

REIVINDICACIONES

1. Un cebador para la detección de una mutación en un microsatélite contenido en una secuencia objetivo de una molécula de ADN bicatenario, caracterizado porque 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 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 tampoco coinciden con una secuencia correspondiente que contiene el microsatélite de tipo salvaje, en donde el cebador está configurado para aparearse a lo largo de la longitud del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco y para aparearse con al menos un nucleótido, o al menos dos nucleótidos, que flanquean el extremo 5' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco y al menos un nucleótido que flanquea el extremo 3' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco.

2. El cebador de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque consiste en entre 16 y 30 nucleótidos.

3. El cebador de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque al menos un nucleótido no coincidente está ubicado en una posición del cebador que está configurado para aparearse 3' cadena abajo del microsatélite o dentro del microsatélite, preferiblemente en donde al menos un nucleótido no coincidente está dentro de cuatro nucleótidos 5' cadena arriba o 3' cadena abajo del extremo 3' del microsatélite.

4. 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, caracterizado porque comprende un primer cebador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 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 que está configurado para aparearse el primer cebador.

5. El kit de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque 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 cebador, o

otro par de cebadores de control, preferiblemente en donde la secuencia que contiene el microsatélite de tipo salvaje consiste en la secuencia definida en SEC ID NO: 19 o SEC ID NO: 32, y preferiblemente el tercer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 11 o SEC ID NO: 38.

6. Un cebador para la amplificación de ADN, caracterizado porque comprende la secuencia definida por cualquiera de SEC ID NO: 3, 4, 5, 7, 15, 31, 39, 40 o 41.

7. 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, caracterizado porque 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 en donde el primer cebador está configurado para aparearse a lo largo de la longitud del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco y para aparearse 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, o al menos dos nucleótidos, que flanquean el extremo 5' del microsatélite que tiene una mutación de desplazamiento de marco;

y en donde 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.

8. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque 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 primero 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 comprende ADN humano y agregar a la segunda alícuota los componentes necesarios para la amplificación del ADN y:

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 una segunda mezcla de reacción, 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.

9. El método de conformidad con las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado porque 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.

10. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque 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, preferiblemente en donde el método comprende además el paso f) de cortar la banda para la secuenciación del ADN.

11. El kit de conformidad con la reivindicación 4 o

5, o el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizado porque:

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, y en donde 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

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.

12. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque:

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 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.

13. Un método para diagnosticar una enfermedad asociada con una mutación de desplazamiento de marco en un microsatélite, caracterizado porque comprende llevar a cabo el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12.

14. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque comprende además determinar que un paciente que sufra 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 en donde la enfermedad o trastorno asociado con una mutación de desplazamiento de marco es un cáncer, y más preferiblemente: en donde el cáncer es cáncer colorrectal o cáncer gástrico, y el tratamiento dirigido a la mutación de desplazamiento de marco es FMPV-1, y 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, o el cáncer es cáncer de endometrio o cáncer gástrico y el tratamiento 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.

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque:

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 en donde el tercer cebador comprende la secuencia definida por SEC ID NO: 1, preferiblemente en donde 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 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, preferiblemente 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.

16. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, caracterizado porque la muestra es una biopsia líquida que comprende ADN libre de células, preferiblemente en donde la biopsia líquida es plasma.

17. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16, caracterizado porque la amplificación del 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 una 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 apareamiento recomendada de la reacción;

b) llevar a cabo el paso de apareamiento 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

e) llevar a cabo 30 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, o 10 o menos ciclos de PCR.