

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2002.03.15</b>	(73) Titular(es): <b>GENZYME CORPORATION</b> <b>500 KENDALL STREET CAMBRIDGE, MA 02142</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2001.03.15 US 809713</b> <b>2001.11.20 US 988491</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2003.12.10</b>	(72) Inventor(es): <b>ANTHONY P. SHUBER</b> <b>US</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2010.09.22</b> <b>239/2010</b>	(74) Mandatário: <b>JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO</b> <b>R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA DETECÇÃO DE ALTERAÇÃO EM ÁCIDOS NUCLEICOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO FORNECE MÉTODOS PARA DETECTAR UMA ALTERAÇÃO OU A AUSÊNCIA DE UMA ALTERAÇÃO NUM ÁCIDO NUCLEICO ALVO. OS MÉTODOS DA INVENÇÃO SÃO ÚTEIS PARA A DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES QUE SÃO INDICATIVAS DE DOENÇA OU DE PREDISPOSIÇÃO PARA DOENÇA. OS MÉTODOS DA INVENÇÃO ENVOLVEM ANELAMENTO DE UMA SÉRIE DE SONDAS A UM ÁCIDO NUCLEICO ALVO E DETECÇÃO DA PRESENÇA DE UMA MUTAÇÃO NO REFERIDO ÁCIDO NUCLEICO ALVO SE UMA DAS SONDAS FALHAR EM ANELAR, EXPONDO ASSIM UM TRECHO DE FITA SIMPLES DO ÁCIDO NUCLEICO QUE É SUSCEPTÍVEL À DEGRADAÇÃO.

**RESUMO****MÉTODO PARA DETECÇÃO DE ALTERAÇÃO EM ÁCIDOS NUCLEICOS**

A presente invenção fornece métodos para detectar uma alteração ou a ausência de uma alteração num ácido nucleico alvo. Os métodos da invenção são úteis para a detecção e identificação de mutações que são indicativas de doença ou de predisposição para doença. Os métodos da invenção envolvem anelamento de uma série de sondas a um ácido nucleico alvo e detecção da presença de uma mutação no referido ácido nucleico alvo se uma das sondas falhar em anelar, expondo assim um trecho de fita simples do ácido nucleico que é susceptível à degradação.

## DESCRIÇÃO

### MÉTODO PARA DETECÇÃO DE ALTERAÇÃO EM ÁCIDOS NUCLEICOS

#### CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção relaciona-se em geral a métodos para detecção de uma alteração num ácido nucleico alvo.

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Muitas doenças estão associadas à instabilidade genómica. Como tal, os marcadores de instabilidade têm sido propostos como ferramentas de diagnóstico. Por exemplo, as mutações são consideradas marcadores valiosos para uma grande variedade de doenças, e têm sido utilizadas como base para testes de rastreio. As mutações específicas poderiam ser utilizadas como base para testes de rastreio molecular para os estágios iniciais de determinados tipos de cancro. Ver, por exemplo, Sidransky, et al., Science, 256: 102-105 (1992). Por exemplo, tem-se proposto a consideração das mutações nos genes BRCA como marcadores para cancro de mama, e as mutações no gene regulador de ciclo celular p53 têm sido associadas ao desenvolvimento de numerosos tipos de cancros.

Uma detecção precoce da alteração permite um diagnóstico na fase inicial da doença, o que também proporciona a possibilidade de haver uma intervenção antes da apresentação dos sintomas da doença, que muitas vezes ocorre após metástase quando quando é mais difícil de ser curado. No entanto, a detecção de mutações genéticas ou de outras alterações é difícil, ou impossível, em certos tipos de amostras. Por exemplo, a dificuldade de isolamento de ADN a partir de

amostras complexas, heterogêneas, dificulta a identificação da mutação que ocorre na fase inicial.

Consequentemente, existe a necessidade na técnica da criação de métodos eficientes para determinar a presença ou ausência de certas mutações genéticas ou outras alterações num ácido nucleico alvo numa amostra biológica.

A Patente US 6.051.378 está relacionada com métodos de rastreio de mutação em ácidos através da análise de ácidos nucleicos não aleatoriamente fragmentados, utilizando técnicas de espectrometria de massa e procedimentos para melhorar a resolução de massa e precisão de massa desses métodos.

Shenk et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1975, vol. 72, no. 3, de março de 1975, páginas 989-993 está relacionada com um método bioquímico para mapeamento de alterações mutacionais no ADN com S1 nuclease.

Seitz et al., Chem. Eur. J. US, vol. 7, no. 18, de 17 de setembro (17-09-2001), páginas 3911-3925 está relacionado com estratégias para a ligação de grupos repórter fluorescentes a ácidos nucleicos peptídicos em solução e em fase sólida.

Brookes et al., (1989) Eur. J. Biochem., vol. 183, no. 2 está relacionado com a avaliação da utilização de S1 nuclease para detectar pequenas variações de tamanho no ADN genómico.

WO 99/19517 está relacionado com a análise de ADN cortado através de cromatografia de polinucleotídeo combinado a íon.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção fornece métodos para detecção de uma alteração num ácido nucleico alvo numa amostra biológica. De acordo com a invenção, uma pluralidade de sondas de ácido nucleico de fita simples ou de ácido nucleico peptídico complementares a uma região contígua de ácido nucleico alvo, no caso de a dita região estar inalterada estão expostas a uma amostra biológica

que se suspeita que contenha o alvo. O método compreende ainda a adição à referida amostra biológica de um agente que degrada os ácidos nucleicos de fita simples, e a detecção de uma alteração no referido ácido nucleico alvo como a presença de um produto de degradação resultante da degradação dentro da referida região do ácido nucleico alvo já referido. São concebidas sondas para hibridizar ao alvo de uma maneira contígua para formar um dúplex compreendendo o alvo e as sondas contíguas "recobertas" ao longo do alvo. Mostra-se um exemplo deste dúplex na Figura 1. Se uma mutação ou outra alteração existir no alvo, a cobertura contígua será interrompida, produzindo regiões alvo de fita simples, nas quais nenhum dúplex existe. Isto é mostrado na Figura 2. A identificação de uma ou mais regiões de fita simples no alvo é indicativa de uma mutação ou de outra alteração no alvo que impediu a hibridização de sonda naquela região. Para fins da presente invenção, "uma sequência recoberta" ou "cobertura" refere-se à hibridização contígua de sondas a uma região alvo, quer seja separada pela sequência de fita simples ou não.

Do mesmo modo, em métodos da invenção, uma amostra compreendendo um ácido nucleico alvo de fita simples é exposto a uma pluralidade de sondas de ácido nucleico. Numa forma de realização preferencial, a pluralidade de sondas compreende sondas que são complementares a posições diferentes do alvo de tal forma que a hibridização de membros da pluralidade com um alvo do tipo selvagem resulta numa série contígua de sondas ao longo de pelo menos uma porção da sequência alvo quando o alvo é um alvo do tipo selvagem. Podem ser utilizadas sondas que incluem ARN, ADN e/ou Ácido Nucleico Peptídico (PNA) para hibridizar ao ácido nucleico alvo. Não é necessário ligar-se a série de sondas para formar uma fita contínua, embora a ligação

possa ser realizada de acordo com os critérios do utilizador.

Quando o alvo é uma sequência selvagem, não haverá porção de fita simples na região na qual as sondas são recobertas. No entanto, quando uma mutação ou outra alteração existir na região alvo para o qual as sondas são direccionadas, uma ou mais das sondas não irão hibridizar, resultando numa ou mais porções de fita simples da região alvo. A identificação desta região de fita simples é, de acordo com a invenção, um ensaio positivo para uma mutação ou outra alteração no alvo.

Numa forma de realização preferencial, uma região de fita simples indicativa de uma mutação no alvo é detectada pela exposição do alvo, subsequente à hibridização da sonda, a um agente que cliva de forma selectiva ácido nucleico de fita simples. Num alvo mutado, os métodos da invenção produzem mais de um dúplex "recoberto" na região alvo. Dúplexes recobertos de fita dupla múltiplos resultam da clivagem do alvo na região de fita simples na qual todas as sondas não hibridizaram. Conhecem-se numerosas enzimas de clivagem que clivam selectivamente ou degradam ácidos nucleicos de fita simples (por exemplo, nuclease S1, MutY, MutS e Mungbean). A identificação de um dúplex contíguo único compreendendo o alvo e as sondas recobertas contíguas com exposição ao agente de degradação ou clivagem selectiva é indicativa de uma região alvo selvagem (não mutada). Em alternativa, os produtos de clivagem são medidos para determinar, por exemplo, se o peso molecular dos produtos é diferente do que seria esperado de um dúplex contíguo simples.

De acordo com a invenção, ácidos nucleicos de fita simples podem ser gerados para formar o alvo através de métodos padrão conhecidos na técnica. Tais métodos incluem a desnaturação de ácidos nucleicos de fita dupla e/ou a geração de ácidos

nucleicos de fita simples numa reacção catalisada por enzima *in-vitro* em que se gera um excesso de uma fita. Os métodos preferenciais incluem a captura de um ácido nucleico alvo de fita simples num suporte sólido ou semissólido.

Também numa forma de realização preferencial, o ensaio descrito acima é multiplexado de forma a questionar múltiplos alvos simultaneamente. Como tal, podem-se procurar produtos específicos de clivagem de fita dupla a fim de identificar o(s) alvo(s) mutado(s) específico(s) ou podem-se identificar simplesmente múltiplos produtos de clivagem (resultantes, como descrito acima, de regiões de fita simples intervenientes no "alvo recoberto") como prova de uma mutação num dos alvos questionados. Por exemplo, múltiplos alvos, cada um contendo um chamado "ponto quente" de mutação no cancro são questionados, sendo que a produção de uma região alvo de fita simples após cobertura é suficiente para resultar num rastreio positivo de cancro ou de pré-cancro.

Noutra forma de realização preferencial, dilui-se uma amostra heterogénea através da adição de um tampão, por exemplo, um tampão de amostra ou de ensaio, e a amostra diluída é então separada em frações. As fracções preferenciais contêm em média 1 a 5 moléculas de ácido nucleico a partir da amostra heterogénea original. As frações de amostra separadas são preferencialmente amplificadas, por exemplo, através de PCR que concentra cada fração de amostra separada do ácido nucleico alvo. Como resultado, cada fração separada é enriquecida para um subconjunto de moléculas de ácidos nucleicos que estavam presentes na amostra heterogénea original. Do mesmo modo, quando se adicionam sondas complementares à sequência selvagem a cada fração de amostra separada, pode detectar-se uma mutação enriquecida numa das frações separadas como um sinal aumentado.

Tais métodos podem ser empregues, por exemplo, para detectar casos raros na amostra.

Os métodos da invenção são também úteis para a detecção de regiões não hibridizadas nos terminais de um alvo. Quando uma mutação ocorre numa região do alvo à qual cobertura terminal hibridizaria se o alvo fosse um alvo selvagem, a degradação resultante do terminal de fita simples não produzirá, como descrito acima, múltiplos produtos dúplices indicativos de uma região de fita simples interveniente. Em vez disso, a região de fita simples terminal será clivada ou degradada, deixando a porção recoberta do alvo intacta. Neste caso, a mutação terminal é identificada pelo peso molecular esperado reduzido do alvo recoberto ou pela atividade do agente degradante (por exemplo, uma exonuclease).

Em alternativa, poder-se-á detectar uma mutação ou outra alteração nos terminais de um alvo através da avaliação tanto da fita sentido como da fita antissentido do alvo. De acordo com os métodos da invenção, tanto as fitas sentido como antissentido do alvo estão ligadas a um suporte sólido pelo mesmo terminal respectivo; por exemplo, tanto as fitas sentido como antissentido do alvo estão ligadas a um suporte sólido pelas suas respectivas extremidades 5'. Seguidamente, as fitas antissentido e sentido ligadas do alvo são questionadas em solução. Uma mutação terminal, por exemplo, na extremidade 3' da fita sentido não seria detectada, no entanto, a mutação apresenta um dúplice clivado a partir do sítio de mutação próximo da extremidade da ligação 5' da fita antissentido. A mutação é detectada quando o suporte sólido é removido e o dúplice clivado da fita antissentido permanece em solução. Se apenas se testasse a fita sentido, a mutação não seria detectada, assim, testando tanto as fitas sentido como



antissentido evita-se um falso negativo provocado por uma mutação no terminal de uma das fitas.

Os métodos da invenção podem ser utilizados para evitar a detecção de um polimorfismo conhecido como um falso positivo para uma alteração. Um ou mais polimorfismos podem estar presentes numa região do ácido nucleico alvo. Nesse caso, múltiplas sondas são concebidas para hibridizar cada uma das variantes polimórficas conhecidas que estarão presentes na região alvo. A sonda complementar à variante de polimorfismo que está presente no alvo hibridizará a região do polimorfismo. Fornecer uma gama de variantes complementares aos polimorfismos associados assegura que a região de polimorfismo é "recoberta" e que qualquer sinal positivo detectado indica a presença de uma alteração diferente do polimorfismo associado no ácido nucleico alvo.

Os métodos da invenção são igualmente úteis para detectar a presença, numa população, de um ou mais polimorfismos num ácido nucleico alvo. Uma pluralidade de sondas de ácidos nucleicos é complementar a uma primeira variante de um ácido nucleico alvo compreendendo um polimorfismo tal que a hibridização de membros da pluralidade com o alvo compreendendo a variante de polimorfismo resulta numa série contígua de sondas ao longo de pelo menos uma porção do alvo. Quando uma ou mais outras variantes polimórficas estão presentes na região do alvo à qual as sondas são dirigidas, pelo menos uma das sondas não hibridizará no sítio da outra variante polimórfica. Após a hibridização, uma porção de fita simples da região alvo é exposta no sítio de uma segunda variante polimórfica, por exemplo. Mediante exposição a um agente que degrada seletivamente o ácido nucleico de fita simples, a variante polimórfica apresenta um dúplex clivado, por exemplo, do sítio

da segunda variante polimórfica. Do mesmo modo, a detecção de um produto de clivagem é um teste positivo para uma alteração, neste caso de uma ou mais variantes polimórficas, no alvo.

Noutro aspecto da invenção, as sondas são concebidas para hibridizar com o alvo de tal forma que as lacunas separem uma ou mais das sondas hibridizadas entre si. De acordo com este aspecto da invenção, um alvo de fita simples da amostra compreendendo o ácido nucleico é exposto a uma pluralidade de sondas de ácido nucleico. A pluralidade compreende sondas que são complementares a posições diferentes no ácido nucleico alvo de tal forma que a hibridização de membros da pluralidade com um alvo selvagem resulta numa série de sondas, ao longo de pelo menos uma porção da sequência alvo, algumas das quais podem ser separadas por uma lacuna. Preferencialmente, as lacunas são suficientemente pequenas para impedir que o agente de degradação corte na lacuna. Consequentemente, as separações de lacuna preferenciais são mais curtas que as sondas, isto é, as sondas têm um número mais elevado de pares de bases do que as lacunas. Em formas de realização preferenciais, as separações de lacuna variam entre aproximadamente 1 par de bases e aproximadamente 3 pares de bases de comprimento. Em alternativa, as lacunas podem variar entre aproximadamente 3 pares de bases e 15 pares de bases em comprimento. De acordo com a invenção, pode realizar-se um teste de detecção utilizando uma pluralidade de sondas, algumas das quais estão separadas por lacunas e outras não, quando hibridizadas com o ácido nucleico alvo.

De acordo com este aspecto da invenção, o agente de degradação que é selecionado, ou em alternativa, as condições utilizadas junto do agente, não cliva o ácido nucleico alvo nas lacunas de fita simples. Em algumas formas de realização são

utilizadas condições de degradação mais moderadas que evitam a degradação de quaisquer separações de lacuna de fita simples. Por exemplo, a quantidade de unidades de agente de degradação utilizada é mantida a uma temperatura e por um período de tempo adequado para manter as separações de lacuna de fita simples entre as coberturas. As condições de agente de degradação degradam simultaneamente regiões maiores de fita simples onde uma ou mais sondas falharam na hibridização devido a uma alteração no alvo. Como as separações de lacuna não são degradadas, evitam-se os falsos-positivos criados por separações de lacuna entre as sondas. No entanto, as condições permitem a degradação da região alvo onde a sonda falhou na hibridização, evitando um falso-negativo. Assim, de acordo com a invenção, um teste positivo de uma alteração num ácido nucleico alvo pode compreender lacunas que separam sondas complementares hibridizadas com o alvo. Nos locais onde as separações de lacuna estão presentes entre sondas, selecciona-se o agente de degradação selecionado, as unidades do agente utilizado, a temperatura e o tempo de exposição para fornecer condições que mantêm separações de lacuna de fita simples e que clivam simultaneamente uma região de alteração de fita simples onde uma sonda falhou na hibridização. O impedimento estérico também pode ser utilizado para impedir o corte nas lacunas.

As sondas podem ser concebidas de forma a impedir que as sondas hibridizadas adjacentes criem um efeito estabilizante que resulta numa sonda que hibridiza no sítio de uma alteração numa região do ácido nucleico alvo. Consequentemente, as próprias sondas são alteradas para incluir entre aproximadamente 1 e 10 sítios Abásicos nas extremidades 5' e/ou 3' de uma ou mais das sondas. Do mesmo modo, as sondas podem ser alteradas para inserir entre aproximadamente 1 e

aproximadamente 10 ADN, ARN, ou Ácidos Nucleicos Peptídicos que não combinem com o ácido nucleico alvo na extremidade 5' ou 3', e que não impeçam a sonda de hibridizar com o seu alvo complementar.

Numa forma de realização preferencial, um ácido nucleico alvo está ligado a um suporte sólido no terminal 3' ou 5'. As sondas complementares são recobertas ao longo do comprimento do alvo como acima descrito. Uma mutação é indicada quando produtos de hibridização de fita dupla são detectados na solução após a amostra ter sido tratada com um agente de degradação indicando que uma ou mais sondas de cobertura falharam na hibridização do alvo devido à mutação. Mais de um ácido nucleico alvo de mais de uma fonte podem ser rastreados simultaneamente ligando múltiplos ácidos nucleicos alvo a suportes sólidos. O ácido nucleico de fita dupla pode também pode ser fusionado, por exemplo, por aquecimento.

No caso de se detectar uma mutação num ácido nucleico alvo, a identidade da mutação é determinada por qualquer método conhecido na técnica, tal como sequenciamento, espectroscopia de massa e outros.

Numa forma de realização preferencial, uma amostra biológica é exposta a sondas complementares a um ADN alvo em condições de hibridização estringentes de forma a que cada sonda hibridizará somente com o ácido nucleico alvo selvagem. Tais condições são bem conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, 2 Joseph Sambrook, Peter MacCallum, & David Russell, Molecular Cloning : A Laboratory Manual ch., 10 (3d ed. 2001). Numa forma de realização da invenção, a temperatura de fusão de hibridização de cada sonda é aproximadamente a mesma. Noutra forma de realização, as sondas têm entre aproximadamente 8 e aproximadamente 30 nucleotídeos de comprimento. Numa forma de

realização preferencial, cada sonda tem o mesmo comprimento, isto é, é composta pelo mesmo número de nucleotídeos.

As amostras biológicas preferenciais são o escarro, o fluido pancreático, a bÍlis, linfa, plasma, urina, fluido cerebroespinal, fluido seminal, saliva, aspirado de mamilo, pus, tecido de biÓpsia, células fetais, fluido amniÓtico e fezes.

Noutra forma de realização, pelo menos uma das sondas de cobertura compreende uma marcação detectável. Cada sonda pode compreender uma marcação detectável diferente, permitindo a detecção diferencial das sondas (isto é, por exemplo, as sondas diferentes podem compreender um nucleotídeo com um isÓtopo radioativo diferente, uma marcação fluorescente, ou uma entidade de modificação de peso molecular). Marcação de sonda diferencial permite a identificação da sonda que não anelou ao seu alvo no caso de uma mutação. Cada sonda ou um subconjunto de sondas podem ser marcados e/ou a totalidade ou uma porção do ácido nucleico alvo podem ser marcados. Numa forma de realização preferencial, todas as sondas são marcadas. Numa forma de realização mais preferencial, o ácido nucleico alvo está ligado a um suporte sólido, e uma marcação, colocada no alvo, nas sondas, ou em ambos, é distal, preferencialmente mais distal, isto é, na extremidade não ligada, na posição de uma alteração.

Noutra forma de realização, o ácido nucleico alvo compreende uma marcação detectável na região onde se suspeita que ocorra uma mutação. Quando a mutação suspeita está presente no alvo, nenhuma sonda hibridizará com o alvo e a região da mutação compreendendo a marcação detectável permanecerá de fita simples. Mediante exposição a um agente que cliva ácido nucleico de fita simples, a região de mutação de fita simples

compreendendo a marcação detectável é degradada a partir do alvo. A ausência da marcação nos produtos de degradação é indicativa da presença de uma mutação na região da marcação detectável.

Os meios de identificação de alteração, incluindo, por exemplo, marcação por sonda, preparação de sonda, por exemplo, num suporte sólido, mutações associadas à doença, fontes de amostra, agentes de degradação, e outras formas de realização e exemplos ilustrativos podem aplicar-se a todos os métodos de detecção de alteração revelados neste documento. Por exemplo, sondas fluorescentemente marcadas podem ser hibridizadas com o alvo de uma maneira contígua, as sondas fluorescentemente marcadas podem ser separadas por lacunas, ou as sondas fluorescentemente marcadas podem ser complementares às variantes polimórficas presentes no alvo. Noutra forma de realização, um alvo que está ligado a um suporte sólido pode ser exposto a sondas: que hibridizam com o alvo de uma maneira contígua, que hibridizam com o alvo com separações de lacuna, ou que hibridizam com as variantes polimórficas presentes no alvo.

Em formas de realização preferenciais da invenção, amostras de diferentes pacientes, frações diferentes de uma amostra de paciente, ou uma combinação das mesmas, são analisadas simultaneamente, por exemplo, numa mostra bidimensional tal como numa placa multipoço, utilizando os métodos da invenção.

Numa forma de realização, os métodos da invenção compreendem a detecção de uma mutação num locus genético que está associado com uma doença, tal como K-RAS, p53, APC, DCC ou BAT26. Numa forma de realização preferencial, essa mutação está associada com cancro, tal como cancro de cólon, cancro de

pulmão, cancro esofágico, cancro de próstata, cancro de mama, cancro pancreático, cancro de estômago, cancro hepático ou linfoma.

Fornece-se abaixo uma descrição detalhada de certas formas de realização da invenção. Outros aspectos e vantagens adicionais da invenção são evidentes com a consideração dos seguintes desenhos, descrição e reivindicações.

#### DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra um diagrama de fluxo que ilustra uma forma de realização de um método da invenção de detecção da ausência de mutação numa amostra de ácido nucleico alvo.

A Figura 2A mostra um diagrama de fluxo que ilustra uma forma de realização de um método da invenção para detecção da presença de mutação numa amostra de ácido nucleico alvo.

A Figura 2B ilustra outra forma de realização do método da invenção para detecção da ausência de mutação numa amostra de ácido nucleico alvo.

A Figura 2C mostra um diagrama de fluxo que ilustra outra forma de realização de um método da invenção para detecção da presença de mutação numa amostra de ácido nucleico alvo.

A Figura 3 mostra resultados de um gel onde sondas variantes polimórficas são seletivamente empregadas para bloquear variantes polimórficas da amostra de ácido nucleico alvo.

A Figura 4A ilustra uma sonda que tem uma porção repórter e uma porção de extinção.

A Figura 4B ilustra a porção repórter de uma primeira sonda da Figura 4A anelada à porção de extinção de uma segunda sonda.

A Figura 4C mostra um diagrama de fluxo que ilustra outra forma de realização de um método da invenção para detecção da

ausência de mutação numa amostra de ácido nucleico alvo.

A Figura 5 mostra um diagrama de fluxo que ilustra outra forma de realização de um método da invenção para detecção da presença de mutação numa amostra de ácido nucleico alvo.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece métodos para detectar uma alteração genética nos ácidos nucleicos alvo indicativos de instabilidade genómica. Por exemplo, os métodos da presente invenção são úteis para detectar e/ou identificar mutações ou outras alterações associadas com doenças, tais como cancro e outras condições genéticas patológicas, perturbações ou síndromes. Tais mutações incluem inserções, eliminações, rearranjos, transições, transferências, transversões, polimorfismos e substituições nucleotídicas. A presente invenção pode ser utilizada para identificar mutações herdadas ou outras alterações, tais como mutações induzidas ou esporádicas espontâneas. No entanto, em termos gerais, as alterações incluem qualquer modificação no ácido nucleico alvo, tal como uma mutação, perda da heterozigosidade, ou outros indícios de instabilidade genómica.

Os métodos da invenção recorrem ao uso de uma pluralidade de sondas, cada uma delas compreende ácidos nucleicos de fita simples e cada sonda é complementar a uma porção diferente de uma região contígua do ácido nucleico alvo. De acordo com a invenção, cada sonda hibridiza com a sua região complementar no ácido nucleico alvo. Quando nenhuma mutação ou outra alteração está presente no alvo, a pluralidade de sondas formam "uma cobertura" contígua ao longo do comprimento da região alvo. No caso de uma porção do alvo conter uma mutação ou outra alteração, o alvo permanece de fita simples naquela região porque senão a sonda complementar não hibridizará na presença



da mutação. A identificação da região de fita simples é indicativa de uma mutação ou de outra alteração.

Numa forma de realização preferencial, detecta-se uma região de fita simples indicativa de uma mutação ou outra alteração através da exposição do alvo recoberto a um agente que preferencialmente degrada ou cliva o ácido nucleico de fita simples, e através da análise do(s) produto(s) de degradação. Os agentes de degradação exemplares incluem agentes químicos e enzimas, tais como nuclease S1, MutY, MutS, e Mungbean. A presença de um produto de ácido nucleico de fita dupla intacto singular é indicativa da ausência de uma mutação em nenhuma das regiões do ácido nucleico alvo (isto é, não há clivagem do alvo devido à ausência de uma porção de fita simples). A presença de dois ou mais produtos de fita dupla é indicativa da presença de uma mutação ou de outra alteração numa ou em mais regiões do ácido nucleico alvo (evidenciando a clivagem do alvo na região(regiões) de fita simples contendo a mutação).

As amostras biológicas que são úteis na presente invenção incluem qualquer amostra de um paciente que tem presente um ácido nucleico alvo. Tais amostras são preparadas a partir de qualquer tecido, célula, ou fluido corporal. Exemplos de fontes celulares biológicas incluem células de sangue, células de cólon, células bucais, células cervicovaginais, células epiteliais a partir da urina, células fetais ou células presentes no tecido obtido por biópsia. Tecidos ou fluidos corporais exemplares incluem escarro, fluido pancreático, biliar, linfa, plasma, urina, fluido cerebrospinal, fluido seminal, saliva, aspirado de mamilo, pus, fluido amniótico e fezes. As amostras biológicas úteis também incluem ácido nucleico isolado de um paciente. O ácido nucleico pode ser isolado de qualquer tecido, célula, ou fluido corporal usando

qualquer dos diversos métodos normalmente utilizados na técnica. O método particular de isolamento de ácido nucleico dependerá da fonte da amostra do paciente.

A amostra biológica compreendendo um ácido nucleico alvo pode ser analisada através de métodos contidos na presente invenção sem quaisquer preparações ou purificações adicionais. Numa forma de realização preferencial, uma ou mais regiões específicas presentes no ácido nucleico alvo podem ser amplificadas através de PCR, por exemplo. Concentrar o ácido nucleico alvo por amplificação melhora a precisão reduzindo o ruído de fundo na amostra.

Numa forma de realização, o ácido nucleico alvo está ligado a uma matriz de fase sólida ou de fase semissólida. A ligação ao suporte permite o processamento e rastreamento simultâneos de uma pluralidade de amostras de ácido nucleico de fontes diferentes, e permite a comparação de produtos de degradação em fase líquida. Matrizes exemplares adequadas para serem utilizadas na presente invenção incluem filtros de nitrocelulose ou nylon, contas de vidro, contas magnéticas recobertas com agentes para captura por afinidade, placas de microtítulo tratadas ou não tratadas, géis poliméricos, agarose e similares. Um técnico compreenderá que o método através do qual o ácido nucleico alvo está ligado à matriz dependerá da matriz particular utilizada. Por exemplo, ligação à nitrocelulose pode ser alcançada pela absorção simples de ácido nucleico no filtro seguido de cozimento do filtro a 75° a 80° C em vácuo por 25 minutos a 2 horas. Em alternativa, podem ser utilizadas membranas de nylon carregadas que não requerem qualquer tratamento adicional do ácido nucleico ligado. Contas e placas de microtítulo que são recobertas com avidina podem ser utilizadas para ligar o ácido nucleico alvo ao qual a

biotina é ligada (por exemplo, através da utilização de iniciadores de PCR conjugados com a biotina). Além disso, podem utilizar-se anticorpos para ligar o ácido nucleico alvo a qualquer um dos suportes sólidos acima referidos, revestindo as superfícies com um anticorpo e incorporando um hapteno específico para o anticorpo no ácido nucleico alvo. Agentes de ligação em excesso são removidos do ácido nucleico alvo ligado por lavagem com tampões adequados.

Na prática da presente invenção, o ácido nucleico alvo, preferencialmente ligado a uma matriz de fase sólida ou de fase semi-sólida, é incubado com uma pluralidade de sondas de ácido nucleico. O comprimento de sondas individuais pode variar entre 8 a 100 nucleotídeos. Numa forma de realização preferencial, as sondas individuais têm 8 a 30 nucleotídeos de comprimento. Numa forma de realização mais preferencial, as sondas têm aproximadamente 17 nucleotídeos de comprimento. Podem utilizar-se sondas compreendendo ARN, ADN e/ou Ácido Nucleico Peptídico (PNA) para hibridizar com o ácido nucleico alvo. As sondas podem ser sintetizadas quimicamente por métodos que são padronizados na técnica, por exemplo, usando sintetizadores automatizados disponíveis no mercado. Uma ou mais das sondas podem ser marcadas. Por exemplo, fluorocromos (tais como FITC ou rodamina), enzimas (tais como fosfatase alcalina), biotina, ou outros compostos de marcação bem conhecidos podem ser ligados directa ou indirectamente. Em alternativa, as sondas podem ser marcadas radioativamente (por exemplo, marcadas na extremidade com  $^{32}\text{P}$  usando polinucleotídeo quinase) ou conjugadas com outras marcações normalmente utilizadas ou moléculas repórter. Além disso, estes oligonucleotídeos podem ser marcados com uma entidade de modificação de peso molecular (MWME) que identifica de forma única cada uma das sondas.

Como descrito em Shuber et al., Human Molecular Genetics, 2: 153-158, (1993), a reação de hibridização pode ser realizada em condições nas quais as sondas com sequências de ácidos nucleicos diferentes hibridizam com o seu ADN complementar com força equivalente. Isto é alcançado por: 1) utilização de sondas de comprimento equivalente; e 2) inclusão na mistura adequada de hibridização concentrações de um ou mais agentes que eliminam a disparidade nas temperaturas de fusão ( $T_m$ ) entre sondas de comprimento idêntico, mas com um conteúdo diferente de guanosina+citosina (G+C). Assim, nestas condições, a temperatura de fusão de hibridização ( $T_m$ ) de cada membro da pluralidade de ácido nucleico de fita simples é aproximadamente equivalente. Os agentes que podem ser utilizados para este fim incluem compostos de amónio quaternário tais como cloreto de tetrametilamónio (TMAC).

O TMAC reduz a energia de ligação de hidrogénio entre pares G-C. Ao mesmo tempo, o TMAC aumenta a estabilidade térmica de ligações de hidrogénio entre pares A-T. Estas influências opostas reduzem a diferença na força de ligação normal entre o par de bases G-C ligado ao hidrogénio triplo e o par A-T ligado a hidrogénio duplo. O TMAC também aumenta a inclinação da curva de fusão de cada sonda. Em conjunto, estes efeitos permitem que a estringência da hibridização seja aumentada ao ponto de poder resolver as diferenças de base única e minimizar a hibridização não específica. Ver, por exemplo, Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 82: 1585, (1985). Qualquer agente que exiba estas propriedades pode ser utilizado na prática da presente invenção. Tais agentes são facilmente identificados determinando as curvas de fusão para diferentes sondas teste na presença e ausência de concentrações crescentes do agente. Isto pode ser alcançado pela ligação um

ácido nucleico alvo a uma matriz sólida, tal como um filtro de nylon, pela hibridização individual das sondas radiomarcadas de comprimentos idênticos mas com conteúdos diferentes de G+C ao filtro, pela lavagem do filtro a temperaturas crescentes, e medindo a quantidade relativa de sonda radiomarcada ligada ao filtro em cada temperatura. Qualquer agente que, quando presente nas etapas de hibridização e lavagem acima descritas, resulta em curvas de fusão aproximadamente sobreponíveis e íngremes para os oligonucleotídeos diferentes podem ser utilizados.

Na prática da presente invenção, o ácido nucleico alvo e as sondas são incubados por tempo suficiente e em condições adequadas para maximizar a hibridização específica e minimizar a hibridização não específica. As condições a serem consideradas incluem a concentração de cada sonda, a temperatura de hibridização, a concentração de sal, e a presença ou ausência de ácido nucleico não relacionado.

A concentração de cada sonda em termos gerais varia entre aproximadamente 0,025 a aproximadamente 0,2 pmol por ml de solução de hibridização. Numa forma de realização, cada uma das sondas compreende um número igual de nucleotídeos. As sequências de sonda são concebidas para hibridizar com regiões consecutivas, adjacentes ao ácido nucleico alvo. A concentração ideal para cada sonda pode ser determinada por hibridizações de teste onde o rácio sinal-ruído (isto é, a ligação específica versus não específica) de cada sonda é medida em concentrações crescentes de sondas marcadas.

A temperatura de hibridização pode ser otimizada para o comprimento das sondas que são utilizadas. Isto pode ser determinado empiricamente, utilizando o procedimento de determinação de curva de fusão acima descrito. Os técnicos

depreenderão que a determinação das condições hibridização ideais relativamente ao tempo, temperatura, concentração de sonda, tipo de sal, e concentração de sal deve ser feita de forma concertada.

De acordo com os métodos da presente invenção, as sondas de cobertura hibridizam apenas com a sua região complementar no ácido nucleico alvo. Dessa forma, o ácido nucleico alvo permanecerá de fita simples em qualquer locus no qual uma mutação esteja presente porque nenhuma sonda hibridizará naquele locus. Uma alteração exemplar inclui um polimorfismo de nucleotídeo único. Após a hibridização, as sondas não ligadas são, se necessário, removidas por lavagem em condições que conservam perfeitamente os produtos combinados de hibridização de ácido nucleico alvo:sonda. As condições de lavagem, tais como temperatura, tempo de lavagem, tipos de sal e concentrações de sal são determinadas empiricamente como acima descrito.

Os métodos da invenção também evitam polimorfismos conhecidos que são detectados como um falso-positivo por uma alteração. Quando existe um ou mais polimorfismos associados a uma região de ácido nucleico alvo, fornecem-se múltiplas sondas, cada uma concebida para hibridizar com uma das variantes polimórficas. Uma sonda complementar a uma variante polimórfica no alvo hibridizará à região do polimorfismo. Assim, de acordo com este método, as sondas são concebidas para bloquear as variantes polimórficas de forma a que o alvo não seja alterado de qualquer outra forma, as sondas hibridizam contiguamente com uma região do ácido nucleico alvo. Assim, o fornecimento de sondas complementares a cada variante polimórfica assegura que a região polimórfica é "recoberta" e que quaisquer regiões de fita simples detectadas de acordo com

o método indicam a presença no ácido nucleico alvo de uma alteração além de uma variante polimórfica associada.

Noutro aspecto da invenção, as sondas são concebidas para hibridizar com o alvo de tal forma que as lacunas separem uma ou mais das sondas hibridizadas. De acordo com este aspecto da invenção, uma amostra compreendendo ácido nucleico alvo de fita simples é exposta a uma pluralidade de sondas de ácido nucleico. A pluralidade compreende sondas que são complementares a posições diferentes do ácido nucleico alvo de tal forma que a hibridização de membros da pluralidade com um alvo selvagem resulte numa série de sondas, ao longo de pelo menos uma porção da sequência alvo, que são separadas por uma lacuna de ácido nucleico de fita simples. As lacunas são dimensionadas de forma a que as sondas sejam mais longas do que as separações de lacuna, isto é, as sondas têm um número mais elevado de pares de bases do que as lacunas. Em algumas formas de realização, as lacunas variam entre aproximadamente 1 par de bases e aproximadamente 3 pares de bases de comprimento. Em alternativa, as lacunas podem variar entre aproximadamente 3 pares de bases e aproximadamente 15 pares de bases de comprimento.

De acordo com este aspecto da invenção, o agente que é selecionado, ou alternativamente, as condições utilizadas com o agente, não clivam o ácido nucleico alvo nas separações de lacuna de fita simples. Em algumas formas de realização, emprega-se um agente de degradação mais moderada em condições selecionadas para evitar degradação de separações de lacuna de fita simples, como por exemplo o agente de nuclease Mungbean é exposto a uma temperatura de aproximadamente 37°C por um período de aproximadamente 10 minutos. Quando as separações de lacuna estão presentes entre as sondas, selecciona-se o agente

de degradação selecionado, as unidades do agente utilizado, a temperatura e o tempo de exposição para fornecer condições que mantêm (isto é, não cortam) as separações de lacuna de fita simples no ácido nucleico. No entanto, as condições selecionadas degradam a região de fita simples do ácido nucleico onde uma ou mais sondas não hibridizaram devido a uma alteração no alvo. Como as separações de lacuna não degradam, evitam-se os falsos positivos criados por separações de lacuna entre as sondas. Porém, as condições permitem a degradação da região de ácido nucleico de fita simples no alvo quando a sonda não hibridizou, evitando um falso-negativo. Assim, de acordo com a invenção, um ensaio positivo para uma alteração num ácido nucleico alvo pode compreender lacunas de fita simples no alvo separando as sondas complementares hibridizadas com o alvo.

Numa modalidade, o ácido nucleico alvo está presente numa concentração mais elevada do que cada sonda individual, sendo pelo menos um dos quais marcado por exemplo, com uma marcação fluorescente que pode ser detectada pela excitação no comprimento de onda de absorção específica de uma fonte de luz num espectrofotómetro (repórter fluorescente). Os produtos de hibridização são removidos da solução, e a solução é avaliada para fluorescência. Se nenhuma mutação estiver presente no ácido nucleico alvo, nenhuma sonda marcada deve permanecer na solução já que todas as sondas marcadas estarão ligadas ao ácido nucleico alvo. Assim, indica-se a ausência de mutação no ácido nucleico alvo se a solução não fluoresce num nível apreciável. Em alternativa, se o ácido nucleico alvo for ligado ao suporte sólido, a fluorescência de ácido nucleico hibridizado em solução após exposição a um agente de degradação é indicativo da presença de uma mutação no ácido nucleico alvo.

Noutra modalidade, a sonda é marcada de forma radioactiva



ou utilizam-se sondas quimioluminescentes e determina-se a presença de uma mutação no ácido nucleico alvo através da exposição ao filme de raio x. Em alternativa, ou além disso, as sondas podem transportar uma entidade de modificação de peso molecular (MWME) que é única para cada sonda. Tal entidade permite a identificação direta da sonda separada através da determinação do peso molecular relativo por vários métodos possíveis.

Enquanto a imobilização do ácido nucleico alvo é preferida em termos gerais, em algumas formas de realização pode ser desejável hibridizar as sondas de cobertura com o ácido nucleico alvo em solução. Após a exposição do produto de hibridização em solução a um agente de degradação que preferencialmente degrada ácido nucleico de fita simples, o(s) produto(s) da degradação é analisado por métodos da técnica que incluem electroforese em gel de poliacrilamida SDS, espectrofotómetro de massa, cromatografia, captura de hibridização e outros. Ver, Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed. (John Wiley & Sons, Inc, 1995); Wu *Recombinant DNA Methodology II*, (Academic Press, 1995).

Após a detecção de uma mutação, a região, ou o locus genético no ácido nucleico alvo onde a mutação está presente podem ser determinados pela identificação de sondas específicas que não hibridizaram com o ácido nucleico alvo. Por exemplo, numa modalidade da invenção, o produto de hibridização é clivado em dois ácidos nucleicos de dupla fita separados mediante tratamento com um agente de degradação que preferencialmente degrada o ácido nucleico de fita simples. Dois ácidos nucleicos são separados e sequenciados de acordo com os métodos conhecidos na técnica. A posição relativa e a identidade das sondas que hibridizam com o ácido nucleico alvo

com sucesso podem então ser determinadas. Através do processo de eliminação, podem ser identificadas uma ou mais sondas que não hibridizaram, bem como a sua posição relativa no ácido nucleico alvo. O locus genético que tem uma mutação terá um correspondente selvagem que é complementar à sonda que não hibridizou.

A Figura 1 mostra um diagrama de fluxograma que ilustra uma modalidade da presente invenção. Como demonstra a Figura 1, determina-se a ausência de uma mutação num ácido nucleico alvo quando o ácido nucleico alvo não é clivado em dois ou mais fragmentos de fita dupla. Em termos gerais, o método compreende as etapas de exposição de um ácido nucleico alvo ligado a uma pluralidade de sondas; exposição do ácido nucleico alvo e mistura de sondas a um agente que degrada preferencialmente ácidos nucleicos de fita simples; e determinação de ausência de mutação no ácido nucleico alvo se a fita dupla intacta singular do produto de ácido nucleico estiver presente na amostra após exposição ao agente de degradação.

Mais especificamente, o ácido nucleico alvo (6) está ligado a uma matriz de fase sólida ou de fase semissólida (10). O ácido nucleico alvo é exposto a uma pluralidade de sondas (2) que são marcadas com, por exemplo, uma molécula fluorescente. O ácido nucleico alvo (6) e a pluralidade de sondas (2) são incubados em condições ideais de tempo, temperatura, concentração de sonda, tipo de sal e concentração de sal. Utilizam-se as condições de hibridização estridentes que maximizam a hibridização específica melhorando a simetria de energia de ligação e fornecendo temperaturas de fusão similares para cada sonda. Essas condições de hibridização permitem apenas que sondas complementares hibridizem com o ácido nucleico alvo. A mistura de ácido nucleico alvo (6) e a

sonda (2) é então exposta a um agente de degradação que degrada preferencialmente o ácido nucleico de fita simples. O agente pode ser, por exemplo, nuclease S1.

O produto de hibridização compreendendo o ácido nucleico alvo e as sondas (18) é então removido da solução pela sua extremidade ligada. A utilização do ácido nucleico alvo ligado permite a diversas amostras serem rastreadas simultaneamente através da remoção da porção ligada da solução (por exemplo, removendo o sobrenadante de uma mistura de reação contendo o alvo ligado) analisando então a fase de solução do produto de degradação indicativo de uma mutação.

A Figura 2A mostra um diagrama de fluxograma que ilustra uma modalidade da presente invenção. Em termos gerais, o método compreende as etapas de: exposição de um ácido nucleico alvo ligado tendo uma região na qual uma mutação está presente numa pluralidade de sondas; exposição da mistura de ácido nucleico alvo hibridizado e da sonda a um agente de degradação que degrada preferencialmente ácidos nucleicos de fita simples; e detecção da presença da mutação no ácido nucleico alvo quando uma região de fita simples é degradada.

Mais especificamente, o ácido nucleico alvo (8) tendo uma região com uma mutação (22) é ligado a uma matriz de fase sólida ou de fase semissólida (10). O ácido nucleico alvo (8) é exposto a uma pluralidade de sondas (2) que são marcadas, por exemplo, por fluorescência. O ácido nucleico alvo (8) e a pluralidade de sondas (2) são incubados sob condições ideais de tempo, temperatura, concentração de oligonucleotídeo, tipo de sal, e concentração de sal. São utilizadas condições de hibridização estridentes que maximizam a hibridização específica melhorando a simetria de energia de ligação e fornecendo uma temperatura de fusão similar para cada sonda. As

condições de hibridização permitem apenas sondas complementares hibridizar com o ácido nucleico alvo. Como nenhuma sonda será complementar à região que tem uma mutação (22), a hibridização não ocorrerá naquela região, e a região permanecerá de fita simples.

Após exposição a um agente de degradação que degrada preferencialmente ácido nucleico de fita simples, o produto de hibridização é removido da solução através da sua extremidade ligada. O uso do ácido nucleico alvo ligado permite o rastreamento simultâneo de diversas amostras removendo a porção ligada da solução e analisando então a fase de solução de segmentos de produto de degradação hibridizado (isto é, a fita dupla) (26) indicativa da presença de uma mutação no ácido nucleico alvo. A presença de um ou mais segmentos do produto de degradação hibridizado (26) na solução é indicativa que o ácido nucleico alvo compreende uma região com uma mutação (22) que foi degradada pelo agente de degradação. A mutação é detectada pela exposição da solução a uma fonte de luz num espectrofotômetro no comprimento de onda de absorção específico, que revela as quantidades apreciáveis do produto de degradação fluorescente (26) indicativo de uma mutação (22).

A Figura 2B ilustra uma modalidade do método da invenção em que uma mutação não está presente numa amostra de ácido nucleico alvo. Nesta modalidade, o ácido nucleico alvo está ligado a uma matriz de fase sólida ou de fase semissólida (10). O ácido nucleico alvo é exposto a uma pluralidade de sondas (4) que são concebidas para hibridizar com o alvo de forma a que as lacunas separem uma ou mais das sondas hibridizadas. A sonda (4) desenhada para anelar à área do ácido nucleico alvo mais distal à matriz (10) é marcada com um repórter (12), por exemplo, um radionucleotídeo ou um fluoróforo.

O ácido nucleico alvo e a pluralidade de sondas (4) são incubados em condições ideais de tempo, temperatura, concentração de sonda, tipo de sal e concentração de sal. A pluralidade de sondas (4) é complementar às posições diferentes do ácido nucleico alvo de forma que a hibridização de membros da pluralidade com um alvo selvagem resulte numa série de sondas (4), ao longo de pelo menos uma porção da sequência alvo, que são separados por uma lacuna de ácido nucleico de fita simples. Utilizam-se preferencialmente condições de hibridização estridentes que maximizam a hibridização específica melhorando a simetria de energia de ligação e fornecimento de temperaturas de fusão similares para cada sonda. Essas condições de hibridização permitem que sondas que são apenas complementares hibridizem com o ácido nucleico alvo.

O produto de hibridização (18) do ácido nucleico alvo e sonda (4) é então exposto a um agente, ou em alternativa às condições utilizadas com o agente, que não clivam o ácido nucleico alvo nas separações de lacuna de fita simples, mas que degradam uma região de lacuna de fita simples onde uma ou mais sondas não hibridizaram. O produto da hibridização (18) compreendendo o ácido nucleico alvo e as sondas é então removido da solução através da sua extremidade ligada. A utilização do ácido nucleico alvo ligado permite que diversas amostras sejam rastreadas simultaneamente removendo a porção ligada da solução e analisando posteriormente a fase de solução do produto de degradação indicativo de uma mutação. A ausência do repórter (12) remanescente na solução indica a ausência da mutação no ácido nucleico alvo.

A Figura 2C mostra um diagrama de fluxo que ilustra uma modalidade da invenção em que uma mutação está presente num ácido nucleico alvo na amostra. De acordo com esta modalidade,

o ácido nucleico alvo (8) contendo uma mutação (22) está ligado a uma matriz de fase sólida ou de fase semissólida (10). O ácido nucleico alvo (8) é exposto a uma pluralidade de sondas (4) concebidas para hibridizar com o alvo (8) de forma a que as lacunas separem uma ou mais das sondas hibridizadas e a sonda (4) concebida para complementar a área do ácido nucleico alvo (8) mais distal à matriz (10) seja marcada com um repórter (12).

O ácido nucleico alvo (8) e a pluralidade de sondas (4) são incubados nas condições de hibridização estringentes acima descritas. As condições permitem a pluralidade de sondas (4) complementar a posições diferentes do ácido nucleico alvo de tal forma que a hibridização de membros da pluralidade com um alvo selvagem resultem numa série de sondas (4), ao longo de, pelo menos, uma porção da sequência alvo (8), que são separadas por uma lacuna de ácido nucleico de fita simples. As condições de hibridização estringentes permitem apenas que sondas complementares hibridizem com o ácido nucleico alvo.

A hibridização do ácido nucleico alvo (8) e da sonda (4) é então exposta a um agente, ou, alternativamente, as condições utilizadas com o agente, que não clivam o ácido nucleico alvo nas separações de lacuna de fita simples, mas que degradam uma região de lacuna de fita simples onde uma ou mais sondas não hibridizaram. O produto de hibridização compreendendo o ácido nucleico alvo e sondas é então removido da solução através da sua extremidade ligada. A presença de um ou mais segmentos do produto de degradação hibridizado (28) incluindo o repórter marcado (12) remanescente na solução indica a presença da mutação (22) no ácido nucleico alvo (8), porque a região de fita simples da mutação (22) foi degradada pelo agente de degradação.

O seguinte exemplo ilustra métodos da invenção úteis para detectar uma mutação na região de agrupamento de mutação do APC em amostras preparadas a partir de fezes.

**Exemplo 1: Detecção de Mutação na Região de Agrupamento de Mutação de APC**

São utilizados métodos da invenção para detectar a mutação pontual C→T no códon 1450 na região de agrupamento de mutação de APC, em <http://perso.curie.fr/Thierry.Soussi/APC.html> (visitado pela última vez a 20 de Fevereiro de 2001). Qualquer amostra biológica que compreenda APC pode ser utilizada, incluindo, por exemplo, uma amostra de fezes. Para a análise de amostras de fezes, os métodos preferenciais da invenção compreendem a obtenção de pelo menos uma seção transversal ou porção circunferencial de fezes evacuadas, tal como é ensinado nas patentes americanas números 5.741.650, e 5.952.178, ambas incorporadas por referência nesta invenção. É desejável uma seção transversal ou porção circunferencial das fezes, e os métodos fornecidos neste pedido são conduzidos em amostras aleatórias obtidas de fezes evacuadas, que incluem esfregaços ou raspas. Depois de obtido, o espécime de fezes é homogeneizado. Um tampão preferencial para homogenização é aquele que contém pelo menos 16 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), tal como ensinado no pedido de patente americana co-depositada, de co-propriedade com o número de série 09/491.093, incorporado por referência nesta invenção. Descobriu-se que a utilização de pelo menos 16 mM de EDTA, e, preferencialmente, de 100 mM de EDTA ou mais melhora o rendimento de ácido nucleico a partir de fezes. Portanto, um tampão preferencial para homogenização de fezes compreende salina tamponada em fosfato, 20 a 100 mM de NaCl ou KCl, pelo menos 16 mM de EDTA, e opcionalmente um detergente (tal como

SDS) e uma proteinase (por exemplo, proteinase K).

Após homogeneização, o ácido nucleico é preferencialmente isolado a partir da amostra de fezes. O isolamento ou extração de ácido nucleico não são necessários em todos os métodos da invenção, já que os métodos da invenção podem ser adequadamente realizados em fezes homogeneizadas sem isolamento de ácidos nucleicos. No entanto, numa modalidade preferencial, as fezes homogeneizadas são centrifugadas para criar um sobrenadante contendo ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e outros fragmentos celulares. O sobrenadante é tratado com um detergente e proteinase para degradar proteína, e o ácido nucleico é extraído com fenol-clorofórmio. Os ácidos nucleicos extraídos são então precipitados com álcool. Outras técnicas podem ser utilizadas para isolar o ácido nucleico da amostra. Tais técnicas incluem captura híbrida, e amplificação directamente das fezes homogeneizadas. Os ácidos nucleicos podem ser purificados e/ou isolados até ao ponto necessário pelo teste de rastreio a utilizar.

O ácido nucleico é então misturado com contas de Dynal recobertas com estreptavidina, que fornece uma matriz de fase sólida. A mistura de conta e ácido nucleico é vortexada e incubada, o que liga as contas ao ácido nucleico. O ácido nucleico pode ser amplificado por PCR, o que requer que o molde de ácido nucleico seja misturado com tampões de ligação e lavagem. A mistura de ácido nucleico é vortexada. O sobrenadante é removido, e o tampão é adicionado. Estas etapas são então repetidas várias vezes.

Utilizam-se sondas de ácidos nucleicos concebidas para complementar regiões consecutivas da região de agrupamento de mutação de APC conhecidas. As sondas são uniformes no comprimento e são fluorescentemente marcadas. A sonda e o ácido



nucleico alvo compreendendo uma mutação pontual no códon 1450 são incubados em condições que maximizam a selectividade de hibridização. Eliminam-se disparidades de temperatura de fusão da sonda, melhorando a seletividade, quando se utiliza uma combinação adequada da temperatura de hibridização, tempo, concentração de sonda, tipo de sal e concentração de sal. OTMAC é o agente selecionado para melhorar a seletividade de hibridização.

As sondas são concebidas para detectar mutações no códon 1450 na região de agrupamento de mutação de APC. Quando hibridizam nestas condições de hibridização seletiva, a presença de uma única mutação na região de agrupamento de mutação impedirá a sonda complementar de hibridizar, de tal forma que uma porção da região permanece de fita simples.

Sondas complementares consecutivas são concebidas para hibridizar a região de agrupamento de mutação de APC selvagem onde a extremidade 5' daquela região é (5'-CTCCACCACCTCCTCAAACAGCTCAAACCAAGCG AGAAGTACCTAAAAATA-3', SEQ ID NO: 1).

Na experiência, cada sonda compreende 17 nucleotídeos, e a extremidade 5' da sonda complementar projectada para a região do códon 1450 é (5'-CGCTTGTTTGTGAGCTGT-3', SEQ ID NO: 2). A sonda complementar a montante da região de mutação pontual do códon 1450 é (5'-TTGAGGAGGTGGTGGAG-3', SEQ ID NO: 3). A sonda complementar a jusante da região de mutação pontual 1450 é (5'-TATTTTGTAGGTACTTCT-3', SEQ ID NO: 4). As sondas e a amostra de ácido nucleico alvo compreendendo a mutação pontual no códon 1450 na região de agrupamento de mutação são incubadas em condições que maximizam a seletividade de hibridização. A sonda complementar à região selvagem, SEQ ID No. 2, não hibridizará com a sequência compreendendo a mutação pontual no códon 1450

(C → T na mutação pontual do códon 1450), (5'-ACAGCTCAAACCAAGTG-3', SEQ ID NO: 5). A mutação pontual no códon 1450 impede a hibridização e a porção da região de APC contendo a mutação permanecerá de fita simples.

Após a hibridização, as sondas não hibridizadas são removidas pela lavagem da mistura de ácido nucleico em condições de tempo, temperatura, tipo de sal e concentração de sal que conservam os híbridos de ácido nucleico:sonda. A exposição à enzima S1 cliva o ácido nucleico alvo na região de fita simples compreendendo a mutação pontual no códon 1450, onde a sonda complementar não hibridizou.

Os produtos de degradação são separados por electroforese em gel e analisados através da utilização de um espectrofotómetro. A presença da mutação é detectada pela presença de um ou mais produtos de degradação, cada um compreendendo ácidos nucleicos de fita dupla que fluorescem sob excitação no comprimento de onda de espectrofotómetro adequado.

#### **Exemplo 2: Sondas que Bloqueiam Variantes Polimórficas no Códon 1493**

Em termos gerais, um polimorfismo de nucleotídeo único está associado com cada região tendo 1.000 pares de bases nucleotídicas. De acordo com os métodos da invenção, as variantes polimórficas associadas são factoradas no desenho de sonda tal que os polimorfismos associados estejam "bloqueados" e outras alterações possam ser detectadas.

É possível evitar a detecção de uma variante polimórfica como um falso positivo num ácido nucleico alvo. Isto dá-nos uma oportunidade para detectar a alteração novamente tais alvos. A Figura 3 ilustra métodos da invenção utilizados para bloquear o polimorfismo G → A no códon 1493 da região de agrupamento de mutação de APC, para permitir a nova detecção.

Pode ser utilizada qualquer amostra biológica que compreenda um polimorfismo associado, como por exemplo uma amostra de tecido, fezes ou sangue. Para esta análise, foram testadas separadamente amostras de sangue de seis indivíduos. O conjunto de amostras incluiu uma base de variantes polimórficas no códon 1493. Para os fins de um controlo nesta experiência, o sequenciamento de genótipo foi realizado em seis amostras individuais antes da execução da análise ilustrada na Figura 3. A sequência de controlo confirmou que o conjunto de amostras estabelecido a ser testado incluiu dois indivíduos homozigotos com duas bases G, dois indivíduos homozigotos com uma base A e uma base G, e dois indivíduos homozigotos com duas bases A.

Cada amostra individual foi analisada da seguinte forma. O ácido nucleico foi extraído de cada amostra de sangue individual. O ácido nucleico foi então misturado com contas magnéticas de Dynal recobertas com estreptavidina, que forneceram uma matriz de fase sólida. A mistura de conta e ácido nucleico foi vortexada e incubada para ligar as contas ao ácido nucleico. O ácido nucleico foi então amplificado por PCR, que requereu que o molde de ácido nucleico fosse misturado com tampões de ligação e lavagem. Durante o processo de PCR, o iniciador reverso de PCR foi biotinilado. O produto de PCR foi desnaturado e transformado em fita simples. A mistura de ácido nucleico foi vortexada. O sobrenadante foi removido, e tampão foi adicionado.

Foram concebidas sondas de ácidos nucleicos para complementar o ácido nucleico alvo incluindo as variantes polimórficas no códon 1493 da região de agrupamento de mutação de APC. As sondas são uniformes em tamanho tendo 17 pares de bases de comprimento. As sondas são concebidas para que após a hibridização a sonda posicionada em segundo a partir da

extremidade livre do ácido nucleico alvo (isto é, a extremidade do ácido nucleico alvo que não está ligada à conta) tenha um repórter P32 na sua extremidade 5'. As sondas e o ácido nucleico alvo são hibridizados a 59°C durante uma hora. A solução de hibridização foi uma mistura de 3 molares de cloreto de tetrametilamônio (TMA); 1 mM de EDTA; 10 mM de tampão fosfato num pH de 6,8; 5X de solução de Denhardt; 0,04 mg/ml de ARN de levedura; SDS a 0,1% da mistura e entre aproximadamente 0,04 micromolar e aproximadamente 0,64 micromolar da mistura de sondas. O tubo é exposto a um magneto que atrai as contas magnéticas e conserva o ácido nucleico alvo que está ligado às contas, sendo o sobrenadante removido.

Após a hibridização, as sondas não hibridizadas foram removidas pela lavagem da mistura de ácido nucleico em condições que conservam os híbridos de ácido nucleico:sonda. A solução de hibridização foi lavada uma série de vezes em condições de tempo e temperatura variadas. A solução de lavagem continha uma mistura de 3 molar de cloreto de tetrametilamônio (TMA); 1 mM de EDTA; 10 mM de tampão fosfato num pH de 6,8; e SDS a 0,1% da mistura. Após cada lavagem, o tubo é exposto a um magneto que atrai as contas magnéticas e conserva o ácido nucleico alvo que está ligado às contas, sendo o sobrenadante removido. Na primeira lavagem, a solução de hibridização foi misturada com a solução de lavagem a 59°C durante 15 minutos. Posteriormente, na segunda lavagem, a solução de hibridização foi misturada com a solução de lavagem à temperatura ambiente, a aproximadamente 22°C durante 1 minuto. Na terceira lavagem, a solução de hibridização foi misturada com a solução de lavagem à temperatura ambiente, a aproximadamente 22°C, durante aproximadamente 1 minuto.

Num tubo de teste, o ácido nucleico alvo foi exposto a

0,015 unidades por microlitro da enzima S1, no tampão contendo acetato de sódio a 50 mM, NaCl a 280 mM, e  $\text{ZnSO}_4$  a 4,5 mM, por microlitro da reação de corte por trinta minutos à temperatura ambiente, a aproximadamente 22°C. A reação é uma reação de 100 microlitros. A exposição à enzima S1 cliva qualquer região de fita simples do ácido nucleico alvo. O tubo é exposto a um magneto para atrair as contas magnéticas e conservar o ácido nucleico alvo que está ligado às contas. O sobrenadante é pipetado fora do tubo e misturado com um corante de carga.

O sobrenadante é corrido em gel de acrilamida não desnaturante a 6% a uma velocidade de 1.200 volts horas. O gel é exposto a um visualizador instantâneo, que capta a radioatividade. O gel é analisado para determinar o tamanho de fragmento e quaisquer cortes no ácido nucleico alvo podem ser determinados pelo tamanho do produto no gel.

Referindo-se à Figura 3, a Experiência 1 mostra resultados experimentais onde as seis amostras que são testadas foram expostas a sondas concebidas para complementar a variante polimórfica onde o códon 1493 é um G. As seis amostras incluem dois indivíduos com duas bases G, dois indivíduos com uma base A e uma base G, e dois indivíduos com duas bases A. Referindo-se à amostra dos dois indivíduos com duas bases G, o produto no gel mostra que a exposição ao agente S1 não cortou o alvo. O ácido nucleico alvo não foi cortado porque as sondas concebidas para complementar a variante polimórfica onde o códon 1493 é um G hibridizaram com o ácido nucleico alvo dos dois indivíduos com duas bases G. Referindo-se novamente à Experiência 1, amostras de dois indivíduos com uma base A e uma base G foram expostas às sondas concebidas para complementar a variante polimórfica onde o códon 1493 é um G. As sondas hibridizaram com a variante G dos dois indivíduos com uma base A e uma base

G. No entanto, nenhuma sonda hibridizou com a variante polimórfica da amostra alvo onde o códon 1493 é um A e mediante exposição ao agente S1, a região de fita simples no códon 1493 foi cortada gerando produto no gel. Finalmente, na Experiência 1, as amostras de dois indivíduos com duas bases A foram expostas às sondas concebidas para complementar a variante polimórfica onde o códon 1493 é um G. Nenhuma sonda hibridizou à variante polimórfica dos dois indivíduos com duas bases A, e exposição ao agente, S1, cortou o alvo na região da variante polimórfica gerando produto no gel.

Referindo-se à Figura 3, a Experiência 2 mostra os resultados experimentais onde as seis amostras que são testadas foram expostas a sondas concebidas para complementar a variante polimórfica onde o códon 1493 é um A. Mais uma vez, as seis amostras incluem dois indivíduos com duas bases G, dois indivíduos com uma base A e uma base G, e dois indivíduos com duas bases A. Referindo-se à amostra dos dois indivíduos com duas bases G, o produto no gel mostra que a exposição ao agente S1 corta o alvo na região da variante polimórfica deixando produto no gel. O ácido nucleico alvo foi cortado porque as sondas, incluindo a variante polimórfica onde códon 1493 é A, não hibridizou com o ácido nucleico alvo dos dois indivíduos com duas bases G. Referindo-se novamente à Experiência 2, amostras de dois indivíduos com uma base A e uma base G foram expostas às sondas concebidas para complementar a variante polimórfica onde o códon 1493 é um A. As sondas hibridizaram com uma variante dos dois indivíduos com uma base A e uma base G. No entanto, nenhuma sonda hibridizou à variante polimórfica da amostra alvo onde o códon 1493 é G e mediante exposição ao agente S1, a região de fita simples no códon 1493 foi cortada gerando produto no gel. Finalmente, na Experiência 2, amostras

de dois indivíduos com duas bases A foram expostas às sondas concebidas para complementar a variante polimórfica onde o códon 1493 é um A. O produto no gel mostra que a exposição ao agente S1 não cortou o alvo. O ácido nucleico alvo não foi cortado porque as sondas concebidas para complementar a variante polimórfica onde o códon 1493 é um A hibridizaram com o ácido nucleico alvo dos dois indivíduos com duas bases A.

Referindo-se à Figura 3, a Experiência 3 demonstra resultados experimentais onde as seis amostras que são testadas foram expostas a dois conjuntos diferentes de sondas: uma concebida para complementar a variante polimórfica onde o códon 1493 é um A e uma concebida para complementar a variante polimórfica onde o códon 1493 é um G. Mais uma vez, as seis amostras incluem dois indivíduos com duas bases G, dois indivíduos com uma base A e uma base G, e dois indivíduos com duas bases A. Referindo-se novamente à Experiência 3, a exposição a conjuntos de sondas concebidas para complementar tanto a variante polimórfica A como a variante polimórfica G conseguiram bloquear a região 1493 de códon na totalidade das seis amostras. Assim, ambas as sondas de variantes polimórficas bloqueiam com sucesso as variantes polimórficas nos ácidos nucleicos alvo testados e, de acordo com os métodos da invenção, quaisquer outras alterações no alvo podem ser detectadas.

Finalmente, referindo-se à Figura 3, a Experiência 4 mostra resultados experimentais onde, mais uma vez se testaram seis amostras, as amostras de dois indivíduos com duas bases G, dois indivíduos com uma base A e uma base G, e dois indivíduos com duas bases A. As seis amostras que foram testadas foram expostas a sondas, nas quais nenhuma tinha sido concebida para complementar as variantes polimórficas presentes nas seis

amostras. Referindo novamente a Experiência 4, mediante exposição ao agente S1, a região de fita simples no códon 1493 tanto da variante polimórfica onde códon 1493 é um A como da variante polimórfica onde códon 1493 é um G foi cortada gerando produto no gel. Assim, de acordo com os métodos da invenção, as sondas podem ser concebidas para bloquear o polimorfismo G→A no códon 1493 do APC para permitir a detecção doutras alterações no ácido nucleico alvo.

### **Exemplo 3: Detecção de mutação por sonda reportando sinal de porção**

Este exemplo não ilustra a invenção reivindicada.

Noutra modalidade, referindo a Figura 4A, uma porção de extinção (34) é colocada numa extremidade e uma porção repórter (32) é colocada noutra extremidade de cada uma das sondas (30) de tal forma que a ausência de hibridização de uma sonda resulte no repórter de uma sonda adjacente que não é extinta, o que resulta num sinal repórter (35). Consequentemente, uma alteração é detectada pelo sinal (35) de porção repórter (32) que resulta quando uma sonda (30) não hibridiza com o alvo no sítio de alteração. A porção repórter (32) ou repórter pode ser detectado através de um leitor de placa fluorescente ou, em alternativa, com um equipamento de gel dotado de detecção fluorescente. Não é necessário um agente de degradação para detectar a presença ou ausência da mutação no ácido nucleico alvo neste método da invenção. Consequentemente, a análise serial pode ser evitada aplicando este método da invenção.

A Figura 4B ilustra a porção repórter (32) de uma primeira sonda (30) anelada à porção de extinção (34) de uma segunda sonda (30). A porção de extinção (34) extingue ou suprime o sinal (35) da porção repórter (32). A porção de extinção (34) é



conjugada com um braço numa extremidade da sonda (30) e a porção repórter (32) é conjugada com um braço noutra extremidade da sonda (30), e cada braço pode incluir uma sequência. Numa modalidade, as sequências no braço conjugado com a porção de extinção (34) são concebidas para anelar ao braço conjugado a qualquer porção repórter (32). Numa modalidade, as sequências nos braços não são específicas para a sequência complementar ao ácido nucleico alvo. As sequências em cada braço podem variar entre aproximadamente 1 par de bases e aproximadamente 7 pares de bases.

A Figura 4C mostra um diagrama de fluxo que ilustra um método da invenção usando sondas com uma porção repórter (32) e uma porção de extinção (34) e em que nenhuma mutação está presente num ácido nucleico alvo. De acordo com este método, quando uma série de sondas (30), como ilustradas nas Figuras 4A e 4B, são misturadas em conjunto, por exemplo, em solução, o braço conjugado com cada porção de extinção (34) anelará ao braço conjugado com cada porção repórter (32). Consequentemente, cada porção repórter (32) é extinta por cada porção de extinção adjacente (34) e a mistura de sondas (30) em solução não apresenta sinal repórter.

Seguidamente, expõe-se um ácido nucleico alvo (6) à mistura de sondas (30) para formar um produto de hibridização (20). De acordo com o método, as condições de hibridização permitem apenas que sondas complementares hibridizem com o ácido nucleico alvo (6). Quando o produto de hibridização (20) não apresenta qualquer sinal, detecta-se a ausência da mutação no ácido nucleico alvo (6).

A Figura 5 mostra um diagrama de fluxo que ilustra um método da invenção utilizando sondas com uma porção repórter (32) e uma porção de extinção (34) e em que uma mutação (22)

está presente num ácido nucleico alvo (8). De acordo com este método, quando se prepara uma mistura de sondas (30), como acima se descreve, com referência às Figuras 4A a 4C, a mistura de sondas (30) não apresenta sinal repórter (35).

Subsequentemente, expõe-se um ácido nucleico alvo (8) à mistura de sondas (30) para formar um produto de hibridização (20). As condições de hibridização permitem apenas que sondas complementares (30) hibridizem com o ácido nucleico alvo (8). Como nenhuma sonda (30) será complementar à região com uma mutação (22), a hibridização não ocorrerá na região de mutação (22) e a região de mutação permanecerá de fita simples. Quando uma sonda (30) não hibridiza na região da mutação (22) então a porção repórter (32) adjacente à região com a mutação (22) apresentará o sinal (35), indicando o sinal (35) a presença da mutação (22).

Nos exemplos acima descritos, formas de realização da invenção em que um ácido nucleico alvo não contém mutação são descritas separadamente das formas de realização da invenção em que um ácido nucleico alvo contém uma mutação. No entanto, de acordo com a invenção, uma amostra pode ser heterogénea e conter moléculas de ácido nucleico alvo que são mutantes ou alteradas, além de visar moléculas de ácido nucleico que são não mutantes ou não alteradas.

Os métodos da invenção são úteis para detectar um mutante ou ácido nucleico alvo alterado numa mistura heterogénea, contendo ácido nucleico alvo não mutante ou não alterado, porque o ácido nucleico não mutante ou não alterado não interfere na geração de um sinal devido à presença do ácido nucleico mutante ou alterado. Em formas de realização preferenciais, realiza-se um ensaio de detecção da invenção numa amostra ou fração de amostra que tenha sido enriquecida em

ácido nucleico alvo mutante ou alterado utilizando os métodos descritos nesta invenção ou os métodos conhecidos na técnica.

Lisboa, 7 de Dezembro de 2010.

### **REIVINDICAÇÕES**

1. Método para detectar uma alteração num ácido nucleico alvo que se suspeita que se encontra numa amostra biológica, compreendendo as seguintes etapas:

a) adição, a uma amostra biológica que se suspeita que contenha um ácido nucleico alvo, de uma pluralidade de ácidos nucleicos peptídicos de fita simples que hibridizam contiguamente a uma região do referido ácido nucleico alvo no caso de a referida região estar inalterada;

b) adição à amostra biológica referida de um agente que degrada ácidos nucleicos de fita simples; e,

c) detecção de uma alteração no ácido nucleico alvo referido como a presença de um produto de degradação incluído nas etapas a) e b) resultante da degradação dentro da referida região do ácido nucleico alvo mencionado.

2. Método conforme reivindicação 1, em que pelo menos um membro da referida pluralidade de ácidos nucleicos peptídicos de fita simples compreende uma extremidade com um doador e uma extremidade com um extintor.

3. Método conforme reivindicação 1, compreendendo ainda as etapas de:

a) diluição de uma amostra biológica; e,

b) separação da referida amostra biológica em frações separadas de amostra.

4. Método para detectar uma alteração num ácido nucleico alvo que se suspeita que se encontra numa amostra biológica, compreendendo as seguintes etapas:

a) adição a uma amostra biológica que se suspeita que contenha um ácido nucleico alvo, de uma pluralidade de sondas que hibridizam com uma região do referido ácido nucleico alvo

de tal forma que uma lacuna separe uma ou mais das sondas hibridizadas adjacentes, caso a referida região permaneça inalterada;

b) adição à referida amostra biológica de um agente em condições que degradam ácidos nucleicos de fita simples maiores do que o tamanho da referida lacuna; e,

c) detecção de uma alteração no referido ácido nucleico alvo como a presença de um produto de degradação das etapas a) e b) resultante da degradação dentro da referida região de fita simples do referido ácido nucleico alvo.

5. Método para detecção de uma alteração num ácido nucleico alvo polimórfico que se suspeita que se encontre numa amostra biológica, compreendendo as seguintes etapas:

a) adição a uma amostra biológica que se suspeita que contenha um ácido nucleico alvo polimórfico, uma pluralidade de sondas, compreendendo a referida pluralidade sondas complementares a cada variante polimórfica do referido ácido nucleico alvo, de tal forma que as referidas sondas hibridizam contiguamente com uma região do referido ácido nucleico alvo, caso a referida região permaneça inalterada;

b) adição à referida amostra biológica de um agente que degrada ácidos nucleicos de fita simples; e,

c) detecção de uma alteração no referido ácido nucleico alvo como a presença de um produto de degradação das etapas a) e b) resultante da degradação no interior da referida região do ácido nucleico alvo mencionado.

6. Método para detectar uma alteração num ácido nucleico alvo que se se suspeita que se encontre numa amostra biológica, compreendendo as seguintes etapas:

a) adição a uma amostra biológica que se suspeita que contenha um ácido nucleico alvo, de uma pluralidade de ácidos

nucleicos de fita simples que hibridizam contiguamente a uma região alvo do referido ácido nucleico, caso a referida região permaneça inalterada;

b) adição à referida amostra biológica de um agente que degrada ácidos nucleicos de fita simples; e,

c) detecção de uma alteração no referido ácido nucleico alvo como a presença de um produto de degradação das etapas a) e b) resultante da degradação no interior da referida região do ácido nucleico alvo mencionado.

7. Método conforme qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida alteração é uma mutação associada à doença; e opcionalmente: (a) em que a referida doença é cancro; ou (b) o referido método compreende ainda a etapa de determinação da identidade da referida alteração no ácido nucleico alvo mencionado.

8. Método conforme reivindicação 1 ou reivindicação 6, em que:

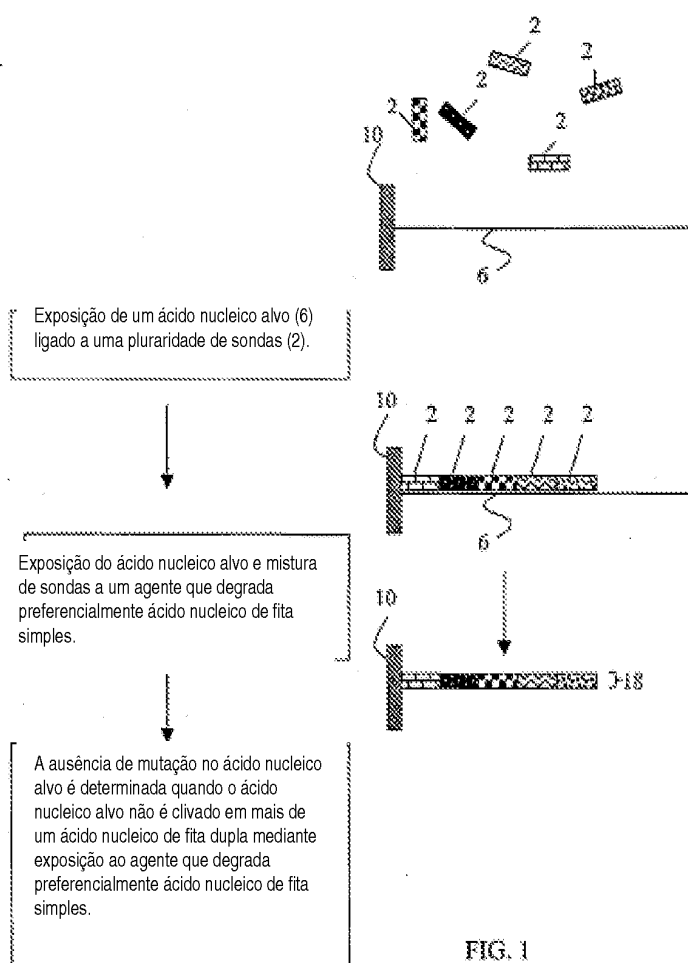
(a) pelo menos um membro da referida pluralidade de ácidos nucleicos de fita simples compreende uma marcação detectável; ou (b) em que o referido ácido nucleico alvo que se suspeita que se encontre na referida amostra biológica compreende uma marcação detectável; e no caso (a) ou (b) opcionalmente em que a referida marcação detectável é selecionada a partir do grupo consistindo de uma marcação fluorescente, um isótopo radioativo, e um marcador de peso molecular.

9. Método conforme reivindicação 1 ou reivindicação 6, em que: (a) cada membro da referida pluralidade dos ácidos nucleicos de fita simples tem entre aproximadamente 8 e 30 nucleotídeos de comprimento; (b) cada membro da referida pluralidade de ácidos nucleicos de fita simples tem uma temperatura de fusão de hibridização aproximadamente

equivalente à do referido ácido nucleico alvo; (c) o referido ácido nucleico alvo está ligado a um suporte sólido; e opcionalmente em que a extremidade 5' do referido ácido nucleico alvo está ligada ao referido suporte sólido, ou a extremidade 3' do referido ácido nucleico alvo está ligada ao referido suporte sólido; (d) a referida amostra biológica compreende um tecido ou fluido corporal; (e) o referido agente é uma enzima, e opcionalmente em que a referida enzima é selecionada a partir do grupo compreendido por nuclease S1, MutY, MutS e Mungbean; (f) o referido agente é um agente químico; (g) a referida alteração é uma mutação associada à doença e é selecionada a partir do grupo composto por inserções, eliminações, rearranjos, transições, transferências, transversões e substituições de nucleotídeo; (h) a referida amostra biológica compreende um tecido ou fluido corporal selecionado a partir do grupo composto por: escarro, fluido pancreático, biliar, linfa, plasma, urina, fluido cerebroespinal, fluido seminal, saliva, aspirado de mamilo, pus, tecido de biópsia, células fetais e fluido amniótico; (i) a referida amostra biológica é uma amostra de fezes; (j) a referida alteração é um polimorfismo de nucleotídeo único; (k) a referida alteração é herdada; ou (l) a referida alteração existe como uma sub-população numa amostra heterogénea.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o agente que degrada ácidos nucleicos de fita simples cliva selectivamente o ácido nucleico de fita simples.

Lisboa, 7 de Dezembro de 2010.





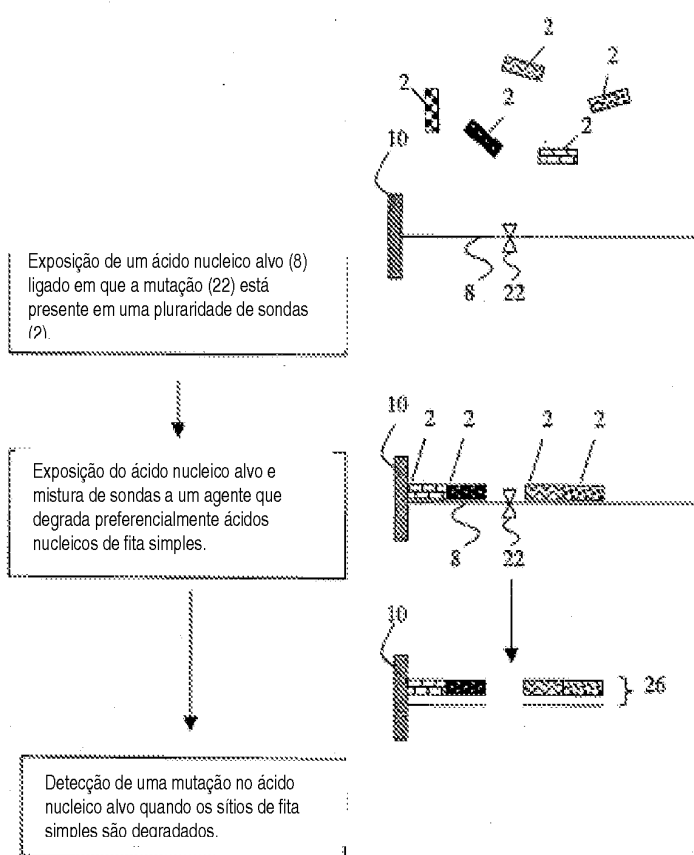


FIG. 2A

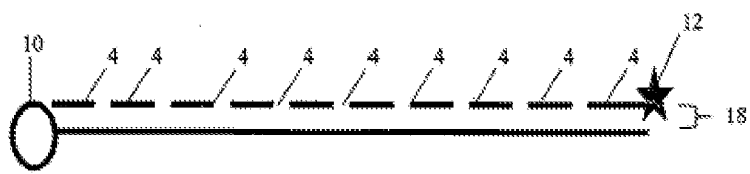


FIG. 2B

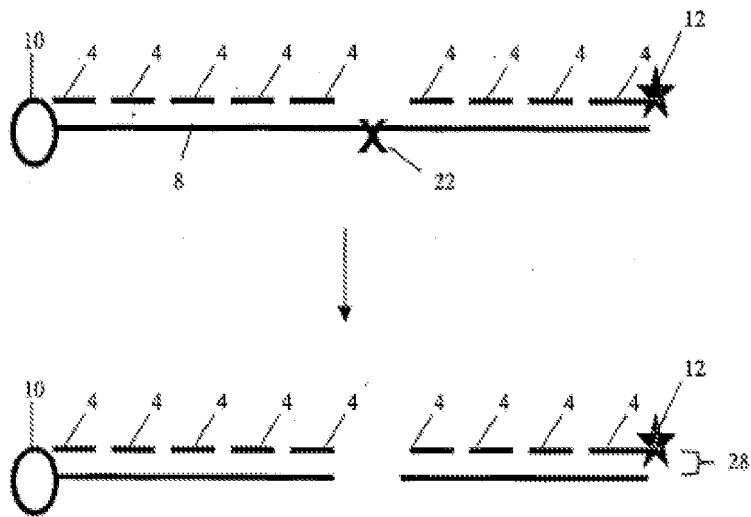


FIG. 2C

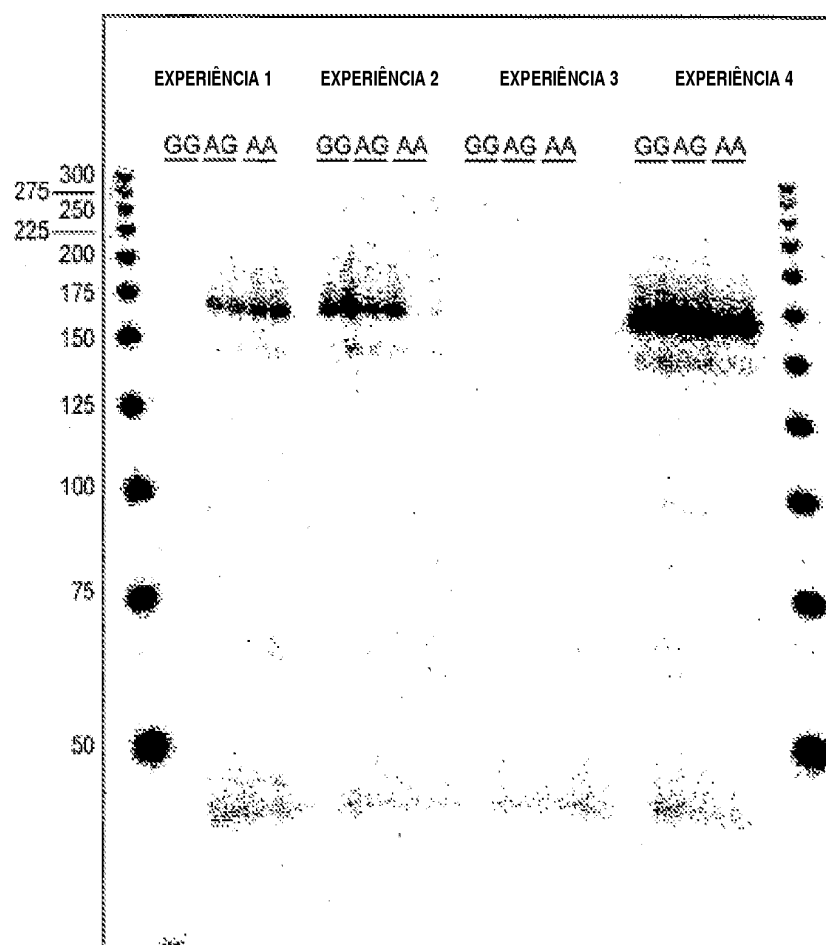


FIG. 3

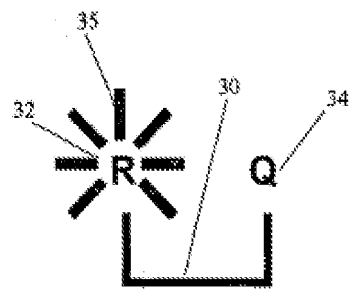


FIG. 4A

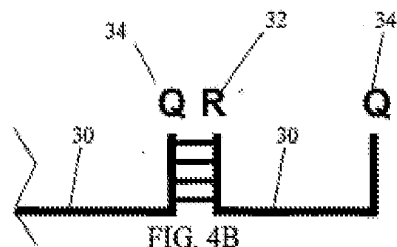


FIG. 4B



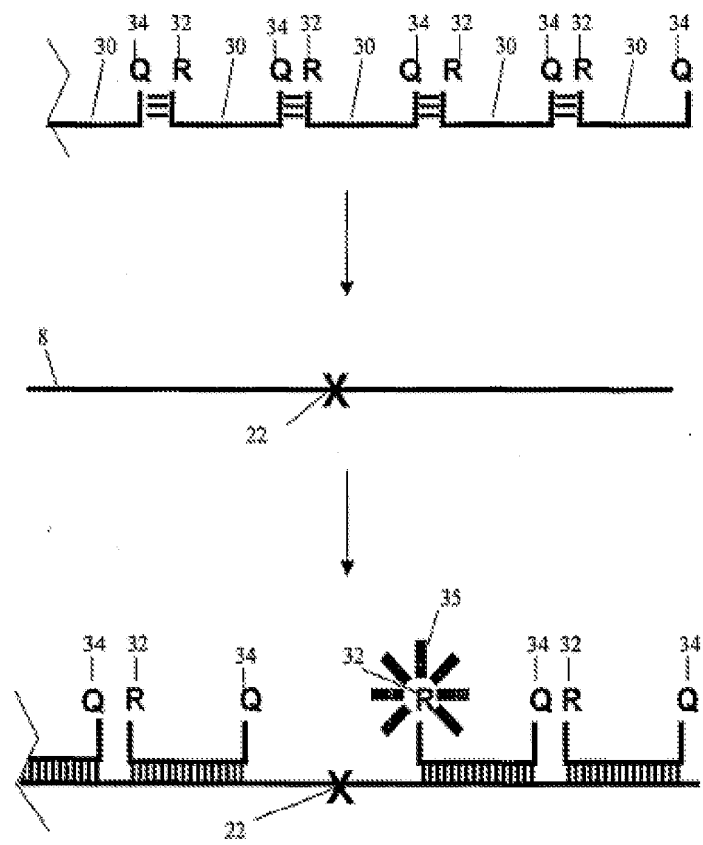


FIG. 5

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

```

<110> Exact Sciences Corporation
Shuber, Anthony

<120> Método Para Detecção de Alteração

<130> EXT-2477C

<150> US 09/809,713
<151> 2001-03-15

<150> US 09/808,491
<151> 2001-11-28

<160> 5

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
ctctaccacc cctcaccacc gctcaccacc agcgagaagt acctaccat a      51

<210> 2
<211> 17
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<221> Sonda desenhada na região do códon 1450

<400> 2
cgcttgggtt gagctgt      17

<210> 3
<211> 17
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<221> sonda a montante da região da mutação pontual 1450

<400> 3
ttgaggaggt gctggag      17

<210> 4
<211> 17
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<221> sonda a jusante da região da mutação pontual 1450

<400> 4

```



tacttttttagg tacttct

17

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

acagctcaaa ccaagtg

17