

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902097838A1

Publication Date

20140501

Applicant

SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

Title

METODO E KIT PER RIVELARE UNA SEQUENZA DI DNA BERSAGLIO
WILD-TYPE E/O MUTATA

DESCRIZIONE

del brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"METODO E KIT PER RIVELARE UNA SEQUENZA DI DNA BERSAGLIO
WILD-TYPE E/O MUTATA"

di SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

di nazionalità italiana

con sede: VIA DEI LAPIDARI, 12

BOLOGNA (BO)

Inventori: FONTANA Francesca, MANARESI Nicolo'

* * *

La presente invenzione è relativa a un metodo e a un kit per rivelare una sequenza di DNA bersaglio wild-type (wt) e/o mutata, che differiscono l'una dall'altra per il fatto che una sostituzione o delezione o inserimento nucleotidico singolo o multiplo genera/elimina un sito di restrizione per un'endonucleasi di restrizione.

Stato della tecnica

L'amplificazione totale del genoma (Whole Genome Amplification, WGA) su una cellula o poche cellule è utilizzata per amplificare il DNA al fine di consentire diversi tipi di analisi genetica, compresi il sequenziamento e la rivelazione di polimorfismi a singolo nucleotide (single nucleotide polymorphisms, SNP).

L'amplificazione totale del genoma mediante una PCR mediata da ligasi (ligation-mediated PCR, LM-PCR) basata su

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

un sito di restrizione deterministico (a cui ci si riferisce nel seguito come amplificazione DRS-WGA o DRS-WGA) è nota da EP1109938.

L'amplificazione DRS-WGA si è dimostrata migliore dell'amplificazione di singole cellule (si veda per esempio: Lee YS, et al: Comparison of whole genome amplification methods for further quantitative analysis with microarray-based comparative genomic hybridization. Taiwan J Obstet Gynecol. 2008, 47(1):32-41) come anche più tollerante alla degradazione dovuta al trattamento fissativo (si veda per esempio: Stoecklein N.H. et al: SCOMP is Superior to Degenerated Oligonucleotide Primed-PCR for Global Amplification of Minute Amounts of DNA from Microdissected Archival Samples. American Journal of Pathology 2002, Vol. 161, No. 1; Arneson N. et al.: Comparison of Whole Genome Amplification methods for analysis of DNA extracted from microdissected early breast lesions in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. ISRN Oncol. 2012; 2012;710692).

Le librerie di DNA amplificate con DRS-WGA comprendono frammenti di DNA con la struttura generale illustrata in Figura 1A. La Figura 1B illustra un esempio specifico della struttura dei frammenti di DNA di una libreria ottenuta mediante DRS-WGA utilizzando l'endonucleasi di restrizione MseI.

Saggi di rivelazione di mutazioni a valle dell'amplificazione DRS-WGA sono effettuati normalmente disegnando primer all'interno dell'amplicone dell'endonucleasi di restrizione (RE). Nonostante l'amplificazione DRS-WGA fornisca risultati migliori in termini di amplificazione uniforme e bilanciata, il disegno di saggi per determinare la presenza di mutazioni può essere complessa in circostanze in cui la mutazione in questione generi o elimini un sito di restrizione per l'endonucleasi di restrizione dell'amplificazione DRS-WGA all'interno dell'amplicone dell'RE, poiché l'usuale tecnica di disegnare primer all'interno dell'amplicone dell'RE non consente di distinguere il DNA wild-type e il DNA mutato.

A scopo esplicativo, di seguito sono illustrati esempi di mutazioni che danno origine al problema menzionato sopra per il sito di restrizione TTAA dell'endonucleasi di restrizione MseI, tuttavia gli stessi problemi si presentano con qualsiasi altro sito di restrizione. I seguenti esempi non dovrebbero essere intesi come limitanti la presente invenzione, poiché considerazioni analoghe possono applicarsi anche ad altri metodi per DRS-WGA, compresi metodi che utilizzano un'endonucleasi di restrizione che fornisce frammenti di DNA con estremità tronche.

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

Caso A. Una mutazione introduce un nuovo sito di restrizione (RS)

Sostituzione

Una sostituzione è una mutazione del DNA in cui uno (o più) nucleotidi è (sono) sostituiti erratamente con un diverso nucleotide. Ciò genera una variazione nella sequenza nucleotidica del particolare sito del DNA.

La sostituzione può pertanto introdurre un RS nella sequenza di DNA mutata (M) laddove non era presente alcun RS nella sequenza di DNA wild-type (WT).

Come esempio di una sostituzione a singola base:

| Sequenza WT | Sequenza M | Caso |
|-------------|-------------|------|
| VTAA | TTAA | (1) |
| TVAA | TTAA | (2) |
| TTBA | TTAA | (3) |
| TTAB | TTAA | (4) |

dove V è A o C o G (non T), e B è C o G o T (non A).

Delezione

Una mutazione del DNA può rimuovere uno (o più) nucleotide(i) producendo un RS nella sequenza di DNA mutata (M) laddove non era presente alcun RS nella sequenza di DNA wild-type (WT).

Per esempio per delezioni di basi singole o multiple (n):

| Sequenza WT | Sequenza M | Caso |
|-------------|------------|------|
|-------------|------------|------|

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

| | | |
|-----------------------|-------------|-----|
| T[V] _n TAA | TTAA | (5) |
| TT[V] _n AA | TTAA | (6) |
| TT[B] _n AA | TTAA | (7) |
| TTA[B] _n A | TTAA | (8) |

Inserimento

Una mutazione del DNA può inserire uno (o più) nucleotide(i) producendo un RS nella sequenza di DNA mutata (M) laddove non era presente alcun RS nella sequenza di DNA wild-type (WT).

Per esempio per un inserimento di una singola base:

| Sequenza WT | Sequenza M | Caso |
|-------------|-------------------|------|
| VTAA | [insT]TAA | (9) |
| TTAB | TT[insA]AB | (10) |

e per i casi correlati indistinguibili di:

| | | |
|------|-------------------|-------|
| VTAA | T[insT]AA | (9') |
| TTAB | TTA[insA]B | (10') |

Tutte le mutazioni di cui sopra introducono un RS, avendo come risultato che la mutazione non è identificabile nel frammento di DNA della libreria, per esempio mediante PCR e sequenziamento, quando si utilizzando coppie di primer che amplificano una regione che comprende il sito di mutazione, poiché soltanto l'allele wild-type (se presente) sarà correttamente amplificato e sequenziato. Questa situazione è delineata nella Figura 2, Caso A, riquadro di sinistra.

Caso B. La mutazione rimuove il sito di restrizione dalla sequenza wild-type (WT)

Sostituzione

Una sostituzione può rimuovere l'RS presente nella sequenza di DNA WT.

| Sequenza WT | Sequenza M | Caso |
|-------------|------------|------|
| TTAA | VTAA | (11) |
| TTAA | TVAA | (12) |
| TTAA | TTBA | (13) |
| TTAA | TTAB | (14) |

I suddetti casi corrispondono ai casi (1)-(4) in cui la sequenza di DNA M e la sequenza di DNA WT sono scambiate.

Delezione

Una mutazione nel DNA può eliminare uno (o più) nucleotidi rimuovendo un RS laddove era presente un RS nella sequenza di DNA wild-type (WT).

Per esempio per delezioni di una singola base:

| Sequenza WT | Sequenza M | Caso |
|--------------|------------|------|
| VTTAA | V[delT]TAA | (15) |
| TTAAB | TT[delA]AB | (16) |

e per i casi correlati indistinguibili di:

| | | |
|--------------|------------|-------|
| VTTAA | VT[delT]AA | (15') |
| TTAAB | TTA[delA]B | (16') |

Inserimento

Una mutazione nel DNA può inserire uno (o più) nucleotide(i) eliminando un RS laddove era presente un RS nella sequenza di DNA wild-type (WT).

| Sequenza WT | Sequenza M | Caso |
|-------------|--------------------------|------|
| TTAA | T[insV] _n TAA | (17) |
| TTAA | TT[insV] _n AA | (18) |
| TTAA | TT[insB] _n AA | (19) |
| TTAA | TTA[insB] _n A | (20) |

Qualsiasi altro caso (nonché numerosi altri casi) che comprenda(comprendano) la delezione di una o più basi come nell'esempio di cui sopra eliminerà (elimineranno) l'RS che esiste nella sequenza WT, avendo come risultato una sequenza non digerita.

Mentre la sequenza mutata può essere prontamente identificata disegnando coppie di primer che amplificano la sequenza di DNA che comprende il sito di mutazione, l'allele wild-type (se presente) non viene amplificato, risultando in una valutazione incorretta del genotipo. Questa situazione è delineata nella Figura 2, Caso B, riquadro di destra.

Per di più, quando non vi è alcuna mutazione, non vi sarebbe alcun segnale dalla PCR, e sarebbe impossibile determinare se vi è stata una mancata amplificazione dell'allele wild-type durante l'amplificazione DRS-WGA o se

il genotipo è semplicemente wild-type.

È pertanto un oggetto della presente invenzione fornire un metodo per rivelare una sequenza di DNA bersaglio wild-type (wt) e/o una sequenza di DNA bersaglio mutata in una libreria di frammenti di DNA aventi una struttura come quella ottenuta mediante DRS-WGA, in cui la sequenza di DNA bersaglio wild-type e la sequenza di DNA bersaglio mutata differiscono l'una dall'altra per la presenza di un sito di restrizione per l'endonucleasi di restrizione della DRS-WGA, che risolva i succitati problemi in un modo semplice ed efficiente.

Questo oggetto è ottenuto mediante la presente invenzione in quanto relativa a un metodo come definito nella rivendicazione 1.

È un ulteriore oggetto della presente invenzione fornire un kit come definito nella rivendicazione 9.

Definizioni

A meno che definiti altrimenti, tutti i termini tecnici e scientifici utilizzati nella presente hanno lo stesso significato comunemente inteso da una persona normalmente esperta nella tecnica a cui è relativa questa invenzione. Nonostante nella pratica o nella valutazione della presente invenzione possano essere utilizzati molti materiali e metodi simili o equivalenti a quelli descritti nella presente, di seguito sono descritti i materiali e

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

metodi preferiti. A meno che menzionato altrimenti, le tecniche descritte nella presente per uso con l'invenzione sono metodologie standard ben note alle persone normalmente esperte nella tecnica.

Mediante il termine "sito di restrizione" o "RS" si intende la sequenza di nucleotidi (tipicamente 4-8 paia di basi di lunghezza) lungo la molecola di DNA riconosciuta dall'endonucleasi di restrizione (o "RE"). In corrispondenza del sito di restrizione, l'endonucleasi di restrizione taglia i nucleotidi idrolizzando un legame di fosfodiesteri tra due di essi.

Mediante il termine "sito di restrizione mutazione-dipendente" (o "MDRS"), si intende l'RS che è introdotto o eliminato per effetto della mutazione.

Mediante il termine "sito di taglio" (or "CS"), si intende la posizione nella sequenza del sito di restrizione dove si trovano i legami fosfodiesteri idrolizzati dalla RE.

Mediante il termine "sito di taglio mutazione-dipendente" (o "MDCS"), si intende il CS introdotto o eliminato per effetto della mutazione.

Mediante il termine "amplicone" si intende una regione di DNA prodotta mediante amplificazione mediante PCR.

Mediante i termini "amplicone DRS-WGA" o "amplicone WGA", si intende un frammento di DNA amplificato durante

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

l'amplificazione DRS-WGA, comprendente una sequenza di DNA tra due RS fiancheggiati dai primer per WGA ligati.

Mediante i termini "primer per PCR WGA" o "primer universale per WGA" o "adattatore", si intende l'oligonucleotide aggiuntivo ligato a ciascun frammento generato mediante l'azione dell'enzima di restrizione nella DRS-WGA.

Mediante il termine "DNA originale", si intende il DNA genomico (gDNA) prima dell'amplificazione mediante DRS-WGA.

Mediante il termine "sequenza bersaglio", si intende la regione di interesse sul DNA originale.

Mediante il termine "filamento senso della sequenza bersaglio" si intende generalmente il segmento del filamento di DNA che si sviluppa dal 5' al 3', che ha la stessa sequenza del mRNA ed è complementare al filamento antisenso. Il filamento senso può anche essere denominato "filamento positivo".

Per amor di semplicità, nella presente descrizione, il termine "filamento positivo della sequenza bersaglio" (TSPS) sarà utilizzato con i seguenti significati:

- 1) identifica la sequenza di DNA genomico per numero di nucleotide crescente nel caso in cui la mutazione si trovi sul lato 3' del sito di taglio mutazione-dipendente sulla sequenza con numero di nucleotidi crescente;

2) identifica il complementare reverse della sequenza di DNA genomico per numero di nucleotide crescente nel caso in cui la mutazione si trovi sul lato 5' del sito di taglio mutazione-dipendente sulla sequenza con numero di nucleotidi crescente.

Coerentemente, il termine "filamento antipositivo della sequenza bersaglio" (TSAS) sarà utilizzato nella presente descrizione con i seguenti significati:

3) identifica il complementare reverse della sequenza di DNA genomico per numero di nucleotide crescente nel caso in cui la mutazione si trovi sul lato 3' del sito di taglio mutazione-dipendente sulla sequenza con numero di nucleotidi crescente;

4) identifica la sequenza di DNA genomico per numero di nucleotide crescente nel caso in cui la mutazione si trovi sul lato 5' del sito di taglio mutazione-dipendente sulla sequenza con numero di nucleotidi crescente;

L'espressione "numero di nucleotidi crescente" si riferisce alla numerazione relativa alla posizione cromosomica (come si trova nelle banche dati di sequenze come UCSC Genome Browser).

Mediante l'espressione "regione di estremità 5' di un segmento di sequenza" si intende che la localizzazione della sequenza di nucleotidi a cui ci si riferisce è verso

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

l'estremità terminale 5' del segmento di sequenza.

Mediante l'espressione "regione di estremità 3' di un segmento di sequenza" si intende che la localizzazione della sequenza di nucleotidi a cui ci si riferisce è verso l'estremità terminale 3' del segmento di sequenza.

Breve descrizione delle figure

La Figura 1A illustra uno schema della struttura generale del frammento di DNA della libreria ottenuta mediante un'amplificazione DRS-WGA specifica, utilizzando l'endonucleasi di restrizione MseI, quando non è tagliato un sito di taglio mutazione-dipendente (MDCS). Gli acronimi sono come segue: FTS = prima sequenza bersaglio; CS = sito di taglio; RS = sito di restrizione; FTSPS = filamento positivo della prima sequenza bersaglio; FTSAS = filamento antipositivo della prima sequenza bersaglio; NUCL# = numero di nucleotidi (crescente secondo la direzione della freccia); WT = wild-type; MDCS = sito di taglio mutazione-dipendente.

La Figura 1B illustra uno schema della struttura generale di un frammento di DNA della libreria ottenuta mediante un'amplificazione DRS-WGA specifica, utilizzando l'endonucleasi di restrizione MseI, quando è tagliato un sito di taglio mutazione-dipendente (MDCS). Acronimi aggiuntivi sono come segue: STS = seconda sequenza bersaglio; MDRS = sito di restrizione mutazione-dipendente;

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

M = mutato; STSPS = filamento positivo della seconda sequenza bersaglio; STSAS = filamento antipositivo della seconda sequenza bersaglio.

La Figura 1C illustra uno schema dei filamenti positivo e antipositivo della prima sequenza bersaglio e le localizzazioni dei relativi primer reverse e forward. Acronimi aggiuntivi sono come segue: R1 = primo primer reverse; F2 = secondo primer forward.

La Figura 1D illustra uno schema dei filamenti positivo e antipositivo della seconda sequenza bersaglio e le localizzazioni dei relativi primer reverse e forward. Acronimi aggiuntivi sono come segue: F3 = terzo primer forward; F31 = prima porzione del terzo primer forward; F32 = seconda porzione del terzo primer forward.

La Figura 1E illustra uno schema dei filamenti positivo e antipositivo della prima sequenza bersaglio e le localizzazioni dei relativi primer reverse e forward, quando la mutazione è localizzata sul lato 5' del MDCS sulla sequenza per numero di nucleotidi crescente.

La Figura 1F illustra uno schema dei filamenti positivo e antipositivo della seconda sequenza bersaglio e le localizzazioni dei relativi primer reverse e forward, quando la mutazione è localizzata sul lato 5' del MDCS sulla sequenza per numero di nucleotidi crescente.

Nelle Figure 1A-1F, si fa riferimento alla situazione

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

in cui la sequenza non tagliata è la sequenza wild-type, e la sequenza tagliata è la sequenza mutata. La situazione alternativa in cui la sequenza mutata non è tagliata e la sequenza wild-type è tagliata può essere semplicemente ottenuta scambiando WT e M.

La Figura 2 illustra uno schema semplificato delle due situazioni che comprendono l'introduzione (Caso A - riquadro di sinistra) o eliminazione (Caso B) di un sito di restrizione nella sequenza di DNA mutato e le conseguenze con i metodi di rivelazione di mutazioni tradizionali.

La Figura 3 illustra un'immagine di un'elettroforesi su gel dei prodotti separati di un'amplificazione mediante PCR eseguita con una coppia di primer bivalenti per DNA wt e mutato dell'Esempio 1. Cnt: campione bianco di reazione WGA. C-: campione bianco di reazione di PCR.

Le Figure 4A e 4B illustrano schemi semplificati del principio di funzionamento del metodo secondo l'invenzione. La Figura 4A illustra la situazione in cui la mutazione introduce un sito di restrizione nella sequenza. La Figura 4B illustra la situazione in cui la mutazione elimina un sito di restrizione nella sequenza.

La Figura 5 illustra un'immagine di un'elettroforesi su gel dei prodotti separati di un'amplificazione mediante PCR eseguita con un primer 5' specifico per il mutato che

comprende il sito di restrizione, omologo per l'86% della sua lunghezza al primer WGA universale.

La Figura 6 illustra un'immagine di un'elettroforesi su gel dei prodotti separati di un'amplificazione mediante PCR eseguita con il primer 5' specifico per il wild-type dell'Esempio 3.

La Figura 7 illustra un'immagine di un'elettroforesi su gel dei prodotti separati di un'amplificazione mediante PCR eseguita con il primer 5' specifico per il mutato dell'Esempio 3.

La Figura 8 illustra un esempio di sequenziamento di un allele wild-type dell'Esempio 3.

La Figura 9 illustra un esempio di sequenziamento di un allele mutato dell'Esempio 3.

La Figura 10 illustra una tabella che riassume i risultati dell'Esempio 4.

La Figura 11 illustra un'immagine di un'elettroforesi su gel dei prodotti separati di un'amplificazione mediante PCR di cellule individuali M e WT eseguita con la coppia di primer per mutato dell'Esempio 5.

La Figura 12 illustra un'immagine di un'elettroforesi su gel dei prodotti separati di un'amplificazione mediante PCR di cellule individuali M e WT eseguita con la coppia di primer per wild-type dell'Esempio 5.

La Figura 13 illustra un esempio della sequenza del filamento reverse di una singola cellula wild-type dell'Esempio 6.

La Figura 14 illustra un esempio della sequenza del filamento reverse di una singola cellula mutata dell'Esempio 6.

La Figura 15 illustra una tabella che riassume i risultati dell'Esempio 6.

La Figura 16 illustra un esempio di sequenza del filamento reverse di una cellula wild-type (un leucocita) positiva per il prodotto di PCR mutato (vale a dire un falso positivo per il prodotto di PCR da solo), che è stato confermato invece essere un wild-type mediante il saggio dell'Esempio 6.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Il metodo secondo la presente invenzione per rivelare almeno una di almeno una prima sequenza di DNA bersaglio e almeno una seconda sequenza di DNA bersaglio da una libreria di sequenze di DNA comprende le fasi (a) a (c). La prima sequenza di DNA bersaglio differisce dalla seconda sequenza di DNA bersaglio per il fatto che una sostituzione o delezione o inserimento di un singolo nucleotide o molteplici nucleotidi nella seconda sequenza genera un sito di restrizione per un'endonucleasi di restrizione. Con riferimento alla Figura 2, caso A, riquadro di sinistra, e

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

alla Figura 4A, la prima sequenza di DNA bersaglio corrisponde alla sequenza di DNA wild-type e la seconda sequenza di DNA bersaglio corrisponde alla sequenza di DNA mutata, mentre con riferimento alla Figura 2, caso B, riquadro di destra, e alla Figura 4B, la prima sequenza di DNA bersaglio corrisponde alla sequenza di DNA mutata e la seconda sequenza di DNA bersaglio corrisponde alla sequenza di DNA wild-type.

Nella fase (a), è fornita la libreria di sequenze di DNA. Ciascuna delle sequenze di DNA della libreria comprende, rispettivamente dall'estremità 5' all'estremità 3', un primo segmento di sequenza avente una lunghezza da 15 a 50 nucleotidi, un secondo segmento di sequenza di DNA genomico come tagliato dall'endonucleasi di restrizione, e un terzo segmento di sequenza complementare reverse all'unione del primo segmento di sequenza e, se presente, dell'overhang al 5' generato dal RE. Con riferimento alla Figura 1A, il numero 1 indica il primo segmento di sequenza, il numero 2 indica il secondo segmento di sequenza, e il numero 3 indica il terzo segmento di sequenza. In una forma di realizzazione preferita il primo segmento di sequenza corrisponde al primer per PCR WGA.

L'endonucleasi di restrizione è preferibilmente MseI.

Nella fase (b), la libreria di sequenze di DNA è amplificata mediante PCR utilizzando:

- almeno un primo primer reverse che ibridizza alla regione di estremità 3' del secondo segmento di sequenza del filamento positivo dell' almeno una prima o seconda sequenza bersaglio;

- almeno un secondo primer forward che ibridizza alla regione di estremità 3' del secondo segmento di sequenza del filamento antipositivo dell' almeno una prima sequenza bersaglio;

- almeno un terzo primer forward comprendente una prima porzione che ibridizza alla regione di estremità 5' del terzo segmento di sequenza del filamento antipositivo dell' almeno una seconda sequenza bersaglio e una seconda porzione che ibridizza alla regione di estremità 3' del secondo segmento di sequenza del filamento positivo dell' almeno una seconda sequenza bersaglio.

Il terzo primer forward è di seguito talvolta indicato in breve come "primer ibrido".

Preferibilmente, nella fase (b) è utilizzato almeno un quarto primer reverse che ibridizza alla regione di estremità 3' del secondo segmento di sequenza del filamento positivo dell' almeno una seconda sequenza bersaglio.

Preferibilmente, la prima porzione dell' almeno un terzo primer forward ha una lunghezza dal 20% al 80%, ancor più preferibilmente dal 40 al 60%, rispetto alla lunghezza totale dell' almeno un terzo primer forward.

Con riferimento alla Figura 4A, il primo primer reverse corrisponde al primer reverse wild-type (WT_R), il secondo primer forward corrisponde al primer forward wild-type (WT_F), il terzo primer forward corrisponde al primer forward mutato (M_F). In una forma di realizzazione, il primo primer reverse serve ad amplificare non soltanto il filamento positivo della prima sequenza bersaglio, ma anche il filamento positivo della seconda sequenza bersaglio. In una forma di realizzazione preferita, tuttavia, un quarto primer reverse che differisce dal primo primer reverse, è utilizzato per amplificare il filamento positivo della seconda sequenza bersaglio. Nella Figura 4A, il quarto primer reverse corrisponde al primer reverse mutato (M_R).

Lo stesso principio si applica nella Figura 4B, dove il primo primer reverse corrisponde al primer reverse mutato (M_R), il secondo primer forward corrisponde al primer forward mutato (M_F), il terzo primer forward corrisponde al primer forward wild-type (WT-F), e il quarto primer reverse corrisponde al primer reverse wild-type (WT_R).

Nella fase (c), si rivelano le sequenze di DNA amplificate nella fase (b). La fase (c) può essere eseguita mediante diversi metodi di rivelazione noti nella tecnica, per esempio elettroforesi su gel, elettroforesi capillare, sequenziamento del DNA. Preferibilmente, la fase (c) è

eseguita mediante un metodo di sequenziamento del DNA. Ancor più preferibilmente il metodo di sequenziamento del DNA è il sequenziamento Sanger, o il sequenziamento mediante sintesi.

Il metodo della presente invenzione può essere utilizzato con una qualsiasi libreria di sequenze di DNA avente la struttura illustrata nella Figura 1A. Il metodo è preferibilmente utilizzato con una libreria di sequenza di DNA ottenuta mediante amplificazione totale del genoma basata su un sito di restrizione deterministico.

Secondo la presente invenzione è anche fornito un kit che comprende un primo e/o un secondo e/o un terzo primer come definito sopra. Il kit comprende preferibilmente inoltre un quarto primer come definito sopra.

Il kit può essere utilizzato per rivelare una qualsiasi mutazione che generi o elimini un sito di restrizione per l'endonucleasi di restrizione delle estremità del secondo segmento di sequenza dei frammenti di DNA della libreria. Il kit è preferibilmente utilizzato nella diagnosi di mutazioni nel gene ALK (cinasi del linfoma anaplastico) o EGFR (recettore del fattore di crescita epidermico) o PIK3CA (alfa polipeptide catalitico della fosfatidilinositol 3-cinasi).

Esempi

Esempio 1 - Approccio con primer bivalenti

Test preliminari sono stati svolti su linee cellulari SY5Y (SH-SY5Y ATCC N. di catalogo N. CRL-2266™), che recano una sostituzione da C ad A eterozigote in corrispondenza del codone 1174 del gene per ALK, trasformando una Fenilalanina in una Leucina (F1174L); considerando la sequenza fiancheggiante, la sostituzione eterozigote introduce un nuovo sito di restrizione (RS) nell'allele mutato, mentre l'allele wt non ha alcun RS.

La Figura 2 è uno schema semplificato delle sequenze e delle trasformazioni nella libreria di DNA ottenuta mediante WGA prodotta dalla mutazione.

Per rivelare mutazioni sull'RS, è stato testato il seguente approccio. Il primer universale dell'amplificazione totale del genoma (primer DRS-WGA) è stato utilizzato per disegnare un primer 5' in una nuova coppia di primer per PCR in cui il primer 3' è sovrapposto a una regione nel 3' rispetto all'RS.

La strategia è consistita nel disegnare una coppia di primer bivalenti che comprendono:

- un primer 5' avente un'omologia del 95% con il primer DRS-WGA; e
- un primer 3' che dovrebbe fornire la specificità necessaria alla PCR, per amplificare selettivamente la regione bersaglio e non altri ampliconi DRS-WGA.

Questa coppia di primer bivalenti dovrebbero servire in teoria all'amplificazione della sequenza wild-type (WT) e della sequenza (M).

Le prove sperimentali mostrano che questo approccio fornisce un risultato scarso e inappropriato, e non è in grado di garantire la rivelazione della mutazione in corrispondenza dell'RS. Come illustrato nella Figura 3, l'utilizzo di un primer bivalente fornisce un'amplificazione aspecifica, che ha come risultato numerose bande di amplificazione aventi diverse dimensioni, e nessuna banda chiaramente distinguibile di dimensioni attese (per esempio su singole cellule SY5Y, che recano la mutazione eterozigote F1174L, isolate con il saggio DEPArray™ e amplificate con DRS-WGA. 132bp per la sequenza mutata, 169bp per la sequenza WT). L'amplificazione non ha fornito una banda chiara e specifica in campioni mutati (M), wild-type (WT) e controlli negativi per la PCR (C-). Il controllo negativo della WGA (Ctr-), mostrano soltanto una banda aspecifica.

Un fattore che contribuisce a questo risultato scarso è che il primer bivalente 5' che corrisponde per il 95% al primer WGA ligato, è presente su tutti i frammenti di DNA della libreria DRS-WGA, e il primer bivalente 3' non fornisce una sufficiente specificità alla reazione di PCR.

Come esempio, il riferimento del genoma umano (Homo

Sapiens hg 19) comprende 3.095.693.981 basi. Se il genoma è digerito con un'endonucleasi di restrizione con un sito di restrizione di quattro basi (per esempio TTAA), la lunghezza media dei frammenti di DNA generati è 4 (le basi possibili) alla quarta (la lunghezza di sequenza di digestione considerata) = 256. La libreria di DNA generata comprenderebbe pertanto approssimativamente $3.095.693.981/256 \sim 12.1$ milioni di frammenti diversi, con l'assunzione semplificata di una sequenza casuale dei nucleotidi nel DNA. Tutti comprenderebbero lo stesso primer 5' (corrispondente al primer WGA dalla PCR primaria).

L'utilizzo della coppia di primer bivalenti fornisce pertanto bande aspecifiche.

Esempio 2 - Intervallo limite dell'omologia del primer ibrido

I test di amplificazione sono stati eseguiti sulla stessa linea cellulare SY5Y come nell'Esempio 1, ma utilizzando il metodo della presente invenzione.

Per testare l'amplificazione sia dell'allele wild-type (WT) sia dell'allele mutato (M) nei prodotti DRS-WGA, sono state isolate cellule SY5Y individuali mediante saggio DEPArray™, che fornisce cellule singole pure.

L'approccio di amplificazione secondo cui si utilizza un primer 5' di PCR che corrisponde al primer universale per WGA per l'86% della sua lunghezza non ha fornito una

soluzione per l'amplificazione né dell'allele WT né dell'allele M. Come illustrato nella Figura 5, l'amplificazione non ha fornito una banda chiara e specifica né nei campioni mutati (M), né in quelli wild-type (WT) e nei controlli negativi della PCR (C-). Il controllo negativo della WGA (Ctr-) mostra soltanto una banda aspecifica.

Sono stati testati primer aventi diverse percentuali di omologia con il primer universale per la WGA. I risultati sono riassunti nella seguente Tabella 1.

Tabella 1

| Primer | Omologia al | | Omologia al DNA | | TEST |
|------------|-------------|-----|-----------------|-----|------|
| | primer WGA | | originale | | |
| Universale | 21/22 | 95% | 1/22 | 5% | KO |
| Mutato 1 | 19/22 | 86% | 3/22 | 14% | KO |
| Mutato 2 | 10/20 | 50% | 10/22 | 50% | OK |
| Mutato 3 | 14/22 | 64% | 8/22 | 36% | OK |

È chiaro dai risultati della Tabella 1 che deve essere raggiunto un compromesso bilanciato per ottenere le condizioni adatte al metodo. Diversi test hanno dimostrato che la percentuale ideale di identità del primer ibrido con il primer WGA universale è dal 20% all'80%, con un efficienza ancora migliore nell'intervallo dal 40% al 60%.

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

Esempio 3 Introduzione di un nuovo RS nell'allele mutato
(gene ALK) - struttura del saggio

Il metodo secondo l'invenzione garantisce l'amplificazione (e il sequenziamento) anche nel caso di digestione incompleta mediante l'endonucleasi di restrizione. Di fatto, l'attività dell'endonucleasi di restrizione non è garantita per tutti gli RS nel DNA bersaglio, e statisticamente è presente una piccola percentuale di RS non digeriti nella DRS-WGA, che sono amplificati ciò nonostante mediante la DRS-WGA, anche se il primer per WGA (PCR primaria) è in un altro RS.

Nel caso di un sito non digerito, l'uso, per il saggio di mutazione, di soltanto una coppia di primer disegnati per la sequenza mutante, non consentirebbe l'amplificazione e il sequenziamento del bersaglio.

Anche in questo caso, test di amplificazione sono stati eseguiti sulla linea cellulare SY5Y, che - come descritto in precedenza - reca una sostituzione eterozigote da C ad A in corrispondenza del codone 1174, convertendo una Fenilalanina in una Leucina (F1174L). La sostituzione eterozigote introduce pertanto un nuovo RS nell'allele mutato, mentre l'allele wild-type non ha alcun RS.

Le sequenze dei primer di PCR utilizzate per l'amplificazione degli alleli WT e M sono illustrati in

Tabella 2. La parte della sequenza del primer omologa al primer per WGA è illustrata in grassetto e sottolineata.

Tabella 2

| Nome del Primer | Sequenza |
|------------------------|---|
| ALK_WT_F | 5' CCTCTCTGCTCTGCAGCAAAT 3' |
| ALK_WT_R | 5' TCTCTCGGAGGAAGGACTTGAG 3' |
| ALK_M1_F | 5' <u>TGCTGTCAGT</u> TAAACCACCA 3' |
| ALK_M1_R | 5' GGTCTCTCGGAGGAAGGACT 3' |

Per testare l'amplificazione sia dell'allele WT che dell'allele M nei prodotti di DRS-WGA, sono state isolate cellule SY5Y individuali con il saggio DEPArray™, che fornisce cellule singole pure.

Come controllo negativo per la rivelazione di mutazioni, sono stati isolati anche linfociti individuali con il saggio DEPArray™ e amplificati con DRS-WGA.

L'amplificazione mediante PCR dell'allele WT su campioni WT (linfociti) e M eterozigoti (SY5Y) è stata ottenuta perfettamente mediante l'utilizzo del primer 5' WT disegnato in modo specifico, che consente l'amplificazione esclusiva dell'allele WT.

Come può essere osservato in Figura 6, non vi sono prodotti di amplificazione aspecifica. Al contrario, la banda di PCR attesa (132 bp) è chiaramente distinguibile.

Il primer 5' specifico per il mutato (M) è stato testato per gli stessi linfociti e cellule SY5Y per rivelare la specificità dell'amplificazione fornita dal primer disegnato a cavallo della sequenza bersaglio e del primer universale per DRS-WGA.

Come si può vedere in Figura 7, in questo caso, come atteso, l'amplificazione specifica è stata ottenuta soltanto nel DNA amplificato mediante DRS-WGA di singole cellule SY5Y. Il DNA amplificato mediante DRS-WGA da linfociti, essendo WT per la mutazione bersaglio, era negativo per l'amplificazione attesa, ed erano presenti soltanto amplificazioni di PCR aspecifiche.

Per dimostrare che l'amplificazione ottenuta era specifica e consentiva il sequenziamento, sono stati sequenziati tutti i prodotti di amplificazione a partire dall'estremità 3'. Il corrispondente stato WT o M è stato confermato per tutti i prodotti di amplificazione dimostrando la specificità ottenuta con il metodo descritto. Un esempio di sequenziamento di un allele WT è illustrato in Figura 8, mentre un esempio di sequenziamento di un allele M è illustrato nella Figura 9.

I risultati sono riassunti nella Tabella 3.

Tabella 3

| Replicati di | Sequenza ottenuta | Sequenza ottenuta |
|---------------------|---------------------------|--------------------------|
| singole | mediante primer 5' | con primer 5' |

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

| | cellule | specifico per M | specifico per WT |
|------------------|---------|------------------------|------------------|
| linfociti | 1 | Nessun prodotto di PCR | WT |
| | 2 | Nessun prodotto di PCR | WT |
| | 3 | Nessun prodotto di PCR | WT |
| SY5Y | 1 | M | WT |
| | 2 | M | WT |
| | 3 | M | WT |

In una forma di realizzazione preferita, la seconda porzione (F32) del terzo primer forward (F3) è più corta di 30 nucleotidi in modo da non innescare erratamente una PCR sul filamento antipositivo della prima sequenza bersaglio (FTSAS) (vale a dire la sequenza wild-type in questo esempio), pertanto iniziando una reazione di PCR che può dare origine a un falso positivo (per quanto concerne la lunghezza e sequenza del suo prodotto di PCR). Più preferibilmente, la lunghezza della seconda porzione (F32) è più corta di 20 nucleotidi. Ancor più preferibilmente, la lunghezza di detta seconda porzione (F32) di detto terzo primer forward (F3) è più corta o uguale a 10 nucleotidi.

La seconda porzione (F32) del terzo primer forward (F3) non dovrebbe essere troppo corta per evitare di fornire una specificità troppo bassa, (si vedano per esempio i risultati in tabella I). In particolare, la

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

lunghezza di detta seconda porzione del terzo primer forward, dovrebbe essere maggiore della lunghezza della sequenza consenso del sito di restrizione meno la lunghezza dell'overhang 5' del DNA digerito, il tutto diviso per due. Al fine di ottenere una maggiore specificità, la seconda porzione (F32) del terzo primer forward (F3) dovrebbe essere di almeno 3 nucleotidi, e ancor più preferibilmente di almeno 6 nucleotidi, più lunga della lunghezza della sequenza consenso del sito di restrizione meno la lunghezza dell'overhang 5' del DNA digerito, il tutto diviso per due.

Esempio 4 Introduzione di un nuovo RS nell'allele mutante (gene ALK) - validazione del saggio

Il metodo descritto sopra è stato ulteriormente validato con 54 cellule singole:

- 10 SY5Y singole, vive, fresche;
- 19 SY5Y singole, precedentemente fissate con paraformaldeide (PFA) al 2% per 20 minuti a temperatura ambiente, e permeabilizzate con Inside Perm (Miltenyi Biotec);
- 19 SY5Y singole, precedentemente fissate con CytoChex™, e permeabilizzate con Inside Perm;
- 2 linfociti singoli, vivi, freschi;
- 2 linfociti singoli, precedentemente fissati con PFA al 2% per 20 minuti a temperatura ambiente, e permeabilizzati con Inside Perm (Miltenyi Biotec).

Il metodo ha amplificato l'allele WT nel 100% delle cellule SY5Y e dei linfociti, e l'allele mutante è stato amplificato in 9/10=90% SY5Y vive, 16/19=84% SY5Y fissate e permeabilizzate con cyto-chex/inside-perm, 17/19=89% SY5Y fissate e permeabilizzate con PFA al 2% per 20 minuti a temperatura ambiente/inside-perm, e 0/4=0% linfociti.

I risultati sono illustrati nella Figura 10 e riassunti nella Tabella 4.

Tabella 4

| | | ALK | |
|-----------|-----------------------|------------------|-----------------|
| | | PCR di | PCR di |
| | | allele WT | allele M |
| | | | F1174L |
| SY5Y | Vivi | 100% | 90% |
| | CytoChex, Inside Perm | 100% | 84% |
| | PFA, Inside Perm | 100% | 89% |
| Linfociti | Vivi | 100% | 0% |
| | PFA, Inside Perm | 100% | 0% |

Questi risultati mostrano l'efficacia e la robustezza del metodo della presente invenzione su numeri maggiori di campioni.

Esempio 5 Eliminazione di un RS nell'allele mutante (gene per EGFR) - disegno del saggio

Sono stati eseguiti test di amplificazione sulla linea cellulare HCC-827, recante una delezione di 5 codoni nel gene EGFR. La delezione elimina un sito di restrizione (RS), consentendo la rivelazione dell'allele M, ma non dell'allele WT che ha il RS, quando si utilizza una PCR singola e coppie di primer sul genoma umano.

Cellule HCC-827 individuali sono state isolate con DEPArray™, con linfociti come controllo della condizione WT.

Due diverse coppie di primer specifici per l'allele M (con l'RS deleto) e per l'allele WT (che conserva l'RS) sono stati disegnati e hanno condotto all'identificazione corretta sia del WT che del M.

Le sequenze dei primer per PCR utilizzate per l'amplificazione degli alleli WT e M sono mostrati nella Tabella 5. La parte della sequenza del primer omologa al primer WGA è mostrata in grassetto e sottolineata.

Tabella 5

| Nome Primer | Sequenza |
|--------------------|---|
| Ex19_M_F | 5' TAAAATTCCCGTCGCTATCAA |
| Ex19_M_R | 5' TGTGGAGATGAGCAGGGTCTAG |
| Ex19_WT_F | 5' <u>CTGTCAGT</u> TAAGAGAAGCAACATCTCC |
| Ex19_WT_R | 5' AGAGCAGCTGCCAGACATGAG |

La Figura 11 illustra i risultati dell'amplificazione di PCR delle cellule individuali M e WT con coppie di primer M, mentre la Figure 12 illustra i risultati dell'amplificazione di PCR delle cellule individuali M e WT con coppie di primer WT.

La Figura 13 illustra una sequenza del filamento reverse di una cellula singola WT, confrontata al gDNA amplificato con DRS-WGA, mentre la Figura 14 illustra una sequenza del filamento reverse di una cellula singola M, confrontata al gDNA amplificato con DRS-WGA.

Esempio 6 Eliminazione di un RS nell'allele mutante (agente EGFR)- validazione del saggio

Il metodo descritto sopra è stato ulteriormente validato con 60 cellule singole:

- 31 HCC-827 singole, trattate secondo un protocollo di arricchimento con Veridex CellSearch;
- 11 linfociti singoli, trattati secondo un protocollo di arricchimento con Veridex CellSearch;
- 17 linfociti singoli, freschi, vivi.

Il metodo ha amplificato l'allele WT in $28/31=90\%$ delle HCC-827 singole e l'allele M in $31/31=100\%$ delle HCC-827 singole.

Considerando gli 11 linfociti trattati con Veridex, $11/11=100\%$ hanno avuto come risultato un prodotto di PCR positivo per la PCR WT, $3/11=27\%$ hanno avuto come risultato

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

un prodotto di PCR positivo per la PCR M. Questi prodotti sono sequenziati e confermati essere WT. Pertanto, rivelando il DNA mediante sequenziamento, la specificità su linfociti trattati con Veridex è ancora del 100%, mentre, basandosi soltanto sulla positività della PCR, la specificità è (in questo test) di $8/11=73\%$. Rivelare la lunghezza del prodotto di DNA mediante elettroforesi su gel consentirebbe in modo simile di distinguere la lunghezza e determinare che effettivamente si tratta di WT; rivelare il prodotto di DNA mediante real-time PCR non distinguerebbe tra prodotti WT e M. Considerando i 17 linfociti freschi, $17/17=100\%$ hanno dato come risultato un prodotto di PCR positivo per la PCR WT, $0/17=0\%$ hanno dato come risultato un prodotto di PCR positivo per la M-PCR. Questi prodotti sono stati sequenziati e confermati essere WT.

Poiché vi sono 2 alleli WT per linfocita, la differenza nell'RS non digerito tra linfociti trattati con Veridex ($3/22=14\%$) e linfociti freschi ($0/34=0\%$) è statisticamente significativa.

Ciò dimostra la robustezza del metodo descritto sopra nel caso di attività di digestione mediante RE incompleta.

I risultati sono illustrati nella Figura 15 e riassunti nella Tabella 6.

Tabella 6

EGFR Esone19

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

| | Trattamento | n | PCR di allele WT | PCR di allele M con Del. E746_A750 |
|-----------|-------------|----|---------------------|---------------------------------------|
| HCC-827 | Veridex | 31 | 90% | 100% |
| linfociti | Veridex | 11 | 100% | 27% (*) |
| linfociti | Freschi | 17 | 100% | 0% |

(*) Tutte sequenze WT

Tutti i suddetti esempi dimostrano che il metodo secondo la presente invenzione garantisce l'amplificazione (e il sequenziamento) anche nel caso di attività di digestione incompleta dell'endonucleasi di restrizione. L'attività dell'RE non può sempre garantire l'effettiva digestione di tutti gli RS presenti nel DNA bersaglio, a causa del trattamento al quale le cellule sono state sottoposte (come nell'esempio precedente), o per altre ragioni collegate alla sequenza specifica intorno al sito di restrizione.

Statisticamente nel DRS-WGA è presente una bassa percentuale di RS non digeriti, che sono ciò nonostante amplificati con successo con WGA, anche se il primer universale (PCR primaria) è collegato a un altro RS.

Nel caso di un sito non digerito l'utilizzo di soltanto una PCR per la terza sequenza bersaglio (con il MDRS) non consentirebbe l'amplificazione e il sequenziamento di detto bersaglio. In caso di digestione

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

del DNA incompleta da parte dell'enzima di restrizione, il metodo dell'invenzione consente la rivelazione sia dell'allele WT che dell'allele M quando sono presenti nella libreria DRS-WGA.

La Figura 16 illustra un esempio dei risultati di sequenziamento di uno dei tre linfociti trattati con Veridex positivi per la PCR M. Questo è il caso della seconda sequenza bersaglio (con il MDRS, ma non digerito durante la WGA), che viene amplificata e sequenziata correttamente con il secondo primer forward.

Esempio 7 Introduzione di un nuovo RS nell'allele mutante (gene PIK3CA).

Come altro esempio, la mutazione M1043I, dell'esone 21 del gene PIK3CA che deriva dalla sostituzione del singolo nucleotide ATG/TAAT, può essere rivelata mediante il metodo secondo la presente invenzione.

Da un'analisi delle caratteristiche del metodo e del kit della presente invenzione, i vantaggi risultanti sono evidenti.

In particolare, in virtù del particolare disegno dei primer utilizzati per amplificare la libreria di sequenze di DNA mediante PCR, il metodo consente di rivelare in modo differenziale la prima sequenza di DNA bersaglio e la seconda sequenza di DNA bersaglio (che differiscono per la presenza di un sito di restrizione per l'endonucleasi di

restrizione del DRS-WGA) con grande specificità e robustezza.

Inoltre, l'utilizzo di un quarto primer reverse consente una rivelazione ancor più specifica e robusta e una rivelazione basata sulle dimensioni dell'amplicone, che è veloce, semplice ed economica.

Ancora, il metodo secondo la presente invenzione può essere applicato a valle di un'amplificazione totale del genoma basata su un sito di restrizione deterministico per rivelare mutazioni in un modo specifico e robusto. Queste mutazioni sono impossibili da rivelare altrimenti con i metodi di rivelazione tradizionali disponibili.

Inoltre, l'uso di un metodo di sequenziamento del DNA, in particolare il sequenziamento di Sanger o pirosequenziamento, garantisce la rivelazione corretta anche dei falsi positivi che potrebbero presentarsi nel caso di digestione incompleta dell'endonucleasi di restrizione della libreria di DNA.

Per di più, una percentuale di identità dal 20% all'80%, meglio dal 40% al 60%, del terzo primer forward con il primer WGA consente di ottenere un risultato ottimale.

Infine, è chiaro che possono essere fatte modifiche e varianti al metodo e kit descritti e illustrati senza allontanarsi dall'ambito di protezione delle rivendicazioni

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

allegate.

In particolare, il metodo può essere modificato in modo da consentire multiplexing utilizzando ulteriori coppie di primer che non interferiscono con l'amplificazione di PCR con il primo, secondo, terzo e possibilmente il quarto primer.

In aggiunta, uno o più di detti primer possono anche comprendere una sequenza di estremità 5' che non ibridizzi ad alcuno dei filamenti positivo o antipositivo della prima o della seconda sequenza bersaglio. Questa caratteristica può essere vantaggiosamente utilizzata per uno o più dei seguenti scopi:

- marcare i prodotti di PCR con un tag per il campione,
- introdurre nel prodotto di PCR un adattatore per il sequenziamento di prossima generazione,
- prevenire l'innesco spurio in reazioni di PCR multiplex.

Inoltre, poiché i prodotti di WGA della reazione di PCR possono presentare un segnale di fondo, può essere vantaggioso utilizzare un primer diverso per il sequenziamento. Ciò aggiunge un ulteriore grado di specificità, migliorando il rapporto segnale a rumore e la leggibilità del grafico di sequenza.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per rivelare almeno una di una prima sequenza di DNA bersaglio e almeno una seconda sequenza di DNA bersaglio da una libreria di sequenze di DNA, in cui la prima sequenza di DNA bersaglio differisce dalla seconda sequenza di DNA bersaglio per il fatto che una sostituzione o una delezione o un inserimento singolo o multiplo nella seconda sequenza genera un sito di restrizione per un'endonucleasi di restrizione per un'endonucleasi di restrizione, comprendente le fasi di:

(a) fornire la libreria di sequenze di DNA, ciascuna delle sequenze di DNA comprendendo, rispettivamente dall'estremità 5' all'estremità 3', un primo segmento di sequenza avente una lunghezza da 15 a 50 nucleotidi, un secondo segmento di sequenza di DNA genomico come tagliato dall'endonucleasi di restrizione, un terzo segmento di sequenza complementare reverse all'unione del primo segmento di sequenza e, se presente, dell'overhang 5' generato dall'endonucleasi di restrizione;

(b) amplificare la libreria di sequenze di DNA mediante PCR utilizzando:

- almeno un primo primer reverse che ibridizza alla regione di estremità 3' del secondo segmento di sequenza del filamento positivo dell'almeno una prima o seconda sequenza bersaglio;

- almeno un secondo primer forward che ibridizza alla regione di estremità 3' del secondo segmento di sequenza del filamento antipositivo dell' almeno una prima sequenza bersaglio;

- almeno un terzo primer forward comprendente una prima porzione che ibridizza alla regione di estremità 5' del terzo segmento di sequenza del filamento antipositivo dell' almeno una seconda sequenza bersaglio e una seconda porzione che ibridizza alla regione di estremità 3' del secondo segmento di sequenza del filamento antipositivo dell' almeno una seconda sequenza bersaglio;

(c) rivelare le sequenze di DNA amplificate nella fase (b).

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui nella fase (b) è inoltre utilizzato almeno un quarto primer reverse che ibridizza alla regione di estremità 3' del secondo segmento di sequenza del filamento positivo dell' almeno una seconda sequenza bersaglio.

3. Metodo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui la libreria di sequenze di DNA è ottenuta mediante amplificazione totale del genoma basata su un sito di restrizione deterministico.

4. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui la fase (c) è eseguita mediante un metodo di sequenziamento del DNA.

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

5. Metodo secondo la rivendicazione 4, in cui il metodo di sequenziamento del DNA è sequenziamento Sanger o sequenziamento mediante sintesi.

6. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la prima porzione dell'almeno un terzo primer forward ha una lunghezza dal 20% all'80% rispetto alla lunghezza totale dell'almeno un terzo primer forward.

7. Metodo secondo la rivendicazione 6, in cui la prima porzione dell'almeno un terzo primer forward ha una lunghezza dal 40% al 60% rispetto alla lunghezza totale dell'almeno un terzo primer forward.

8. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui almeno uno di detti primer comprende inoltre una regione di estremità 5' che non ibridizza ad alcuno di detti filamento positivo o antipositivo di detta prima o seconda sequenza.

9. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'endonucleasi di restrizione è MseI.

10. Kit comprendente un primo, un secondo, e un terzo primer secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti.

11. Kit secondo la rivendicazione 10 per uso nella diagnosi di mutazioni di ALK o EGFR o PIK3CA.

p.i.: SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

Francesco FIUSSELLO

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

CLAIMS

1. A method for detecting at least one of at least one first target DNA sequence and at least one second target DNA sequence from a library of DNA sequences, wherein the first target DNA sequence differs from the second target DNA sequence in that a single or multiple nucleotide substitution or deletion or insertion in the second sequence generates a restriction site for a restriction endonuclease, comprising the steps of:

(a) providing the library of DNA sequences, each of the DNA sequences comprising, respectively from the 5' end to the 3' end, a first sequence segment having a length from 15 to 50 nucleotides, a second sequence segment of genomic DNA as cleaved by the restriction endonuclease, and a third sequence segment reverse complementary to the union of the first sequence segment and, if any, the 5' overhang generated by the restriction endonuclease;

(b) amplifying the library of DNA sequences by PCR using:

- at least one first reverse primer which hybridises to the 3' end region of the second sequence segment of the at least one first or second target sequence positive strand;

- at least one second forward primer which hybridises to the 3' end region of the second sequence segment of the

at least one first target sequence antipositive strand;

- at least one third forward primer comprising a first portion hybridising to the 5' end region of the third sequence segment of the at least second target sequence antipositive strand and a second portion hybridising to the 3' end region of the second sequence segment of the at least one second target sequence antipositive strand;

(c) detecting DNA sequences amplified in step (b).

2. The method according to claim 1, wherein step (b) further uses at least one fourth reverse primer which hybridises to the 3' end region of the second sequence segment of the at least one second target sequence positive strand.

3. The method according to claim 1 or 2, wherein the library of DNA sequences is obtained by deterministic restriction site whole genome amplification.

4. The method according to any of claims from 1 to 3, wherein step (c) is performed by a DNA sequencing method.

5. The method according to claim 4, wherein the DNA sequencing method is Sanger sequencing or sequencing by synthesis.

6. The method according to any of the preceding claims, wherein the first portion of the at least one third forward primer has a length from 20% to 80% with respect to the total length of the at least one third forward primer.

7. The method according to claim 6, wherein the first portion of the at least one third forward primer has a length from 40% to 60% with respect to the total length of the at least one third forward primer.

8. The method according to any of the preceding claims, wherein at least one of said primers further comprises a 5' end region which does not hybridize to any of said first or second target sequence, positive or antipositive strand.

9. The method according to any of the preceding claims, wherein the restriction endonuclease is MseI.

10. A kit comprising a first, a second and a third primer according to any of the preceding claims.

11. The kit according to claim 10 for use in the diagnosis of ALK or EGFR or PIK3CA mutations.

p.i.: SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

Francesco FIUSSELLO

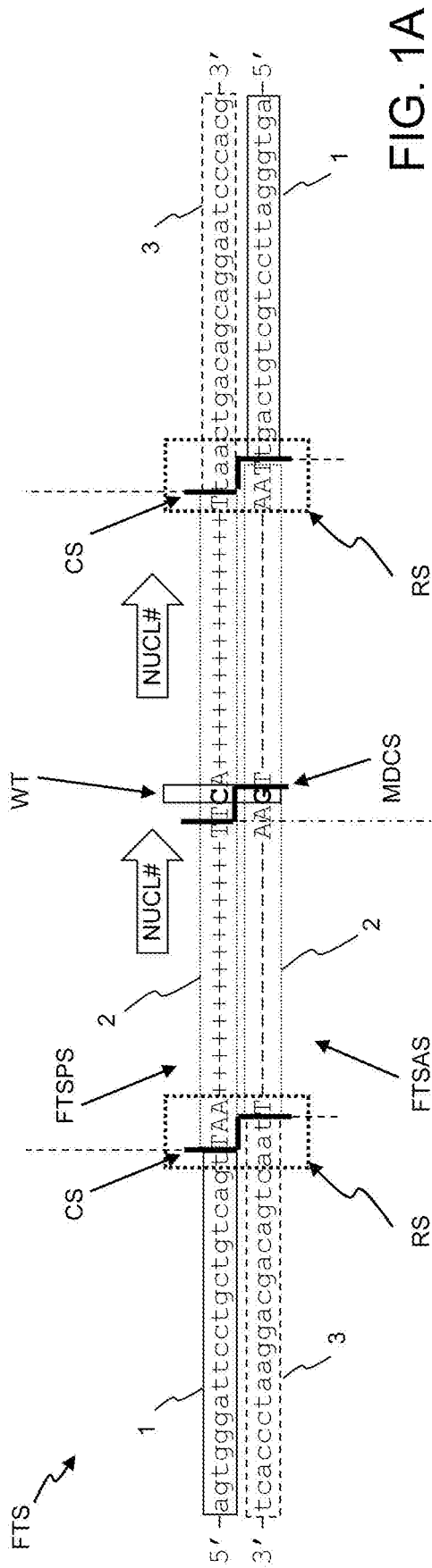


FIG. 1A

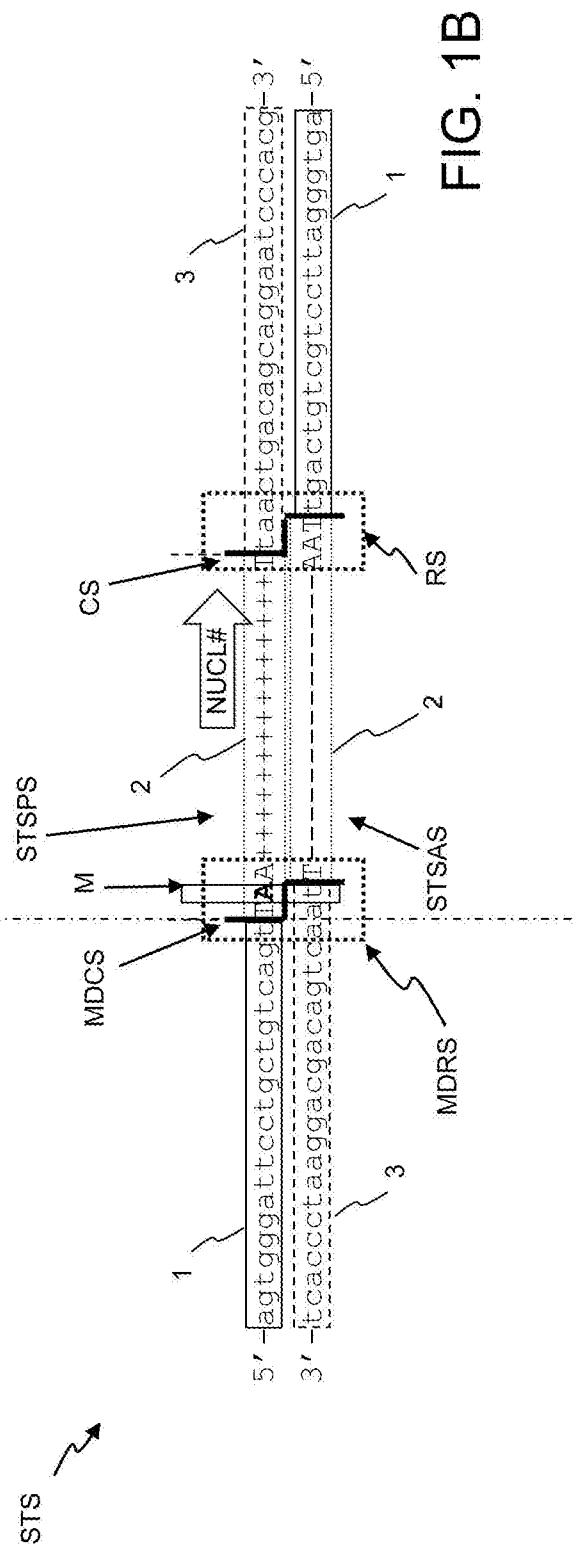
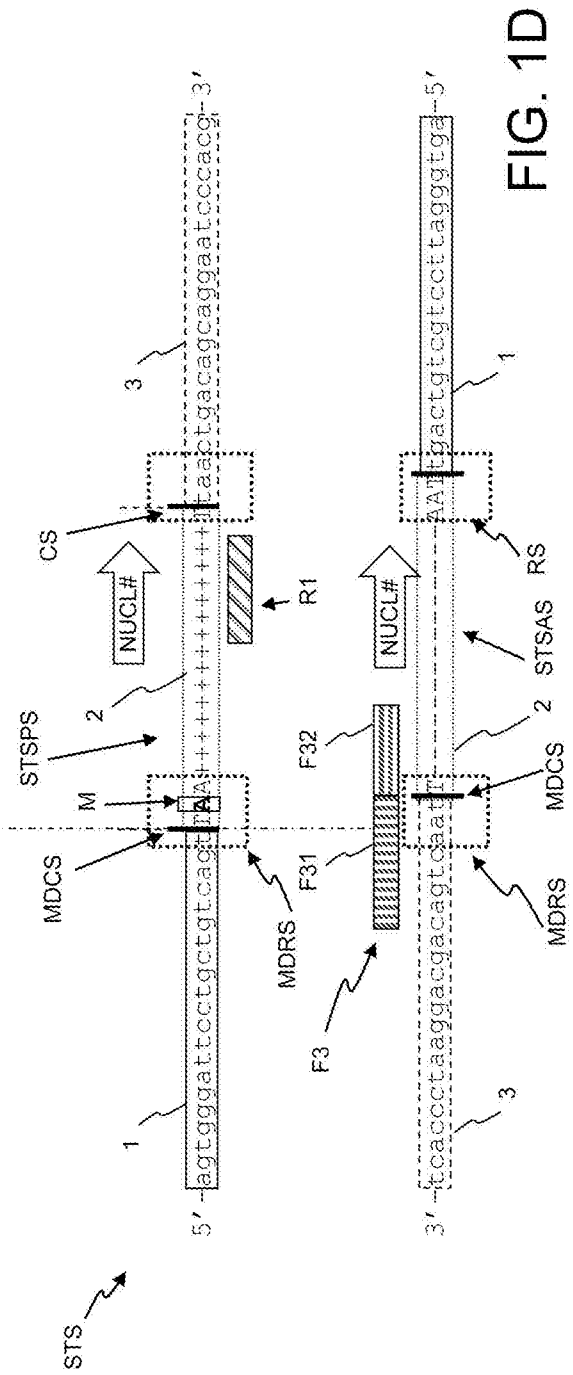
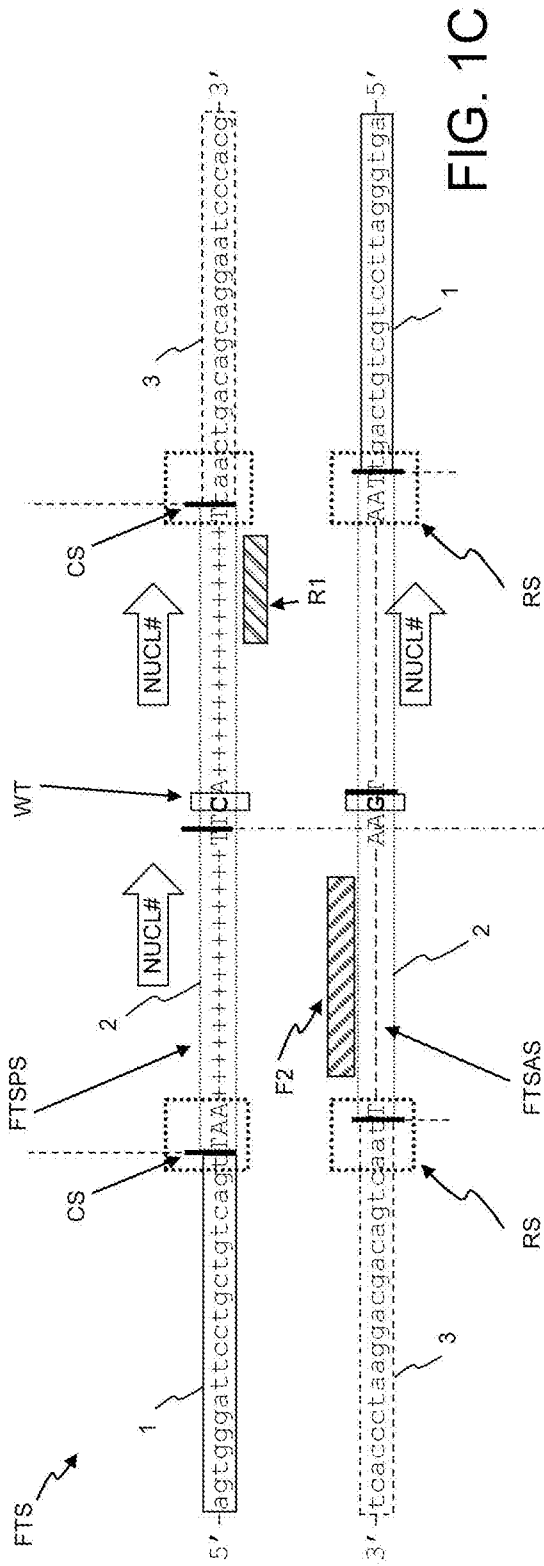


FIG. 1B

pi.: SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)



p.i.: SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

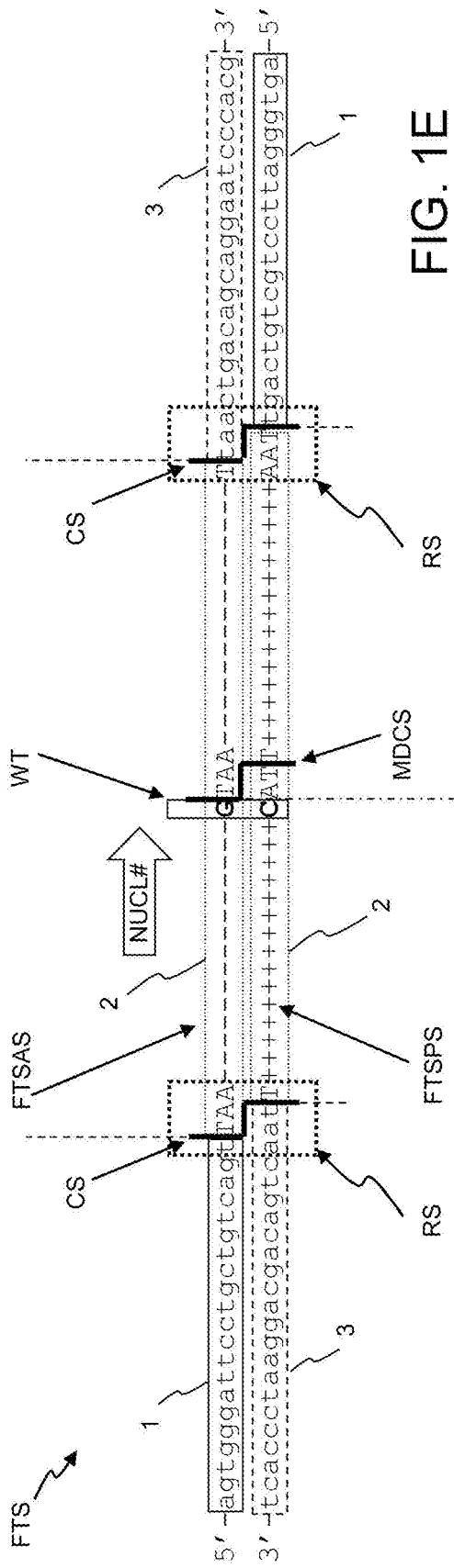


FIG. 1E

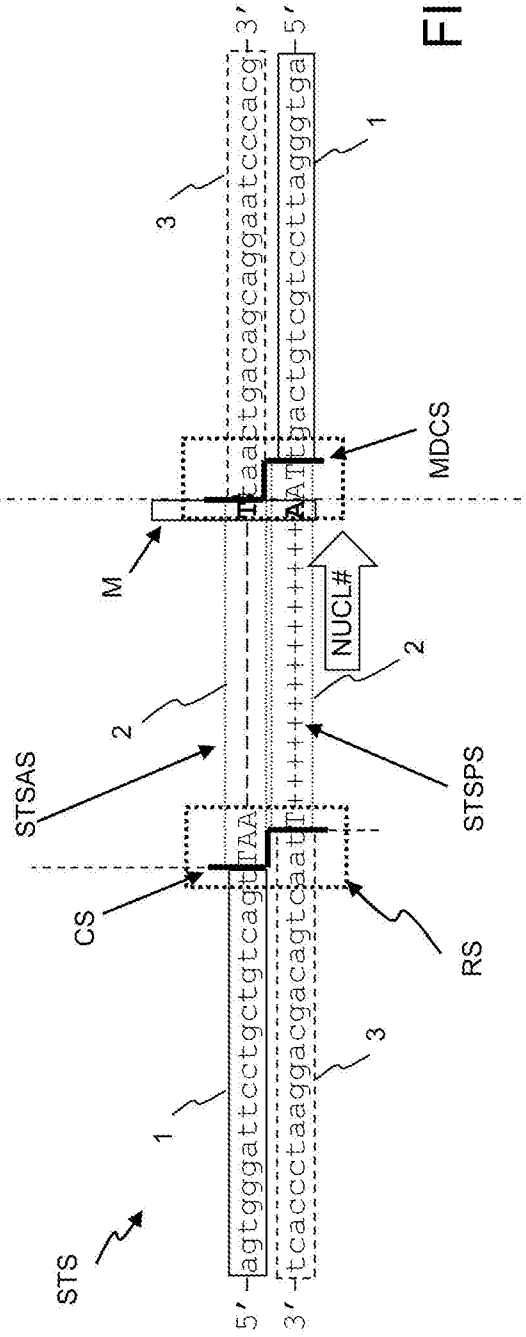


FIG. 1F

p.i.: SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

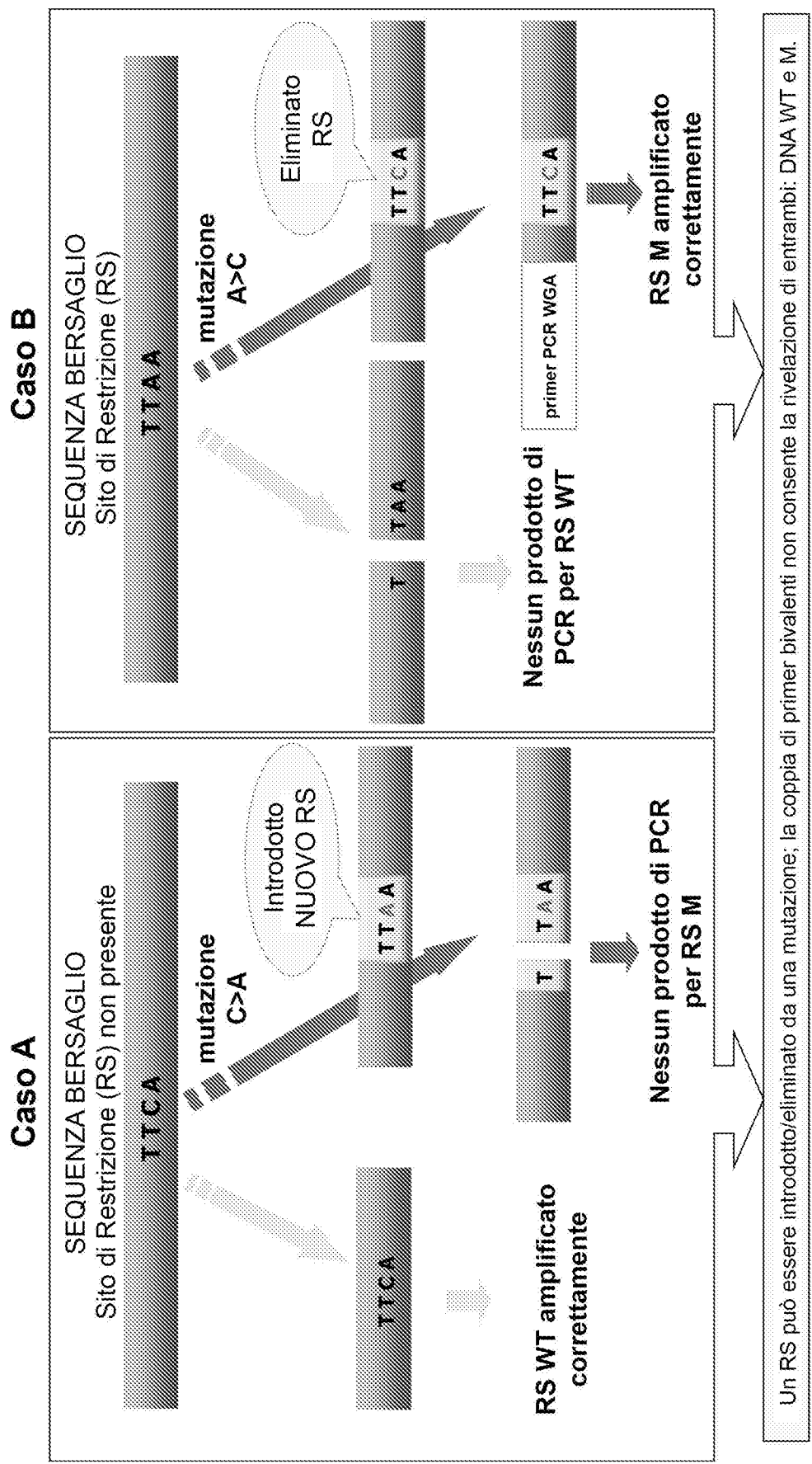


FIG. 2

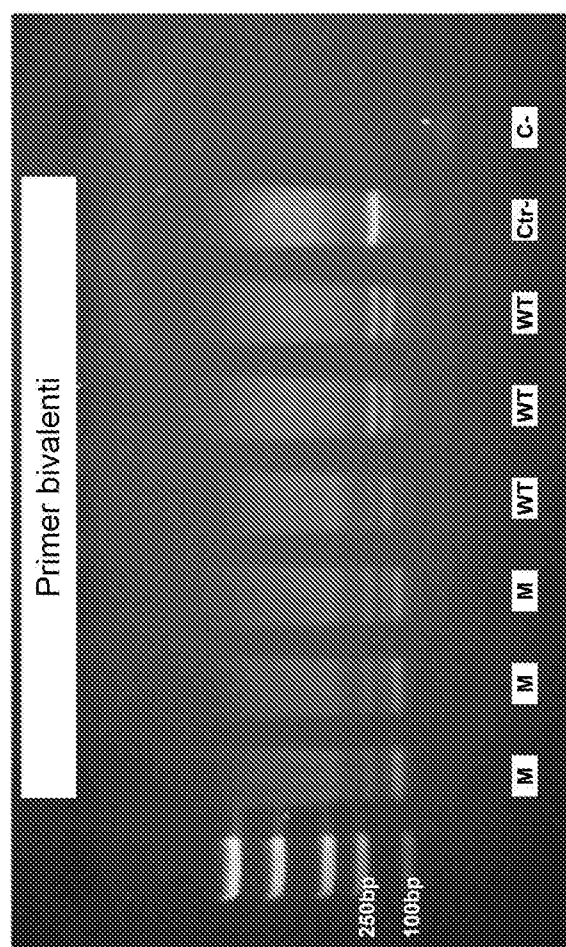


FIG. 3

p.i.: SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

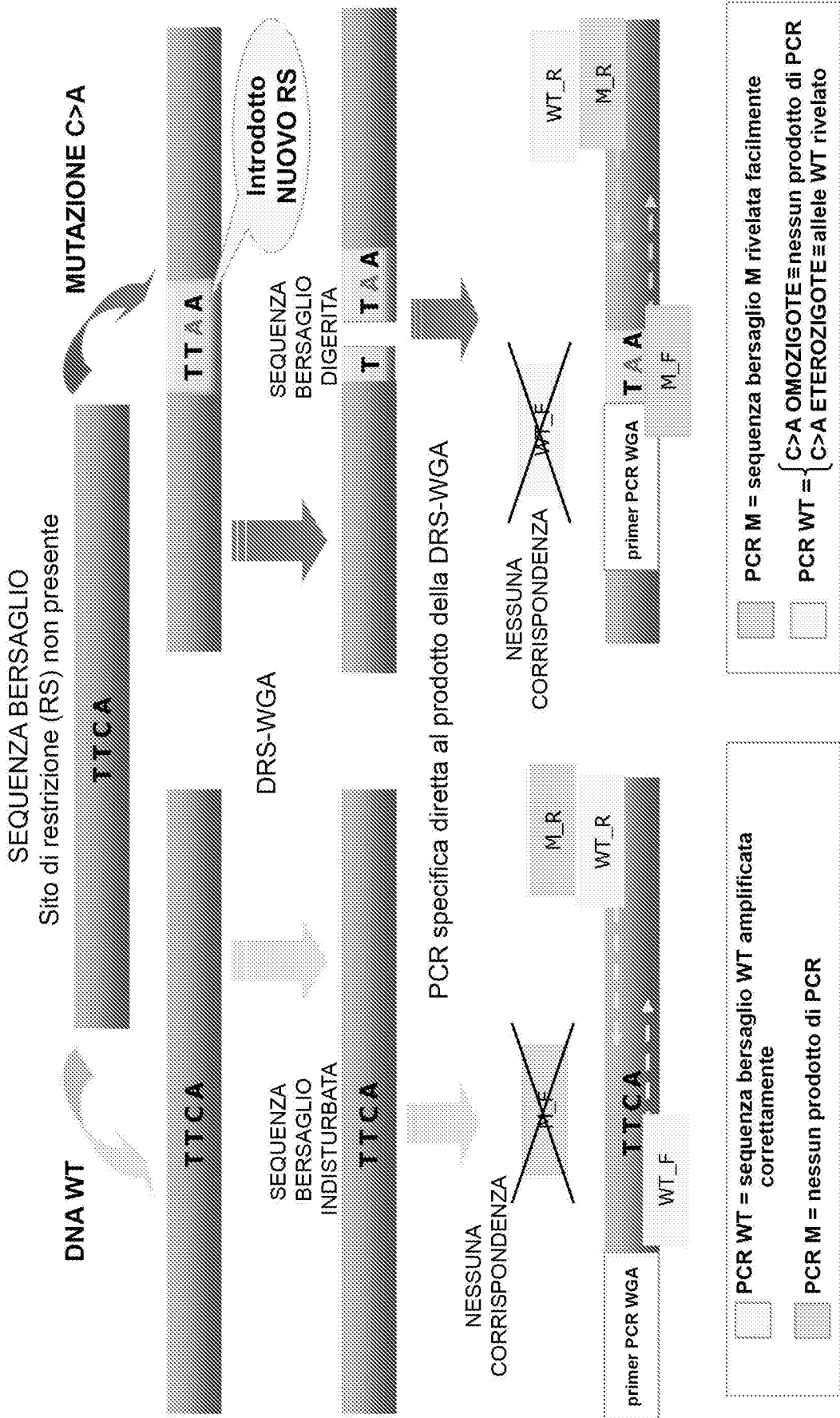


FIG. 4A

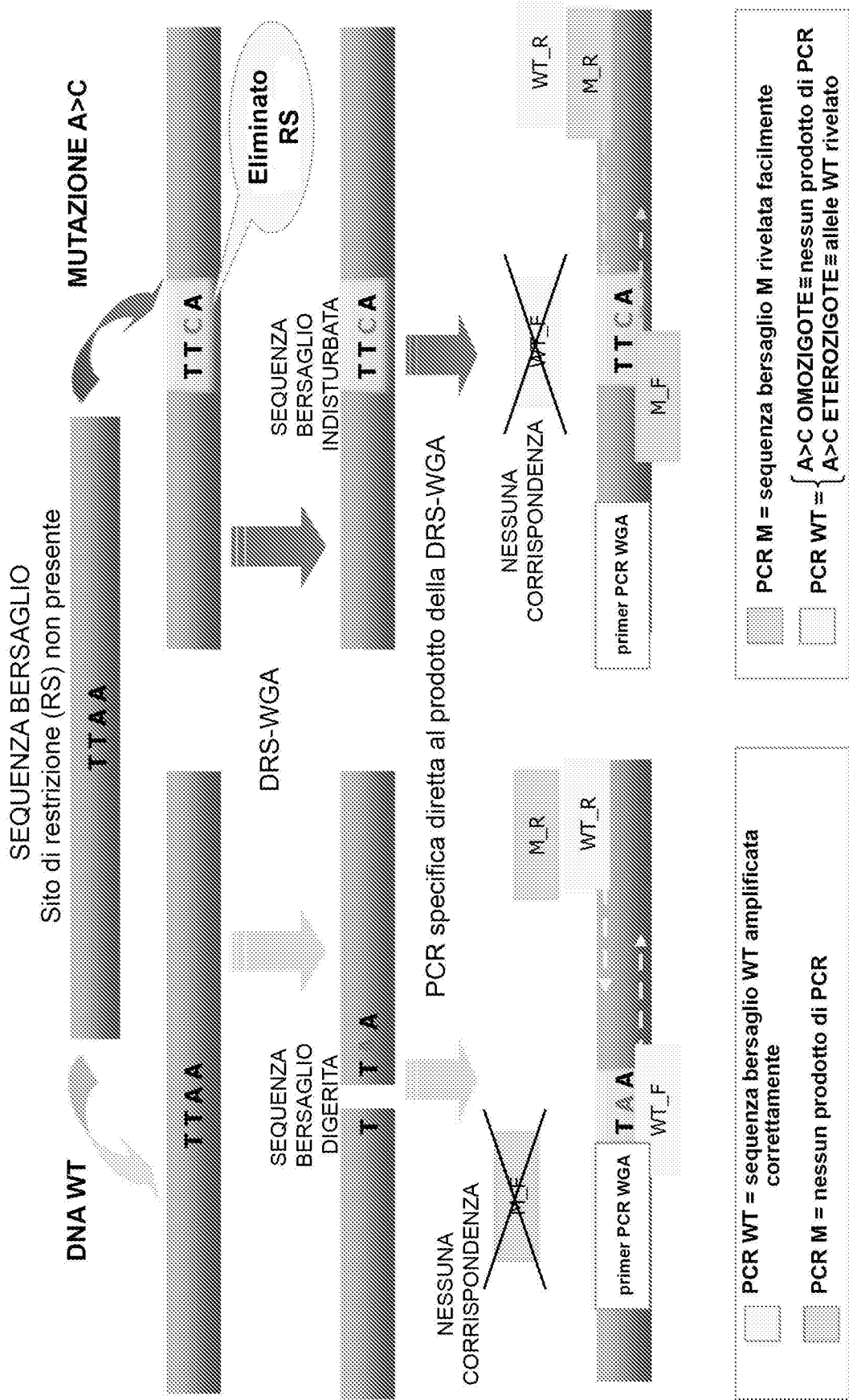


FIG. 4B

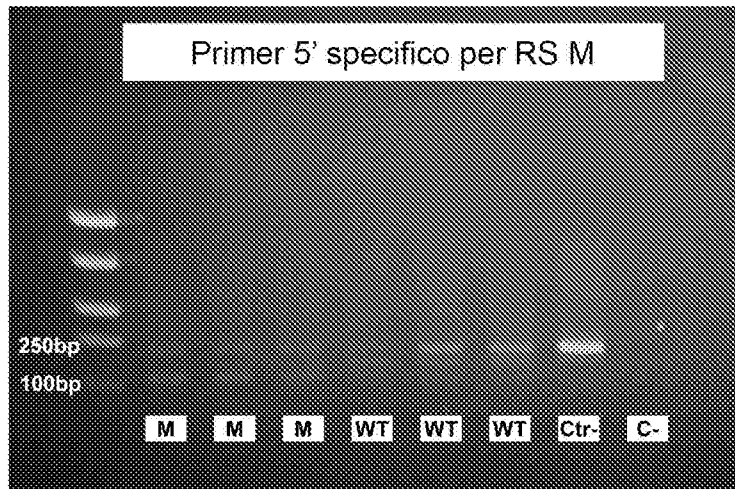


FIG. 5

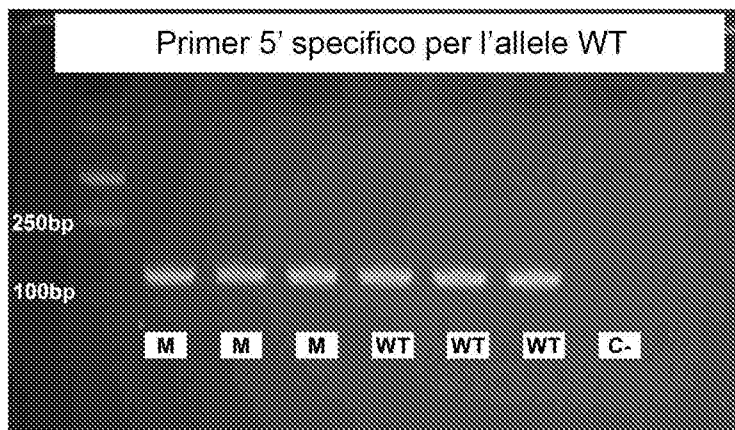


FIG. 6

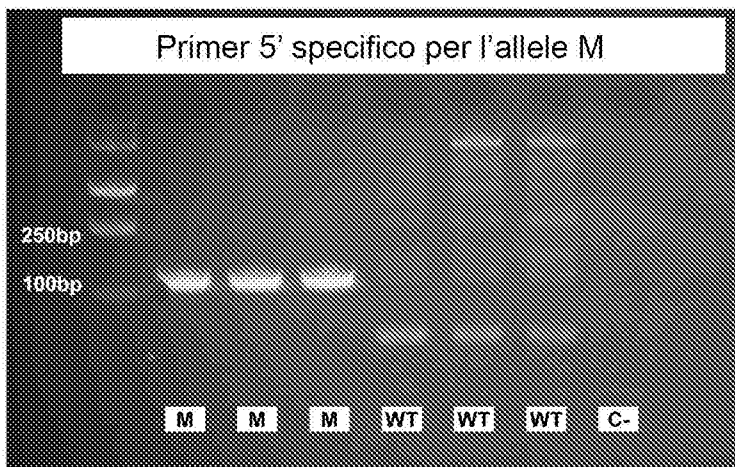


FIG. 7

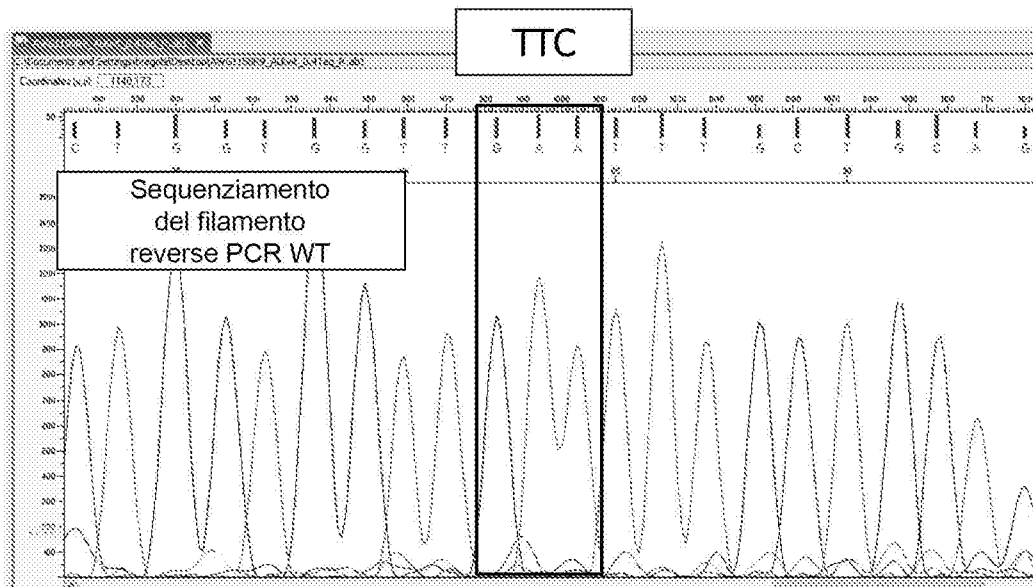


FIG. 8

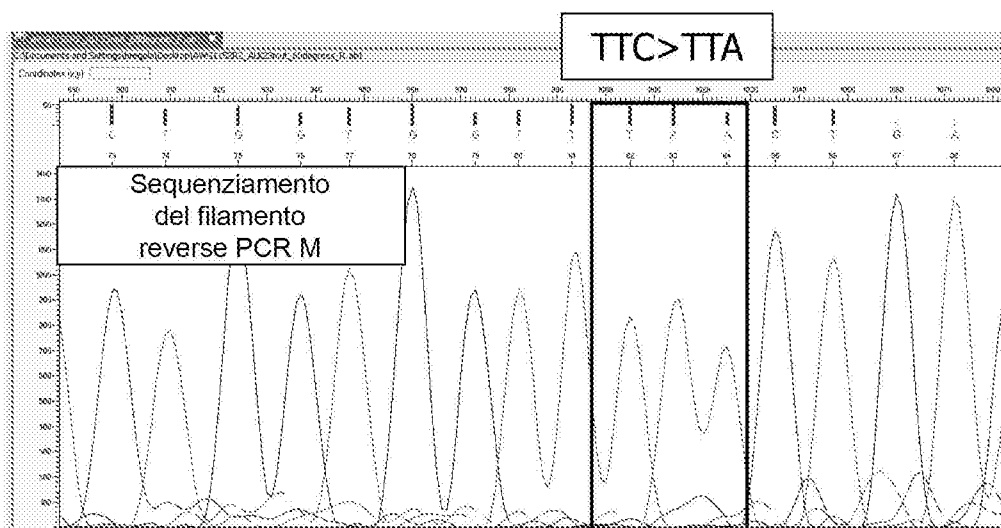


FIG. 9

| ID CELLULA | TIPO CELLULA | # CELLULA | FISSAZIONE | PERMEABILIZZAZIONE | ALK F1174 L | |
|------------|--------------|-----------|---------------|--------------------|-------------|----------|
| | | | | | ALLELE WT | ALLELE M |
| AWG1152R1 | SY5Y | 1 | Viva | na | 1 | 1 |
| AWG1152R2 | SY5Y | 1 | Viva | na | 1 | 1 |
| AWG1152R3 | SY5Y | 1 | Viva | na | 1 | 1 |
| AWG1152R4 | SY5Y | 1 | Viva | na | 1 | 0 |
| AWG1152R5 | SY5Y | 1 | Viva | na | 1 | 1 |
| AWG1152R6 | SY5Y | 1 | Viva | na | 1 | 1 |
| AWG1152R7 | SY5Y | 1 | Viva | na | 1 | 1 |
| AWG1152R8 | SY5Y | 1 | Viva | na | 1 | 1 |
| AWG1152R9 | SY5Y | 1 | Viva | na | 1 | 1 |
| AWG1152R10 | SY5Y | 1 | Viva | na | 1 | 1 |
| AWG1157R1 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1157R2 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 0 |
| AWG1157R3 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1157R4 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1157R5 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1157R6 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 0 |
| AWG1157R7 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 0 |
| AWG1157R8 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1157R9 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1157R10 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1159R1 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1159R3 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1159R4 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1159R5 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1159R6 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1159R7 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1159R8 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1159R9 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1159R10 | SY5Y | 1 | CYTO-CHEX | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1153R1 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1153R2 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1153R3 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1153R4 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1153R5 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1153R6 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1153R7 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1153R8 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1153R9 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 0 |
| AWG1153R10 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1158R1 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1158R2 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1158R3 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1158R4 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1158R5 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 0 |
| AWG1158R6 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1158R7 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1158R8 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1158R9 | SY5Y | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 1 |
| AWG1106R1 | Linfocita | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 0 |
| AWG1106R2 | Linfocita | 1 | PFA 2% 20' RT | INSIDE PERM | 1 | 0 |
| AWG1162R1 | Linfocita | 1 | Viva | na | 1 | 0 |
| AWG1162R2 | Linfocita | 1 | Viva | na | 1 | 0 |

FIG. 10

pi.: SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

| ID CELLULA | TIPO CELLULA | # CELLULA | FISSAZIONE | EGFR Esone19 Del. E746_A750 | |
|------------|--------------|-----------|------------|-----------------------------|---|
| | | | | WT | M |
| AEX1204R1 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1204R2 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1204R3 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1204R4 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1204R5 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1204R6 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1204R7 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1204R8 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1204R9 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1204R10 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1171R1 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1171R2 | HCC-827 | 1 | Veridex | 0 | 1 |
| AEX1171R3 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1171R4 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1171R5 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1171R6 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1171R7 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1171R8 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1171R9 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1171R10 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1346R1 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1346R2 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1346R3 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1346R4 | HCC-827 | 1 | Veridex | 0 | 1 |
| AEX1346R5 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1346R6 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1346R7 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1346R8 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1346R9 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1346R10 | HCC-827 | 1 | Veridex | 0 | 1 |
| AEX1346R11 | HCC-827 | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AWG1162R1 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AWG1162R2 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AWG1162R3 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AWG1162R5 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AWG1162R6 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AWG1162R7 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AWG1162R8 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AWG1205R1 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AWG1205R2 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AWG1205R3 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AWG1205R4 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AWG1205R5 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AWG1205R6 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AWG1205R7 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AWG1205R8 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AWG1205R9 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AWG1205R10 | Linfocita | 1 | Viva | 1 | 0 |
| AEX1204R11 | Linfocita | 1 | Veridex | 1 | 0 |
| AEX1204R12 | Linfocita | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1204R13 | Linfocita | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1171R11 | Linfocita | 1 | Veridex | 1 | 0 |
| AEX1171R12 | Linfocita | 1 | Veridex | 1 | 0 |
| AEX1171R13 | Linfocita | 1 | Veridex | 1 | 0 |
| AEX1171R14 | Linfocita | 1 | Veridex | 1 | 0 |
| AEX1171R15 | Linfocita | 1 | Veridex | 1 | 0 |
| AEX1346R14 | Linfocita | 1 | Veridex | 1 | 0 |
| AEX1346R15 | Linfocita | 1 | Veridex | 1 | 1 |
| AEX1346R16 | Linfocita | 1 | Veridex | 1 | 0 |

FIG. 15

p.i.: SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

