas modalidades, las condiciones de alta rigurosidad comprenden llevar a cabo el paso de apareamiento a
25 una temperatura de 58 °C en un amortiguador que incluye iones

de potasio (K⁺), preferiblemente amortiguador Taq (KCl) estándar. En estas modalidades, es preferible que la mutación de desplazamiento de marco en el microsatélite esté en TGFBR2.

La invención se demostrará ahora en los siguientes
5 ejemplos experimentales no limitantes.

Ejemplo I - Diseño de cebadores para la detección de TGFBR2 mutado por desplazamiento de marco

El diseño de cebadores normalmente sigue reglas particulares para garantizar un rendimiento deseable de un
10 amplicón (fragmento) único y específico. La mayoría de las veces estas reglas se toman fácilmente de acuerdo, incluso al distinguir entre secuencias muy similares. Sin embargo, dado que la única diferencia, en el caso de distinguir un desplazamiento de marco en un microsatélite, es la longitud
15 del microsatélite (una diferencia de nucleótidos), esto no es aplicable. Las regiones flanqueantes del satélite tienen exactamente la misma secuencia en ambas variantes de ADN, lo que hace que la afinidad de un cebador entre ellas sea casi igual. A su vez, este es por sí solo el mayor obstáculo a
20 superar al definir la prueba de detección, ya que el diseño del cebador está bloqueado en esta secuencia/área exacta, sin posibilidad de cambiar demasiado los parámetros. Por lo tanto, la estrategia usada en el diseño de cebadores de detección de mutantes es crear discrepancias con la secuencia de tipo
25 salvaje y de esa manera inducir suficientes fuerzas repulsivas

y bloquear el apareamiento del cebador con el ADN de tipo salvaje.

En una serie de 14 experimentos, se diseñó y probó un panel de cebadores de PCR (Tabla 1) para la detección de TGFBR2 mutado por desplazamiento de marco. Inicialmente, se diseñó y probó un primer conjunto de cebadores para la amplificación del ADN de TGFBR2. De acuerdo con los resultados de los experimentos anteriores, los cebadores se optimizaron y se volvieron a probar. Para la configuración de la PCR se usaron fragmentos sintéticos de ADN de TGFBR2 que comprenden los microsatélites de tipo salvaje y mutante, a10 y a9, respectivamente (SEC ID NO: 19 y 20 respectivamente).

Tabla 1

Cebador	SEC ID NO:	Dirección 5' - 3'	Secuencia
P1	1	Indirecto	CAGTGTCATAGAGCACATTTCCT
P2	2	Directo	AGACAGTTTGCCATGACCC
P4	3	Indirecto	GTCTCACCAGGCTTTTTTTTTC <u>G</u>
P5	8	Indirecto	GTCTCACCAGGCTTTTTTTTTC
P6	4	Indirecto	GTCTCACCAGGCTTTTTTTT <u>ACG</u>
P10	5	Indirecto	CACCAGGCTTTTTTTT <u>ATC</u> <u>G</u> TTC

Ejemplo II - Prueba de funcionalidad de cebadores

Los dos primeros cebadores (P1 y P2) actúan como control positivo con respecto a la prueba de detección, para

garantizar resultados confiables y que se cumplan todos los criterios para ejecutar la PCR (sin señal del control = PCR fallida). Además, el control positivo garantiza que esté presente la longitud y secuencia correctas del ADNcf (ADN libre
5 circulante) que se necesita para llevar a cabo la detección/determinación de la variante TGFbR2. Un amplicón derivado de P1 - P2 (249 pb) abarca todos los demás objetivos de cebador diseñados (secuencias correspondientes) y no es específico de mutante.

10 Los cebadores mutantes (P4, P5, P6 y P10) se diseñaron con una variante mutante de TGFbR2 como objetivo principal y albergan la secuencia del microsatélite 9A. Simplemente por tener una secuencia más corta de 9A en lugar de 10A, existen discrepancias entre el tipo salvaje y el
15 extremo 3' de los cebadores. Introduciendo una sola sustitución de nucleótido (seleccionada al azar) en este extremo de los cebadores P4, P6 y P10, se puede reforzar la repulsión por no coincidencia. Los amplicones (102 pb - 169 pb) se producen en conjugación con uno de los cebadores de control.

20 Para determinar la cantidad requerida de ADN molde para las reacciones de PCR, se llevaron a cabo pruebas de PCR en condiciones de PCR estándar, usando protocolos y temperaturas calculadas de NEB (New England BioLabs), usando diferentes cantidades de ADN molde. Los resultados de estas
25 pruebas se pueden ver en los geles de electroforesis que se

muestran en las figuras 1A y 1B.

En particular, se encontró que incluso una cantidad muy pequeña de plantilla (menos de 2 pg, tal como se puede ver en la figura 1B) logra un buen rendimiento y bandas de alta
5 resolución en el gel. Además, los amplicones tienen la longitud esperada correcta y muestran una alta especificidad.

Se descubrió que todos los cebadores eran funcionales, con una amplificación exitosa del ADN molde del microsatélite 9a (mutante) y del microsatélite 10a (tipo
10 salvaje) en condiciones de PCR estándar (ver Tabla 2), emparejando cada cebador con P2 (o con P1 en el caso de P2). El producto de estas reacciones de PCR se tiñó con tinción de ADN y se ejecutó en una mezcla prefabricada de agarosa-TAE (2%) llevando a cabo electroforesis a 100 V durante aproximadamente
15 20 a 30 minutos hasta que el frente de funcionamiento alcanzó el final del gel. El resultado de esta electroforesis demostró una amplificación exitosa de ambos tipos de ADN molde con bandas fuertes visibles en todas las bandas. Sin embargo, los cebadores no diferenciaron entre el microsatélite que contenía
20 la mutación de desplazamiento de marco (9a) (mutante) y el microsatélite que no contenía la mutación de desplazamiento de marco (10a) (tipo salvaje).

Ejemplo III - Prueba de P4 en condiciones subóptimas (alta rigurosidad)

25 Por lo tanto, este enfoque experimental se repitió

usando condiciones de PCR más rigurosas, usando una temperatura de apareamiento ligeramente más alta de 53 °C y menos ciclos de solo 25 (véase la Tabla 2). El resultado de este cambio de condición fue que hubo menos amplificación del microsatélite
 5 que no contenía la mutación de desplazamiento de marco (10a) (tipo salvaje), lo que se puede ver claramente en la figura 2 mediante tamaños de banda reducidos para el cebador P4 en donde la señal está disminuyendo claramente en el 10a plantilla.

Luego se repitió el experimento usando los
 10 cebadores P2 y P4 en condiciones aún más rigurosas que para el experimento que se muestra en la figura 2, aumentando aún más la temperatura de apareamiento a 55 °C y acortando los pasos de apareamiento y extensión en 15 segundos y 20 segundos respectivamente. Estas condiciones se muestran a
 15 continuación en la Tabla 2. Estas condiciones proporcionaron una distinción aún mejor entre la plantilla 10a (tipo salvaje) y la plantilla 9a (mutante) con una banda extremadamente débil, casi invisible, para la plantilla de tipo salvaje, como se puede ver en la figura
 20 3. No se encontró lo mismo con P5, en donde no se encontró distinción entre la plantilla 10a (tipo salvaje) y la plantilla 9a (mutante) usando este cebador incluso en condiciones rigurosas (datos no mostrados).

Tabla 2

25

<i>Condiciones de rigurosidad estándar</i>

5

Paso	Temp	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	30 seg.
Desnaturalización (30 ciclos)	95°C	30 seg.
Apareamiento (30 ciclos)	52°C	45 seg.
Extensión (30 ciclos)	68°C	30 seg.
Extensión final	68°C	5 min.
Retención	4°C	-

Condiciones de alta rigurosidad usadas en la figura 2

10

Paso	Temp	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	30 seg.
Desnaturalización (25 ciclos)	95°C	30 seg.
Apareamiento (25 ciclos)	53°C	45 seg.
Extensión (25 ciclos)	68°C	30 seg.
Extensión final	68°C	5 min.
Retención	4°C	-

15

Condiciones de alta rigurosidad usadas en la figura 3

20

Paso	Temp	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	30 seg.
Desnaturalización (25 ciclos)	95°C	30 seg.
Apareamiento (25 ciclos)	55°C	35 seg.
Extensión (25 ciclos)	68°C	10 seg.
Extensión final	68°C	5 min.
Retención	4°C	-

25

Ejemplo IV - Pruebas de P4, P6 y P10 en condiciones subóptimas (mayor rigurosidad)

Nuevamente, para usar los cebadores para distinguir entre el ADN molde mutante (9a) y de tipo salvaje (10a), se usaron condiciones de PCR más rigurosas de acuerdo con la Tabla 3, con una temperatura de apareamiento más alta y un paso de apareamiento más corto. Además, la reacción de PCR se llevó a cabo dos veces por par de cebadores, una vez a la concentración de amortiguador estándar y otra vez a una concentración de amortiguador baja (reducida al 50% de la concentración estándar). En este experimento en particular sólo se examinaron pares de cebadores que usaban P6 y P10. Como se puede ver en la figura 4, en donde las muestras con baja concentración de amortiguador están marcadas con un asterisco (*), esto dio como resultado una banda clara y fuerte solo en la muestra con baja concentración de amortiguador usando el cebador P10 en el mutante, y no en la plantilla de tipo salvaje.

Tabla 3

<i>Condiciones de rigurosidad estándar</i>		
Paso	Temp	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	30 seg.
Desnaturalización (25 ciclos)	95°C	15 seg.
Apareamiento (25 ciclos)	51°C	30 seg.
Extensión (25 ciclos)	68°C	10 seg.

Extensión final	68°C	5 min.
Retención	4°C	-
<i>Condiciones de alta rigurosidad usadas en la figura 4</i>		
Paso	Temp	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	30 seg.
Desnaturalización (25 ciclos)	95°C	15 seg.
Apareamiento (25 ciclos)	56°C	15 seg.
Extensión (25 ciclos)	68°C	45 seg.
Extensión final	68°C	5 min.
Retención	4°C	-

Para optimizar la amplificación mediante los cebadores diseñados a partir del molde mutante, se llevaron a cabo experimentos adicionales usando P4, P6 y P10 (así como P1 como control positivo) usando el ADN molde mutante (9a) en varias condiciones diferentes.

En particular, en los experimentos mostrados en las figuras 5A-5C se usaron temperaturas de apareamiento de 55 °C, 56 °C y 58 °C respectivamente, tal como se puede ver a continuación en la Tabla 4. Nuevamente, una concentración de amortiguador "baja" (indicada por un asterisco, *) en los experimentos mostrados en las figuras 5A-6C comprendían una concentración de amortiguador de alrededor del 50% de la concentración de amortiguador estándar. Como puede verse, se observaron señales más fuertes en las figuras 5B y 5C,

particularmente en la concentración baja de amortiguador. Es de destacar que el cebador P6 mostró amplificación aquí, lo que confirma la hipótesis de que la falta de amplificación en los experimentos anteriores se debió a un error humano.

5 Tabla 4

Condiciones de PCR usadas en la figura 5A		
Paso	Temp	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	2 min.
Desnaturalización (30 ciclos)	95°C	15 seg.
10 Apareamiento (30 ciclos)	55°C	15 seg.
Extensión (30 ciclos)	68°C	45 seg.
Extensión final	68°C	5 min.
Retención	4°C	-
Condiciones de PCR usadas en la figura 5B		
Paso	Temp	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	2 min.
Desnaturalización (25 ciclos)	95°C	15 seg.
15 Apareamiento (25 ciclos)	56°C	15 seg.
Extensión (25 ciclos)	68°C	45 seg.
Extensión final	68°C	5 min.
20 Retención	4°C	-
Condiciones de PCR usadas en la figura 5C		
Paso	Temp	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	2 min.
25 Desnaturalización (25 ciclos)	95°C	15 seg.

Apareamiento (25 ciclos)	58°C	15 seg.
Extensión (25 ciclos)	68°C	45 seg.
Extensión final	68°C	5 min.
Retención	4°C	-

5

Se llevaron a cabo reacciones de PCR adicionales usando pares de cebadores a una temperatura de apareamiento aún más alta de 60 °C (véase la Tabla 5 a continuación) tanto en concentraciones de amortiguador estándar como bajas (figura 6). Se observó una señal fuerte en el control (P1) en las concentraciones de amortiguador tanto estándar como baja.

10

Esta temperatura de apareamiento más alta permitió la amplificación selectiva de la plantilla mutante mediante el cebador P6 en combinación con el cebador P2, sin amplificación detectable de la plantilla de tipo salvaje, que se puede ver en la figura 6A.

15

Además, también se llevaron a cabo tres reacciones con cebador en las mismas condiciones, que se pueden observar en la figura 6B. Tres reacciones de cebador contenían P1, P2 y P4, P6 o P10, y se esperaba que se vieran dos bandas a 249 pb y 102 pb. No se observó señal en las reacciones de baja concentración de amortiguador, y solo se observó una banda en las reacciones de concentración de amortiguador estándar.

20

Se usaron nuevamente las mismas condiciones (de acuerdo con la Tabla 5) para llevar a cabo reacciones de PCR

25

adicionales, pero también incluyeron el cebador P4 (figura 7). En estos experimentos, se encontró que se observó una banda fuerte del control positivo (P1) en la concentración de amortiguador estándar y una banda más débil en la concentración de amortiguador baja. A la concentración de amortiguador estándar, se observó amplificación con P10 tanto en el molde mutante como en el de tipo salvaje; sin embargo, en la concentración de amortiguador baja, se observó que la amplificación con P10 se observó en el molde mutante pero no en el molde de tipo salvaje (figura 7). Por lo tanto, se encontró que P10 en la concentración baja de amortiguador no tenía afinidad hacia la secuencia de tipo salvaje.

Nuevamente, se llevaron a cabo tres reacciones de cebador en las mismas condiciones, y en este experimento, mientras solo se detectó una banda débil en la concentración baja de amortiguador, se observaron dos bandas (una fuerte y otra débil) en la concentración de amortiguador estándar.

Tabla 5

Condiciones de PCR usadas en las figuras 6A, 6B y 7		
Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	2 min.
Desnaturalización (25 ciclos)	95°C	15 seg.
Apareamiento (25 ciclos)	60°C	15 seg.
Extensión (25 ciclos)	68°C	45 seg.

Extensión final	68°C	5 min.
Retención	4°C	-

Ejemplo V - Prueba de funcionalidad de los cebadores
P4.1, P4.2 y P10.1

De acuerdo con el ejemplo anterior, también se probaron otros cebadores P4.1, P4.2 y P10.1, que se modificaron adicionalmente a partir de los cebadores P4 y P10, emparejándolos con el cebador P2 y llevando a cabo la PCR (las condiciones se detallan a continuación en la Tabla 6) seguida de electroforesis en gel (que se muestra en la figura 8). Este experimento demostró que estos tres cebadores son funcionales ya que mostraron amplificación contra los moldes mutantes (9a) y de tipo salvaje (10a), como se puede ver en la figura 8, que muestra fuertes bandas. Se puede observar una banda significativamente reducida para P4.1 en la plantilla mutante en relación con la banda equivalente en la plantilla de tipo salvaje.

Tabla 6

Condiciones de PCR usadas en la figura 8		
Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	2 min.
Desnaturalización (25 ciclos)	95°C	15 seg.
Apareamiento (25 ciclos)	52°C	15 seg.
Extensión (25 ciclos)	68°C	45 seg.

Extensión final	68°C	5 min.
Retención	4°C	-

Ejemplo VI - Prueba de cebadores candidatos en condiciones de PCR más rigurosas

Para usar los cebadores para distinguir entre la plantilla mutante (9a) y de tipo salvaje (10a), se llevaron a cabo reacciones de PCR usando dos tipos diferentes de amortiguador: amortiguador Taq estándar que no comprende iones de amonio y amortiguador Key que comprende iones de amonio (NH_4^+).

En primer lugar, se usaron reacciones de PCR en una plantilla mutante usando amortiguador Taq o amortiguador Key en las condiciones que se muestran en la Tabla 7 y se llevaron a cabo en un gel de electroforesis como se muestra en la figura 9A. Se descubrió que se observó una intensidad de señal relativamente uniforme independientemente del amortiguador usado, con la excepción del cebador P4.2 donde la reacción en el amortiguador Key mostró una señal mínima.

Luego, estas reacciones se repitieron con una temperatura de apareamiento ligeramente más alta (que se muestra nuevamente en la Tabla 7) y se llevaron a cabo en un gel de electroforesis como se muestra en la figura 9B. Este experimento mostró resultados comparables a los observados en la figura 9A; sin embargo, la señal producida por la reacción

con el cebador P10.1 en el amortiguador Key se redujo significativamente. La señal producida por la reacción con el cebador P4.2 fue más distinguible en este experimento.

La diferencia inmediata entre las señales producidas por algunas muestras de PCR que contienen un amortiguador Key y un amortiguador Taq sugiere que la estabilización de la interacción cebador/plantilla se ve muy afectada. Tener una mayor cantidad de discrepancias entre los cebadores diseñados y el ADN de tipo salvaje podría conducir a la eliminación de los amplicones producidos a partir de estas muestras usando un amortiguador Key. A partir de los resultados, es evidente que varias muestras de cebadores y ADN molde mutantes tienen la misma intensidad de señal independientemente de la variante del amortiguador, y se anticipa que la interacción permanece en estas muestras y se producen amplicones, mientras que los moldes de tipo salvaje tienen un apareamiento de cebadores disminuido. Los cebadores de control no parecen verse afectados por las variantes del amortiguador ni por las temperaturas probadas. Dado que las muestras con P4.2 y el amortiguador Key no fueron consistentes en los dos experimentos, es indicativo de que el stock de P4.2 estaba en malas condiciones.

Tabla 7

Condiciones de PCR usadas en la figura 9A		
Paso	Temperatura	Tiempo

5	Desnaturalización inicial	95°C	2 min.
	Desnaturalización (25 ciclos)	95°C	15 seg.
	Apareamiento (25 ciclos)	56°C	15 seg.
	Extensión (25 ciclos)	68°C	45 seg.
	Extensión final	68°C	5 min.
	Retención	4°C	-
Condiciones de PCR usadas en la figura 9B			
10	Paso	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95°C	2 min.
	Desnaturalización (25 ciclos)	95°C	15 seg.
	Apareamiento (25 ciclos)	58°C	15 seg.
	Extensión (25 ciclos)	68°C	45 seg.
	Extensión final	68°C	5 min.
15	Retención	4°C	-

Se llevaron a cabo experimentos adicionales en las mismas condiciones que la figura 9A que se muestra en la Tabla 7, usando los cebadores P4, P4.1, P4.2 y P6 en combinación con P2 en ADN molde tanto mutante como natural. Estas reacciones también se llevaron a cabo en geles de electroforesis como se puede ver en la figura 10. Las reacciones de la figura 10A se llevaron a cabo en amortiguador Taq estándar y las reacciones de la figura 10B se llevaron a cabo en amortiguador Key, que contiene iones de amonio (NH_4^+).

En las muestras que contenían amortiguador Taq estándar hubo suficiente producción de amplicones para dar bandas fuertes con los diversos cebadores y plantillas (figura 10A). Las muestras que contenían el amortiguador Key mostraron
5 falta de apareamiento del cebador y, por lo tanto, rendimiento del producto, como se visualiza mediante bandas débiles o que desaparecen en algunas combinaciones de cebador/plantilla (figura 10B). Con el ADN molde mutante, P6 tenía una funcionalidad muy reducida. En cuanto al ADN molde de tipo
10 salvaje, hubo pérdida de función en P4, P6 y rendimiento fraccionado/reducido en P4.2.

Luego, los experimentos se repitieron a una temperatura de apareamiento ligeramente más alta de 59 °C y se llevaron a cabo en geles de electroforesis, que se pueden ver
15 en las figuras 11A y 11B, con reacciones en amortiguador Taq estándar que se muestran en la figura 11A y reacciones en amortiguador Key que se muestran en la figura 11B. Como se vio en el experimento anterior, todas las muestras produjeron señales fuertes en el gel independientemente del ADN molde. Al
20 observar muestras con ADN mutado como plantilla y amortiguador Key, el único cebador que no produjo amplicón (o produjo una cantidad baja) en esta combinación es P6. Con la plantilla de ADN de tipo salvaje y el amortiguador Key, se observaron bandas débiles o que desaparecían en las muestras con P4.2 y P6.

25 Al observar los resultados de las figuras 10A-10B y

11A-11B, es evidente que el amortiguador Key (amonio, NH_4^+) tiene un efecto desestabilizador significativo que impide el apareamiento de cebadores (seleccionados) con el ADN molde. Además, ligeras alteraciones de la temperatura desempeñan un papel importante en la pérdida o ganancia de función (en el apareamiento). Dado que los cebadores diseñados tendrán inherentemente más coincidencias erróneas en combinación con la secuencia de tipo salvaje como ADN molde en comparación con la secuencia mutante, la influencia del amortiguador Key es significativamente mayor. El apareamiento cebador/plantilla sigue siendo funcional con la secuencia de $\text{TGF}\beta\text{R2}$ mutante en un área más amplia de parámetros.

Ejemplo VII - Detección de la mutación de desplazamiento de marco de lectura de $\text{TGF}\beta\text{R2}$ a10→a9 en ADN libre de células (ADNcf) de biopsias líquidas de pacientes con cáncer colorrectal MSI

Métodos

El ADNcf se extrajo de muestras de plasma de pacientes usando un kit de extracción de ADNcf (Mini kit de purificación de ADN circulante libre de células de plasma/suero, número de categoría 55100, www.norgenbiotek.com). Las muestras de los pacientes se compraron en Indivumed GmbH (www.indivumed.com) y todas se tomaron en el mismo punto del tratamiento de cada paciente individual: T0 (valor inicial). Los pacientes tenían cáncer

colorrectal (CCR), eran MSI-H o MSS y tenían entre 42 y 73 años.

i) Secuenciación del ADNcf

La secuenciación de los fragmentos de ADNcf presentes en las muestras de plasma se llevó a cabo mediante PCR con una polimerasa de alta fidelidad (OneTaq DNA Polymerase, New England Biolabs, www.international.neb.com) y condiciones estándar, usando 1X OneTaq-amortiguador (KCl). La polimerasa de alta fidelidad tenía actividad exonucleasa 3'-5' y aseguró que la secuencia del microsatélite, en donde las polimerasas son propensas a "deslizarse" debido al gran número de repeticiones de un solo nucleótido, se sintetizara correctamente. Se usó ADN plantilla de TGF β R2 sintético como controles (tipo salvaje (misma secuencia que SEC ID NO: 19) y variante mutante 9a (misma secuencia que SEC ID NO: 20)), para verificar que los datos de secuenciación del microsatélite son correctos y que la lectura del gel de electroforesis sea consistente en comparación con secuencias conocidas. Los cebadores usados en la PCR con fines de secuenciación fueron P1 y P2.

Las condiciones de la PCR fueron las establecidas en la Tabla 8.

Tabla 8

Condiciones de termociclado (OneTaq)

Paso	Temperatura	Tiempo
------	-------------	--------

5

Desnaturalización inicial	94°C	2 min.
Desnaturalización (30 ciclos)	94°C	15 seg.
Apareamiento (30 ciclos)	52°C	15 seg.
Extensión (30 ciclos)	68°C	20 seg.
Extensión final	68°C	5 min.
Retención	4°C	-

El producto de la PCR se purificó mediante electroforesis en gel. La banda con fragmentos/amplicones con la longitud correcta se cortó del gel y se extrajo usando un kit de extracción de gel (VWR peqGOLD Gel Extraction Kit, número de categoría 13-2500-01, www.vwr.com). Luego, el producto de PCR extraído se envió para secuenciación, que fue llevada a cabo por Eurofins Genomics (www.eurofinsgenomics.eu).

ii) Detección de ADNcf de TGF β R2 mutado

El ADNcf de las muestras de plasma del paciente y el TGF β R2 sintético de tipo salvaje y mutante a9 (SEC ID NOs: 19 y 20) como controles, se amplificó mediante PCR, usando las condiciones de la Tabla 10. Se usaron los cebadores P1 y P2 para los controles positivos, y se usaron los cebadores P2 y P4 para la detección de TGF β R2 mutado, como se muestra en la Tabla 9. En la Tabla 9, la columna "Cebador" indica sólo si se usó P1 o P4, ya que se usó el cebador P2 en todos los tubos.

En la columna "Muestra", "Sint." indica que se usó ADN sintético como plantilla (es decir, las muestras de control), en lugar de ADN libre obtenido de las muestras de plasma del paciente. El amortiguador usado fue el amortiguador 1X Key
 5 $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$. Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en gel y luego se secuenciaron.

Tabla 9

	Tubo	Cebador	ADN molde	Amortiguador	Muestra
	1	P1	MSI BD_001	Key	T0
10	2	P4	MSI BD_001	Key	T0
	3	P1	MSI BD_002	Key	T0
	4	P4	MSI BD_002	Key	T0
	5	P1	MSI BD_003	Key	T0
	6	P4	MSI BD_003	Key	T0
15	7	P1	MSI BD_004	Key	T0
	8	P4	MSI BD_004	Key	T0
	Tubo	Cebador	ADN molde	Amortiguador	Muestra
	9	P1	MSI BD_005	Key	T0
20	10	P4	MSI BD_005	Key	T0
	11	P1	MSS BD_006	Key	T0
	12	P4	MSS BD_006	Key	T0
	13	P1	MSS BD_007	Key	T0
25	14	P4	MSS BD_007	Key	T0

5	15	P1	MSS BD_008	Key	T0
	16	P4	MSS BD_008	Key	T0
	Tubo	Cebador	ADN molde	Amortiguador	Muestra
10	17	P1	MSS BD_009	Key	T0
	18	P4	MSS BD_009	Key	T0
	19	P1	MSS BD_010	Key	T0
	20	P4	MSS BD_010	Key	T0
	21	P1	F1, mutante	Key	Sint.
	22	P1	F2, tipo salvaje	Key	Sint.
	23	P4	F1, mutante	Key	Sint.
	24	P4	F2, tipo salvaje	Key	Sint.

Tabla 10

15	Condiciones de termociclado		
	Paso	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95°C	30 seg.
	Desnaturalización (25 ciclos)	95°C	15 seg.
	Apareamiento (25 ciclos)	56°C	15 seg.
	Extensión (25 ciclos)	68°C	45 seg.
	Extensión final	68°C	5 min.
	Retención	4°C	-

Resultados

El ADN de TGFbR2 estuvo presente en el ADNcf de todos

(10/10) los pacientes con CRC analizados. La amplificación por PCR usando los cebadores, seguida de electroforesis en gel, mostró que un desplazamiento del marco de lectura de TGFbR2 a10→a9 estaba presente en todos (5/5) los pacientes con MSI-CRC y en ninguno (0/5) de los pacientes con MSS-CRC analizados (figura 12). Estos resultados se confirmaron mediante la secuenciación de los productos de PCR de tamaño correcto extraídos del gel de electroforesis. Los productos de PCR secuenciados contenían el microsatélite a9/a10 completo, según corresponda, y se demostró que los datos de secuenciación correspondían a los resultados de la PCR.

La PCR usando el cebador modelado a9 seleccionado (P4) produjo un producto de PCR que era claramente detectable en el gel de electroforesis solo para el ADNcf de los pacientes con MSI-CRC (5/5). Los fragmentos de ADNcf de TGFbR2 eran lo suficientemente largos como para contener el microsatélite y las regiones con las que se aparea el par de cebadores de control (250 pb).

Los resultados muestran que el ADN con desplazamiento del marco de lectura de TGFbR2 a10→a9 está presente en el ADN libre de biopsias líquidas de pacientes con MSI-CRC, lo que establece que el ADN con desplazamiento del marco de lectura de TGFbR2 libre de células es un biomarcador potencial para la detección temprana del CCR hereditario (síndrome de Lynch), así como para el seguimiento de la progresión del cáncer y

remisión del MSI-CCR esporádico.

Las secuencias del ADNcf de cada paciente, extraídas de los geles de electroforesis, se muestran en la Tabla 11, en donde la longitud del microsatélite se muestra entre paréntesis al final de cada secuencia.

Tabla 11

Paciente	SEC ID NO:	Secuencia
BD_001 (MSI-H)	21	TTGGCACAGATCTCAGGTCCCACACCCTTAAGAGA AGAAACTCACCTTCTGAGAAGATGATGTTGTCATT GCACTCATCAGAGCTACAGGAACACATGAAGAAAG TCTCACCAGGCTTTTTTTTTTCCTTCATAATGCACTTT GGAAAAGCAGCATCTTCCAAAATAAAGTCATGGTAG GGGAGCTTGGGGTCATGGCAAACCTG (A9)
BD_002 (MSI-H)	22	TGGCACAGATCTCAGGTCCCACACCCTTAAGAGAA GAAACTCACCTTCTGAGAAGATGATGTTGTCATTG CACTCATCAGAGCTACAGGAACACATGAAGAAAGT CTCACCAGGCTTTTTTTTTTCCTTCATAATGCACTTTG GAGAACCAGCATCTTCCAAAATAAAGTCATGGAAGG GGAGCTTGGGGTCAGGGCAAACCTG (A9)
BD_003 (MSI-H)	23	CCGGAAAAAATTGGCACAGATCTCAGGTCCCACAC CCTTAAGAGAAGAAACTCACCTTCTGAGAAGATGA TGTTGTCATTGCACTCATCAGAGCTACAGGAACACA TGAAGAAAGTCTCACCAGGCTTTTTTTTTTCCTTCATA ATGCACTTTGGAGAAGCAGCATCTTCCAGAATAAAG TCATGGTAGGGGAGCTTGGGGTCATGGCAAACCTGT CTAA (A9)
BD_004 (MSI-H)	24	ACAGATCTCAGGTCCCACACCCTTAAGAGAAGAAAA CTCACCTTCTGAGAAGATGATGTTGTCATTGCACTC

5

10

15

20

25

		ATCAGAGCTACAGGAACACATGAAGAAAGTCTCAC CAGGCTTTTTTTTTTCCTTCATAATGCACTTTGGAAAA GCAGCATCTTCCAAAATAAAGTCATGGTAGGGGAG CTTGGGGTCATGGCA (A9)
BD_005 (MSI-H)	25	TGGCACAGATCTCAGGTCCCACACCCTTAAGAGAA GAAAACCTCACCTTCTGAGAAGATGATGTTGTCATTG CACTCATCAGAGCTACAGGAACACATGAAGAAAGT CTCACCAGGCTTTTTTTTTTCCTTCATAATGCACTTTG GAGAAGCA (A9)
BD_006 (MSS)	26	ATTGGCACAGATCTCAGGTCCCACACCCTTAAGAG AAGAAAACCTCACCTTCTGAGAAGATGATGTTGTCAT TGCACTCATCAGAGCTACAGGAACACATGAAGAAA GTCTCACCAGGCTTTTTTTTTTCCTTCAA (A10)
BD_007 (MSS)	27	TGGCACAGATCTCAGGTCCCACACCCTTAAGAGAA GAAAACCTCACCTTCTGAGAAGATGATGTTGTCATTG CACTCATCAGAGCTACAGGAACACATGAAGAAAGT CTCACCAGGCTTTTTTTTTTCCTTCATAAG (A10)
BD_008 (MSS)	28	ACAGATCTCAGGTCCCACACCCTTAAGAGAAGAAAA CTCACCTTCTGAGAAGATGATGTTGTCATTGCACTC ATCAGAGCTACAGGAACACATGAAGAAAGTCTCAC CAGGCTTTTTTTTTTCCTTCTTA (A10)
BD_009 (MSS)	29	TGGCACAGATCTCAGGTCCCACACCCTTAAGAGAA GAAAACCTCACCTTCTGAGAAGATGATGTTGTCATTG CACTCATCAGAGCTACAGGAACACATGAAGAAAGT CTCACCAGGCTTTTTTTTTTCCTTCATAA (A10)
BD_010 (MSS)	30	AGATCTCAGGTCCCACACCCTTAAGAGAAGAAAAC CACCTTCTGAGAAGATGATGTTGTCATTGCACTCAT CAGAGCTACAGGAACACATGAAGAAAGTCTCACCA GGCTTTTTTTTTTCCTTCATAA (A10)

Ejemplo VIII - Detección de la mutación de desplazamiento del marco de lectura a10→a9 de TGFbR2 a diferentes temperaturas de apareamiento

5 *i) Gradiente de temperatura PCR 1 (ajuste de parámetros)*

Este experimento tuvo como objetivo establecer un intervalo de temperaturas en donde el par de cebadores sea eficaz para aparearse sólo con el molde de ADN mutante y no con el molde de ADN de tipo salvaje.

10 Se usó ADN sintético (mutante (F1) y tipo salvaje (F2)) como plantilla para la PCR, con los cebadores P2 y P4. Las condiciones de la PCR se muestran en las Tablas 12 a 14, y la disposición del tubo de PCR y la temperatura de apareamiento usadas para cada tubo se establecen en la Tabla 15. La
15 temperatura de apareamiento osciló entre 54 °C y 60 °C.

Tabla 12: Mezcla maestra de PCR de los tubos 1 a 8

Mezcla maestra de PCR		Reacción de 50 µL	
# de muestras	8		
10x Amortiguador Key, µL	40		
10mM sNTPs, µL	8		
Cebador FW, µL	8	P2	
Cebador REV, µL	8	P4	
ADN molde, µL	8	F1	0.2 ng/µL
Taq-Polimerasa, µL	2		

ddH ₂ O, μ L	326
Total, μ L	400
Sin cebador, μ L	400
Alícuota cada tubo, μ L	50

5

Tabla 13: Mezcla maestra de PCR de los tubos 9 a 16

Mezcla maestra de PCR		Reacción de 50 μL	
# de muestras	8		
10x Amortiguador Key, μ L	40		
10mM sNTPs, μ L	8		
Cebador FW, μ L	8	P2	0.2 ng/μL
Cebador REV, μ L	8	P4	
ADN molde, μ L	8	F1	
Taq-Polimerasa, μ L	2		
ddH ₂ O, μ L	326		
Total, μ L	400		
Sin cebador, μ L	400		
Alícuota cada tubo, μ L	50		

20

Tabla 14 - Condiciones de termociclado

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	2 min.
Desnaturalización (30 ciclos)	95°C	15 seg.
Apareamiento (30 ciclos)	54-60°C	15 seg.

25

Extensiones (30 ciclos)	68°C	45 seg.
Extensión final	68°C	5 min.
Retención	4°C	-

5 Tabla 15 - Diseño del tubo de PCR y temperatura de apareamiento

Tubo	Cebador	Fragmento de ADN	Amortiguador	Longitud	Temp.
1	P4	F1, mutante	Key	102 pb	60°C
2	P4	F1, mutante	Key	102 pb	59.7°C
3	P4	F1, mutante	Key	102 pb	59°C
4	P4	F1, mutante	Key	102 pb	57.8°C
5	P4	F1, mutante	Key	102 pb	46.4°C
6	P4	F1, mutante	Key	102 pb	55.2°C
7	P4	F1, mutante	Key	102 pb	54.4°C
8	8	F1, mutante	Key	102 pb	54°C

Amortiguador Key

Tubo	Cebador	Fragmento de ADN	Amortiguador	Longitud	Temp.
9	P4	F2, tipo salvaje	Key	102 pb	60°C
10	P4	F2, tipo salvaje	Key	102 pb	59.7°C
11	P4	F2, tipo salvaje	Key	102 pb	59°C
12	P4	F2, tipo salvaje	Key	102 pb	57.8°C
13	P4	F2, tipo salvaje	Key	102 pb	56.4°C
14	P4	F2, tipo salvaje	Key	102 pb	55.2°C

15	P4	F2, tipo salvaje	Key	102 pb	54.4°C
16	P4	F2, tipo salvaje	Key	102 pb	54°C

Amortiguador Key

5 La figura 13 muestra los geles de electroforesis de los productos de PCR. Está claro que la interacción cebador-plantilla de tipo salvaje se debilita más a temperaturas que oscilan entre aproximadamente 57.8 °C y más en comparación con la interacción cebador-plantilla mutante. Además, a
10 aproximadamente 59 °C, la interacción cebador-plantilla de tipo salvaje se altera más o menos por completo. La interacción cebador-plantilla mutante sigue siendo fuerte y el cebador aún tiene una alta afinidad incluso a altas temperaturas.

15 *ii) Gradiente de temperatura PCR 2 (ajuste de parámetros)*

 Este experimento se llevó a cabo para establecer aún más un intervalo de temperaturas en donde el par de cebadores sea eficaz para aparearse sólo con el molde de ADN mutante.

20 Al igual que con la parte i) anterior, se usó ADN sintético (mutante (F1; SEC ID NO: 20) y de tipo salvaje (F2; SEC ID NO: 19)) como plantilla para la PCR, con los cebadores P2 y P4. Las condiciones de la PCR se muestran en las Tablas 16 a 18, y la disposición del tubo de PCR y la temperatura de apareamiento usadas para cada tubo se establecen en la Tabla 19.
25 La temperatura de apareamiento osciló entre 57 °C y 62 °C.

Tabla 16 - Mezcla maestra de PCR de los tubos 1 a 8

Mezcla maestra de PCR		Reacción de 50 μ L	
5	# de muestras	8	
	10x Amortiguador Key, μ L	40	
	10mM sNTPs, μ L	8	
	Cebador FW, μ L	8	P2
	Cebador REV, μ L	8	P4
10	ADN molde, μ L	8	F1
	Taq-Polimerasa, μ L	2	
	ddH ₂ O, μ L	326	
	Total, μ L	400	
	Sin cebador, μ L	400	
	Alícuota cada tubo, μ L	50	
			0.2 ng/μL

Tabla 17: Mezcla maestra de PCR de los tubos 1 a 9

Mezcla maestra de PCR		Reacción de 50 μ L	
20	# de muestras	8	
	10x Amortiguador Key, μ L	40	
	10mM sNTPs, μ L	8	
	Cebador FW, μ L	8	P2
	Cebador REV, μ L	8	P4
25	ADN molde, μ L	8	F1
	Polimerasa Taq, μ L	2	
	ddH ₂ O, μ L	326	
	Total, μ L	400	
			0.2 ng/μL

Sin cebador, µL	400
Alícuota cada tubo, µL	50

Tabla 18 - Condiciones de termociclado

5	Paso	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95°C	2 min.
	Desnaturalización (30 ciclos)	95°C	15 seg.
	Apareamiento (30 ciclos)	57-62°C	15 seg.
	Extensiones (30 ciclos)	68°C	45 seg.
10	Extensión final	68°C	5 min.
	Retención	4°C	-

Tabla 19 - Diseño del tubo de PCR y temperatura de apareamiento

	Tubo	Cebador	Fragmento de ADN	Amortiguador	Longitud	Temp.
15	1	P4	F1, mutante	Key	102 pb	61°C
	2	P4	F1, mutante	Key	102 pb	61.7°C
	3	P4	F1, mutante	Key	102 pb	61.2°C
	4	P4	F1, mutante	Key	102 pb	60.2°C
	5	P4	F1, mutante	Key	102 pb	59°C
20	6	P4	F1, mutante	Key	102 pb	58°C
	7	P4	F1, mutante	Key	102 pb	57.3°C
	8	8	F1, mutante	Key	102 pb	57°C

Amortiguador Key

25	Tubo	Cebador	Fragmento de	Amortiguador	Longitud	Temp.
----	-------------	----------------	---------------------	---------------------	-----------------	--------------

		ADN			
	9	P4	F2, tipo salvaje	Key	102 pb 62°C
	10	P4	F2, tipo salvaje	Key	102 pb 61.7°C
	11	P4	F2, tipo salvaje	Key	102 pb 61.2°C
5	12	P4	F2, tipo salvaje	Key	102 pb 60.2°C
	13	P4	F2, tipo salvaje	Key	102 pb 59°C
	14	P4	F2, tipo salvaje	Key	102 pb 58°C
	15	P4	F2, tipo salvaje	Key	102 pb 57.3°C
	16	P4	F2, tipo salvaje	Key	102 pb 57°C

10 Amortiguador Key

Las figuras 14A-14B muestran los geles de electroforesis de los productos de PCR y muestra que incluso a temperaturas inferiores a 57.8 °C mencionadas en la parte i) anterior, la interacción cebador-plantilla de tipo salvaje se interrumpe y la afinidad del cebador es casi inexistente. En particular, las figuras 14A-14B muestran que la interacción cebador-plantilla de tipo salvaje se interrumpe a 57 °C. Sin embargo, la afinidad del cebador hacia el molde mutante sigue siendo fuerte en comparación en las mismas condiciones.

20 Ejemplo IX - Detección de la mutación de desplazamiento del marco de lectura a10→a9 de TGFbR2 usando amortiguador Taq (KCl) estándar

Este experimento se llevó a cabo para evaluar la eficacia de los cebadores en mezclas de PCR que comprenden

amortiguador Taq estándar (KCl). Se usó ADN sintético (mutante (F1) y de tipo salvaje (F2)) como plantilla para la PCR. Los cebadores P1 y P4 se usaron cada uno con el cebador P2. Las Tablas 20 y 21 establecen las condiciones de la PCR, y los
 5 cebadores y el amortiguador usados para cada tubo se establecen en la Tabla 22.

Tabla 20 - Condiciones de PCR para el amortiguador Taq estándar

Mezcla maestra de PCR (Taq)		Reacción de 50µL
# de muestras	4	
Amortiguador Taq 10x, µL	20	
dNTPs 10mM, µL	4	
Cebador FW, µL	4	P2
Cebador REV, µL	4	Añadido por separado
ADN molde, µL	4	Añadido por separado
Taq Polimerasa, µL	1	
ddH ₂ O, µL	163	
Total, µL	200	
Mezcla maestra total, µL	192	
Alícuota cada tubo, µL	48	

Tabla 21 - Condiciones de termociclado

Condiciones de

termociclado

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	30 seg.
Desnaturalización (25 ciclos)	95°C	15 seg.
Apareamiento (25 ciclos)	58°C	15 seg.
Extensión (25 ciclos)	68°C	45 seg.
Final extensión	68°C	5 min.
Retención	4°C	-

Tabla 22 - Configuración del tubo

Tubo	Cebador	Plantilla	Volumen	Amortiguador
1	P1	F1	1 µL	Taq
2	P4	F1	1 µL	Taq
3	P1	F2	1 µL	Taq
4	P4	F2	1 µL	Taq

La figura 15 muestra los geles de electroforesis de los productos de PCR y muestra que, para una temperatura alta y uniforme en todo el termociclador, el amortiguador Taq estándar es estable y produce condiciones que conservan la afinidad del cebador-modelo mutante. La afinidad entre el cebador y la plantilla de tipo salvaje se pierde y la interacción se interrumpe hasta un punto en donde se produce una cantidad mínima de fragmentos.

Ejemplo X - Detección de mutaciones de desplazamiento del marco de lectura ASTE1 a11→a10

Se diseñó un panel de cebadores de PCR para la detección de ASTE1 mutado de forma similar a los cebadores de TGFβR2 del Ejemplo I.

Los cebadores P11 y P12 son cebadores directos e inversos de control positivo, respectivamente, que se aparean con la secuencia de ASTE1 tanto de tipo salvaje como mutante. Estos cebadores detectan la presencia de ASTE1 independientemente de la presencia o ausencia de la mutación de desplazamiento de marco de a11 a a10 (es decir, P11 y P12 no son específicos de mutantes) y garantizan resultados confiables y que se cumplan todos los criterios para ejecutar la PCR (sin señal del control = PCR fallida).

Los cebadores mutantes ASTE1 se diseñaron con la variante mutante ASTE1 como objetivo principal, y cada cebador alberga la secuencia del microsatélite a10. Al igual que con los cebadores TGFβR2 en los Ejemplos I y II, la secuencia 10a más corta, en lugar de la secuencia 11a de tipo salvaje, introduce una falta de coincidencia entre el ASTE1 de tipo salvaje y el extremo 3' de los cebadores. Al introducir de una a cuatro no coincidencias (sustituciones de nucleótidos seleccionados aleatoriamente) en los cebadores, 3' del microsatélite, se refuerza la repulsión de las no coincidencias entre los cebadores y la secuencia ASTE1 de tipo salvaje.

Los cebadores ASTE1 P16 y P24 se probaron usando un protocolo similar al del Ejemplo VIII, para establecer un intervalo de temperaturas en donde los cebadores son eficaces para aparearse sólo con el molde de ADN mutante, y no con el molde de ADN de tipo salvaje. También se usó el cebador inverso P12 de control positivo a un intervalo de temperaturas. El cebador P11 se usó como cebador positivo en todos los experimentos. Se usaron fragmentos sintéticos de ADN de ASTE1 que comprendían los microsatélites de tipo salvaje (a11) o mutantes (a10) para la configuración de la PCR (denominados F4 y F3, respectivamente; SEC ID NO: 32 y 33, respectivamente).

La mezcla maestra de PCR usada para cada PCR se muestra en la Tabla 23 a continuación, mientras que las condiciones de la PCR se muestran en la Tabla 24. Se usó una temperatura de apareamiento diferente para cada PCR, tal como se muestra en las Tablas 25-27 y figuras 16-18. Se usó amortiguador estándar (KCl) para todas las PCR. P11 se usó como cebador directo para todas las PCR.

Tabla 23 - Mezcla maestra de PCR

Mezcla maestra de PCR (Taq)		Reacción de 50µL
# de muestras	16	
Amortiguador Taq 10x, µL	80	
dNTPs 10mM, µL	16	
Cebador FW, µL	16	P11
Cebador REV, µL	16	Añadido por separado
ADN molde, µL	16	Añadido por separado

Polimerasa Taq, μL	4
ddH ₂ O, μL	652
Total, μL	800
Mezcla maestra total, μL	768
Alícuota cada tubo, μL	48

Tabla 24 - Condiciones de termociclado

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	30 seg.
Desnaturalización (25 ciclos)	95°C	15 seg.
Apareamiento (25 ciclos)	Variable	15 seg.
Extensión (25 ciclos)	68°C	45 seg.
Extensión final	68°C	5 min.
Retención	4°C	-

Tabla 25 - Temperatura de apareamiento de PCR para el cebador

P16

Mutante P16-(F3) pocillo no.	P16-WT (F4) pocillo no.	Temp. de apareamiento (°C)
1	1	48
2	2	48.7
3	3	50
4	4	51.9
5	5	54.3
6	6	56.3
7	7	57.4

8	8	58
---	---	----

Tabla 26 - Temperatura de apareamiento de PCR para el cebador

P24

5

P24-M (F3) pocillo no.	P24-Wt (F4) pocillo no.	Temp. de apareamiento (°C)
1	1	44
2	2	44.9
3	3	46.8
4	4	49.5
5	5	52.8
6	6	55.6
7	7	57.2
8	8	58

10

15

Tabla 27 - Temperatura de apareamiento de PCR para el cebador

P12

20

P12-F3 pocillo no.	P12-F4 pocillo no.	Temp. de apareamiento (°C)
1	1	49
2	2	49.2
3	3	49.6
4	4	50.2
5	5	50.9
6	6	51.5

25

7	7	51.8
8	8	52

Resultados

5 Las figuras 16A-16B, 17A-17B y 18A-18B muestran los resultados de estas PCR usando diferentes temperaturas de apareamiento. En particular, estas figuras muestran que los cebadores diseñados basándose en a10 mutante ASTE1 (es decir, P16 y P24) son específicos para a10 mutante ASTE1 y producen
10 productos de PCR mucho más bajos, o nulos, cuando ASTE1 de tipo salvaje es el molde. Las figuras 18A-18B muestran que P12 puede usarse para amplificar ASTE1 tanto de tipo salvaje como mutante a10, de manera que puede usarse como cebador de control positivo.

15 Referencias

Cortes-Ciriano, I; Lee, S; Park WY; Kim TM; Park; PJ *et al.* (6 Junio 2017) "A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers". Nature Communications. 8(15180): 1-12.

20 Iannuzzi, MC; Stern, RC; Collins, FS; Hon, CT; Hidaka, N; Strong, T; Becker, L; Drumm, ML; White, MB; Gerrard, B (Febrero 1991). "Two frameshift mutations in the cystic fibrosis gene". American Journal of Human Genetics. 48 (2): 227-31. PMC 1683026. PMID 1990834.

25 Maby, P; Tougeron, D; Hamieh, M; *et al* (Septiembre 1

2015). "Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy". *Cancer Research*. 75 (17): 3446-3455.

5 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH (Mayo 31, 2001). "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease" (PDF).
10 *Nature*. 411 (6837): 603-6. doi:10.1038/35079114. hdl:2027.42/62856. PMID 11385577. S2CID 205017657.

Allawi HT, SantaLucia J (1997) Thermodynamics and NMR of internal G-T mismatches in DNA. *Biochemistry* 36(34), p10581-10594.

15 Tabla 28 - Secuencias

	SEC ID			
Cebador	NO:	Dirección 5' - 3'	Secuencia	Objetivo
P1	1	Indirecto	CAGTGTCATAGAGCACATTCCT	TGFbR2
P2	2	Directo	AGACAGTTTGCCATGACCC	TGFbR2
P4	3	Indirecto	GTCTCACCAGGCTTTTTTTTC <u>G</u>	TGFbR2
P4.1	6	Indirecto	GTCTCACCAGGCTTTTTTTT <u>CCG</u>	TGFbR2
P4.2	7	Indirecto	GTCTCACCAGGCTTTTTTTT <u>ACCG</u>	TGFbR2
P5	8	Indirecto	GTCTCACCAGGCTTTTTTTTCC	TGFbR2

	P6	4	Indirecto	GTCTCACCAGGCTTTTTTTT <u>ACG</u>	TGFbR2
	P10	5	Indirecto	CACCAGGCTTTTTTTT <u>ATCG</u> TTC	TGFbR2
	P10.1	9	Indirecto	CACCAGGCTTTTTTTT <u>ATCGTC</u> C	TGFbR2
	P11	10	Directo	ATGTCCTGAGGCTAAGC	ASTE1
5	P12	11	Indirecto	CACTGCACACACCAAGT	ASTE1
	P12.1	38	Indirecto	CACTGCACACACCAAGTG	ASTE1
	P13	12	Indirecto	GTTTCTTCTGCCTTTTTTTT <u>ATCG</u>	ASTE1
	P14	13	Indirecto	GTTTCTTCTGCCTTTTTTTT <u>GTCG</u>	ASTE1
	P15	14	Indirecto	GTTTCTTCTGCCTTTTTTTT <u>ACG</u>	ASTE1
10	P16	15	Indirecto	GTTTCTTCTGCCTTTTTTTT <u>AAATCG</u>	ASTE1
	P17	16	Indirecto	GTTTCTTCTGCCTTTTTTTT <u>ACTCG</u>	ASTE1
	P24	31	Indirecto	CTTTTTTTT <u>CTGAATGTGATCTCC</u>	ASTE1
	P4x	39	Indirecto	GTCTCACCAGGCTTTTTTTTTTC x	TGFbR2
	P16x	40	Indirecto	GTTTCTTCTGCCTTTTTTTT <u>x₁x₂Tx₃</u> G	ASTE1
15	P24x	41	Indirecto	CTTTTTTTT <u>x₄</u> TGAAT <u>x₅</u> TGATCT <u>x₆</u> C	ASTE1
	Objetivo de microsatélite TGFbR2 mutante, a9 (SEC ID NO: 17)			GGAAAAAAAAAGCCTGGTGAGAC	
	Objetivo de microsatélite TGFbR2 de tipo salvaje, a10 (SEC ID NO: 18)			GGAAAAAAAAAGCCTGGTGAGAC	

20

(las bases subrayadas en negrita muestran discrepancias con la secuencia objetivo)

SEC ID NO: 19 - Fragmento de TGFbR2 tipo salvaje (a10) ; F2

25

5' TGCGAATGCTGGAGAACAGGAACCAGCTGCCGTTGTTAGGAACAACCTTCATGAAGGAAA

AGTATTCCAGATTGCCTTTCTGTCTGGAGGCCATATTATTCATTTATTCTCTTTCTCTCTC
 TCCCTCTCCCCTCGCTTCCAATGAATCTCTTCACTCTAGGAGAAAGAATGACGAGAACATA
 AACTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATG
 CTGCTTCTCCAAAGTGCATTATGAAGG**AAAAAAAAAA**GCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTG
 5 TCCCTGTAGCTCTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGGTGAGTTTCTTCT
 CTTAAGGGTGTGGGACCTGAGATCTGTGCCAATTTTTTGTATCCTTGGTCTGCAGTGTGAT
 AGAGCACATTCTCCTGTGGTGGATTGCATAC3'

SEC ID NO: 20 - Fragmento de TGFbR2 mutante (a9); F1

5' TGCGAATGCTGGAGAACAGGAACCAGCTGCCGTTGTTAGGAACAACATTCATGAAGGAAA
 10 AGTATTCCAGATTGCCTTTCTGTCTGGAGGCCATATTATTCATTTATTCTCTTTCTCTCTC
 TCCCTCTCCCCTCGCTTCCAATGAATCTCTTCACTCTAGGAGAAAGAATGACGAGAACATA
 AACTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATG
 CTGCTTCTCCAAAGTGCATTATGAAGG**AAAAAAAAAA**GCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGT
 TCCTGTAGCTCTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGGTGAGTTTCTTCTC
 15 TTAAGGGTGTGGGACCTGAGATCTGTGCCAATTTTTTGTATCCTTGGTCTGCAGTGTGATA
 GAGCACATTCTCCTGTGGTGGATTGCATAC3' (selección en negrita de
 residuos 270 a 278)

SEC ID NO: 32 - Fragmento de ASTE1 tipo salvaje (a11);

F4

20 5' AGAGTTCCAAAGAGTGAAGGCGCAGACACGGCTGGGCACAAGACTGGACTTAGACACAG
 CTCACATCTTCTGTCAGTGGCAGTCCTGTCTCCAGATGGGGATGTATCTCAACCAGCTGCT
 GTCCACTCCTCTCCCAGAGCCAGACCTAACTCGACTGTACAGTGGAAGCCTGGTGCACGGA
 CTATGCCAGCAACTGCTAGCATCGACCTCTGTAGAAAGTCTCCTGAGCATATGTCCTGAGG
 CTAAGCAACTTTATGAATATCTATTCAATGCCACAAGGTCATATGCCCCCGCTGAAATATT
 25 CCTACCAAAGGTAGATCAAATTC**AAAAAAAAAA**GGCAGAAGAAACAGAATACCAGCTGT

TCTAAGAACAGAGGGAGAACCACTGCACACACCAAGTGTGTTGGTATGAGGGAAACAACCGGT
 TTGGGTTGTTAATGGTTGAAAACCTTAGAGGAACATAGTGAGGCCTCCAACATTGAATAAAA
 CTCAGTTTG3'

SEC ID NO: 33 -ASTE1 mutante (a10); F3

5 5' AGAGTTCCAAAGAGTGAAGGCGCAGACACGGCTGGGCACAAGACTGGACTTAGACACAG
 CTCACATCTTCTGTCAGTGGCAGTCCTGTCTCCAGATGGGGATGTATCTCAACCAGCTGCT
 GTCCACTCCTCTCCCAGAGCCAGACCTAACTCGACTGTACAGTGGAAGCCTGGTGCACGGA
 CTATGCCAGCAACTGCTAGCATCGACCTCTGTAGAAAGTCTCCTGAGCATATGTCCTGAGG
 CTAAGCAACTTTATGAATATCTATTCAATGCCACAAGGTCATATGCCCCCGCTGAAATATT
 10 CCTACCAAAGGTAGATCAAATTC**AAAAAAAAAA**GGCAGAAGAAACAGAATACCAGCTGTT
 CTAAGAACAGAGGGAGAACCACTGCACACACCAAGTGTGTTGGTATGAGGGAAACAACCGGTT
 TGGGTTGTTAATGGTTGAAAACCTTAGAGGAACATAGTGAGGCCTCCAACATTGAATAAAAC
 TCAGTTTG3'

SEC ID NO: 34 -TGFB2 tipo salvaje (a10) (longitud

15 **completa)**
 ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGACGCGTATCG
 CCAGCACGATCCCACCGCACGTTTCAGAAGTCGGATGTGGAAATGGAGGCCAGAAAGATGA
 AATCATCTGCCCCAGCTGTAATAGGACTGCCCATCCACTGAGACATATTAATAACGACATG
 ATAGTCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTGTAAATTTTGTGATGTGA
 20 GATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTG
 TGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTA
 GAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTT
 CTCCAAAGTGCATTATGAAGG**AAAAAAAAAA**GCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCCCTG
 TAGCTCTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCCT
 25 GACTTGTTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTG

CCATATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAACCGGCAGCAGAAGCTGAGTTC
 AACCTGGGAAACCGGCAAGACGCGGAAGCTCATGGAGTTCAGCGAGCACTGTGCCATCATC
 CTGGAAGATGACCGCTCTGACATCAGCTCCACGTGTGCCAACAACATCAACCACAACACAG
 AGCTGCTGCCCATTGAGCTGGACACCCTGGTGGGGAAAGGTCGCTTTGCTGAGGTCTATAA
 5 GGCCAAGCTGAAGCAGAACACTTCAGAGCAGTTTGAGACAGTGGCAGTCAAGATCTTTCCC
 TATGAGGAGTATGCCTCTTGGAAGACAGAGAAGGACATCTTCTCAGACATCAATCTGAAGC
 ATGAGAACATACTCCAGTTCCTGACGGCTGAGGAGCGGAAGACGGAGTTGGGGAAACAATA
 CTGGCTGATCACCGCCTTCCACGCCAAGGGCAACCTACAGGAGTACCTGACGCGGCATGTC
 ATCAGCTGGGAGGACCTGCGCAAGCTGGGCAGCTCCCTCGCCCGGGGGATTGCTCACCTCC
 10 ACAGTGATCACACTCCATGTGGGAGGCCCAAGATGCCCATCGTGACAGGGACCTCAAGAG
 CTCCAATATCCTCGTGAAGAACGACCTAACCTGCTGCCTGTGTGACTTTGGGCTTTCCTTG
 CGTCTGGACCCTACTCTGTCTGTGGATGACCTGGCTAACAGTGGGCAGGTGGGAACTGCAA
 GATACATGGCTCCAGAAGTCCTAGAAATCCAGGATGAATTTGGAGAATGTTGAGTCCTTCAA
 GCAGACCGATGTCTACTCCATGGCTCTGGTGCTCTGGGAAATGACATCTCGCTGTAATGCA
 15 GTGGGAGAAGTAAAAGATTATGAGCCTCCATTTGGTTCCAAGGTGCGGGAGCACCCCTGTG
 TCGAAAGCATGAAGGACAACGTGTTGAGAGATCGAGGGCGACCAGAAATCCCAGCTTCTG
 GCTCAACCACCAGGGCATCCAGATGGTGTGTGAGACGTTGACTGAGTGCTGGGACCACGAC
 CCAGAGGCCCCGTCTCACAGCCCAGTGTGTGGCAGAACGCTTCAGTGAGCTGGAGCATCTGG
 ACAGGCTCTCGGGGAGGAGCTGCTCGGAGGAGAAGATTCTGAAGACGGCTCCCTAAACAC
 20 TACCAAATAG

SEC ID NO: 35 - a9 TGFB2 (longitud completa)

ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGACGCGTATCG
 CCAGCACGATCCCACCGCACGTTTCAAGTCGGATGTGGAAATGGAGGCCAGAAAGATGA
 AATCATCTGCCCCAGCTGTAATAGGACTGCCCATCCACTGAGACATATTAATAACGACATG
 25 ATAGTCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTGTAAATTTTGTGATGTGA

GATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTG
 TGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTA
 GAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTT
 CTCCAAAGTGCATTATGAAGG**AAAAAAAAA**GCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCCCTGT
 5 AGCTCTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCCTG
 ACTTGTTGCTAG

SEC ID NO: 36 - ASTE1 tipo salvaje (A11) (longitud completa)

ATGGCCCATTCCTTTCTGTTGGTGGGAGTGGGTACGTATGTCCCTTACTCATCCGGGAAG
 10 TATTCATACAGGTTTTGATCAAGCTGCGGGTGTGTTTTGTCCAGTGCTTTTCAGAAGCAGA
 TCGGGACATTATGACACTTGCTAACCATTGGAATTGCCCTGTGTTATCATCAGATAGTGAC
 TTTTGCATTTTTGACCTGAAAAGTGGGTTTTGCCCATTTGAATAGCTTTTCAGTGGAGAAATA
 TGAACACTATTAAGGGCACACAAAAGTATATCCCTGCCAAATGCTTTTCCCTTGATGCATT
 CTGCCATCACTTCAGCAATATGAATAAAGCTCTACTACCTCTCTTTGCGGTGCTATGTGGA
 15 AATGACCATGTTAATCTACCCATCATGGAGACATTCTTAAGTAAAGCGCGTCTTCCTCTTG
 GAGCTACCAGTTCTAAAGGGAGGAGACACCACCGAATCCTGGGACTTCTGAATTGGTTGTC
 TCATTTTGCCAACCCTACCGAAGCACTAGATAATGTTCTGAAATACCTCCCCAAAAAGGAT
 CGAGAAAATGTTAAGGAAGTCTCTGCTGTTCCATGGAAGAATACCAACAGTCCCAGGTGA
 AGCTACAGGACTTCTTCCAGTGTGGTACTTATGTCTGTCCAGATGCCTTGAATCTTGTTTT
 20 ACCAGAATGGGTATTAGTGGCTTTAGCTAAAGGCCAGCTATCTCCTTTTCATCAGTGATGCT
 TTGGTCCTAAGACGGACCATTTCTTCCCACACAGGTGGAAAACATGCAGCAACCAAATGCCC
 ACAGAATATCTCAGCCCATCAGGCAAATCATCTATGGGCTTCTTTTAAATGCCTCACCACA
 TCTGGACAAGACATCCTGGAATGCATTGCCTCCTCAGCCTCTAGCTTTTCAGTGAAGTGGAA
 AGGATTAATAAAAAATATCAGAACCTCAATCATTGATGCAGTAGAACTGGCCAAGGATCATT
 25 CTGACTTAAGCAGATTGACTGAGCTCTCCTTGAGGAGGCGGCAGATGCTTCTGTTAGAAAC

CCTGAAGGTGAAACAGACCATTCTGGAGCCAATCCCTACTTCACTGAAGTTGCCCATTTGCT
 GTCAGTTGCTACTGGTTGCAGCACACCGAGACCAAAGCAAAGCTACATCATCTACAATCCT
 TACTGCTCACAATGCTAGTGGGGCCCTTGATTGCCATAATCAACAGCCCTGGTAAGGAAGA
 GCTGCAGGAAGATGGTGCTAAGATGTTGTATGCAGAGTTCCAAAGAGTGAAGGCGCAGACA
 5 CGGCTGGGCACAAGACTGGACTTAGACACAGCTCACATCTTCTGTCAGTGGCAGTCCTGTC
 TCCAGATGGGGATGTATCTCAACCAGCTGCTGTCCACTCCTCTCCCAGAGCCAGACCTAAC
 TCGACTGTACAGTGGAAGCCTGGTGCACGGACTATGCCAGCAACTGCTAGCATCGACCTCT
 GTAGAAAGTCTCCTGAGCATATGTCCTGAGGCTAAGCAACTTTATGAATATCTATTCAATG
 CCACAAGGTCATATGCCCCCGCTGAAATATTCTTACCAAAGGTAGATCAAATTC**AAAAAA**
 10 **AAAAA**GGCAGAAGAAACAGAATACCAGCTGTTCTAAGAACAGAGGGAGAACCACTGCACAC
 ACCAAGTGTTGGTATGAGGGAAACAACCGGTTTGGGTTGTTAATGGTTGAAAACCTTAGAGG
 AACATAGTGAGGCCTCCAACATTGAATAA

SEC ID NO: 37 - a10 ASTE1 (longitud completa)

ATGGCCCATTCCTTTCTGTTGGTGGGAGTGGGTACGTATGTCCCTTACTCATCCGGGAAG
 15 TATTCATACAGGTTTTGATCAAGCTGCGGGTGTGTTTTGTCCAGTGCTTTTCAGAAGCAGA
 TCGGGACATTATGACACTTGCTAACCATTGGAATTGCCCTGTGTTATCATCAGATAGTGAC
 TTTTGCATTTTTGACCTGAAAACCTGGGTTTTGCCCATTGAATAGCTTTTCAGTGGAGAAATA
 TGAACACTATTAAGGGCACACAAAACCTATATCCCTGCCAAATGCTTTTCCCTTGATGCATT
 CTGCCATCACTTCAGCAATATGAATAAAGCTCTACTACCTCTCTTTGCGGTGCTATGTGGA
 20 AATGACCATGTTAATCTACCCATCATGGAGACATTCTTAAGTAAAGCGCGTCTTCCTCTTG
 GAGCTACCAGTTCTAAAGGGAGGAGACACCACCGAATCCTGGGACTTCTGAATTGGTTGTC
 TCATTTTGCCAACCCTACCGAAGCACTAGATAATGTTCTGAAATACCTCCCAAAAAGGAT
 CGAGAAAATGTTAAGGAACTTCTCTGCTGTTCCATGGAAGAATACCAACAGTCCCAGGTGA
 AGCTACAGGACTTCTTCCAGTGTGGTACTTATGTCTGTCCAGATGCCTTGAATCTTGGTTT
 25 ACCAGAATGGGTATTAGTGGCTTTAGCTAAAGGCCAGCTATCTCCTTTTCATCAGTGATGCT

TTGGTCCTAAGACGGACCATTCTTCCCACACAGGTGGAAAACATGCAGCAACCAAATGCCC
ACAGAATATCTCAGCCCATCAGGCAAATCATCTATGGGCTTCTTTTAAATGCCTCACCACA
TCTGGACAAGACATCCTGGAATGCATTGCCTCCTCAGCCTCTAGCTTTTCAGTGAAGTGGAA
AGGATTAATAAAAAATATCAGAACCTCAATCATTGATGCAGTAGAACTGGCCAAGGATCATT
5 CTGACTTAAGCAGATTGACTGAGCTCTCCTTGAGGAGGCGGCAGATGCTTCTGTTAGAAAC
CCTGAAGGTGAAACAGACCATTCTGGAGCCAATCCCTACTTCACTGAAGTTGCCCATTGCT
GTCAGTTGCTACTGGTTGCAGCACACCGAGACCAAAGCAAAGCTACATCATCTACAATCCT
TACTGCTCACAATGCTAGTGGGGCCCTTGATTGCCATAATCAACAGCCCTGGTAAGGAAGA
GCTGCAGGAAGATGGTGCTAAGATGTTGTATGCAGAGTTCCAAAGAGTGAAGGCGCAGACA
10 CGGCTGGGCACAAGACTGGACTTAGACACAGCTCACATCTTCTGTCAGTGGCAGTCCTGTC
TCCAGATGGGGATGTATCTCAACCAGCTGCTGTCCACTCCTCTCCCAGAGCCAGACCTAAC
TCGACTGTACAGTGGAAGCCTGGTGCACGGACTATGCCAGCAACTGCTAGCATCGACCTCT
GTAGAAAGTCTCCTGAGCATATGTCCTGAGGCTAAGCAACTTTATGAATATCTATTCAATG
CCACAAGGTCATATGCCCCCGCTGAAATATTCTTACCAAAGGTAGATCAAATTC**AAAAAA**
15 **AAAA**GGCAGAAGAAACAGAATACCAGCTGTTCTAAGAACAGAGGGAGAACCACTGCACACA
CCAAGTGTTGGTATGAGGGAAACAACCGGTTTGGGTTGTAA

20

25