

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 073**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00989462 .7**

96 Fecha de presentación: **22.12.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1244813**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.10.2002**

54 Título: **Detección de polimorfismos basada en amplificación**

30 Prioridad:  
**30.12.1999 US 173699 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.05.2012**

73 Titular/es:  
**ABBOTT LABORATORIES  
CHAD 0377/AP6D-2, 100 ABBOTT PARK ROAD  
ABBOTT PARK, IL 60064-6050, US**

72 Inventor/es:  
**KATZ, David A.;  
GENTILE-DAVEY, Maria, C.;  
CORNWELL, Michael, J. y  
HUFF, Jeffrey, B.**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

ES 2 380 073 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Detección de polimorfismos basada en amplificación

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a polimorfismos de ácidos nucleicos y, en particular, se refiere a analizar polimorfismos usando tecnología de amplificación de ácido nucleico.

10 **Antecedentes de la invención**

Estudios diseñados para determinar la secuencia del genoma humano, así como estudios diseñados para comparar secuencias genómicas humanas, han proporcionado información con respecto a polimorfismos de tales secuencias. Se ha descrito previamente una amplia diversidad de polimorfismos en el genoma humano. Los diversos tipos de polimorfismos genéticos humanos incluyen sustituciones, inserciones o deleciones de base sencilla; números variables de repeticiones en tándem; deleciones de todo o una gran parte de un gen; amplificaciones génicas; y reordenamientos cromosómicos.

El citocromo P450 (CYP) es una familia, o grupo, de genes en el genoma humano que codifica enzimas, varias de las cuales facilitan el metabolismo de diversos fármacos. Uno de estos genes, *CYP2D6*, desempeña un papel en el metabolismo de un gran número de fármacos, incluyendo varios productos usados para tratar trastornos psiquiátricos y cardiovasculares. No resulta sorprendente, por lo tanto, que se haya descubierto que algunas variantes del *CYP2D6*, al menos en parte, alteran la capacidad de un individuo para metabolizar fármacos.

Aunque algunos polimorfismos de *CYP2D6* tienen poco efecto en la capacidad de un individuo para metabolizar fármacos, otros tienen un efecto significativo. Por ejemplo, una variante conocida como *CYP2D6* asterisco cinco (*CYP2D6*\*5, en lo sucesivo \*5) comprende una deleción de la mayor parte del gen *CYP2D6*. \*5 es una de varias variantes de *CYP2D6* que pueden contribuir a un fenotipo metabolizador bajo, característico de personas que tienen una capacidad al menos alterada para metabolizar ciertas clases de fármacos. Una posible consecuencia del fenotipo metabolizador bajo es que los fármacos, normalmente metabolizados por *CYP2D6*, pueden acumularse hasta concentraciones tóxicas en individuos metabolizadores bajos. Como alternativa, un fármaco que requiere activación por proteína *CYP2D6* puede no ser eficaz en personas que tengan el fenotipo metabolizador bajo. Otras variantes que pueden contribuir a un fenotipo metabolizador bajo incluyen una sustitución de nucleótido sencillo (*CYP2D6* asterisco 4 o *CYP2D6*\*4, en lo sucesivo en este documento \*4) y dos deleciones de nucleótido sencillo (*CYP2D6* asterisco 3 o *CYP2D6*\*3 en lo sucesivo en este documento \*3; y *CYP2D6* asterisco 6 o *CYP2D6*\*6 en los sucesivos en este documento \*6).

Por otro lado, algunos individuos portan múltiples copias del gen de *CYP2D6* (denominado de diversas formas "una amplificación" del gen *CYP2D6* o *CYP2D6*x2, en lo sucesivo en este documento x2) en sus genomas. Los individuos con esta variante pueden tener una capacidad aumentada para metabolizar ciertas clases de fármacos y por lo tanto se eliminan dosis normales de estos fármacos del cuerpo con bastante rapidez y tienen poca probabilidad de conseguir el efecto deseado. Otras variantes de *CYP2D6* incluyendo *CYP2D6* asterisco 2 (*CYP2D6*\*2 en lo sucesivo en este documento \*2), una sustitución de nucleótido sencillo, y *CYP2D6* asterisco 9 (*CYP2D6*\*9 en lo sucesivo en este documento \*9), una deleción de tres nucleótidos, no han demostrado tener ningún efecto en la capacidad de un individuo para metabolizar fármacos. Por lo tanto, existen diversos y diferentes tipos de variantes de *CYP2D6* que pueden o no alterar el metabolismo de fármacos en seres humanos.

Se han propuesto muchos métodos diferentes para detectar variantes tales como las mencionadas anteriormente. Desafortunadamente, sin embargo, han parecido necesarios previamente diferentes metodologías de detección para detectar diferentes tipos de variantes. Aunque los ensayos basados en amplificación de ácidos nucleicos para polimorfismos de nucleótido sencillo han usado tecnología que es susceptible de automatización, los ensayos basados en amplificación para detectar variaciones mayores tales como deleciones o inserciones grandes no son fácilmente susceptibles de automatización. Por ejemplo, "PCR específica de alelos" se describe en la Solicitud de Patente Europea 463 395 y es un método para detectar polimorfismos de nucleótido sencillo. Pueden realizarse ensayos basados en PCR específica de alelos usando metodologías que son relativamente fáciles de automatizar. Por otro lado, se ha empleado "PCR larga" para detectar inserciones o deleciones grandes de secuencias de ácidos nucleicos, particularmente \*5 y x2 (Johansson I., Lundqvist E., Dahl M.L., y Ingelinan-Sundberg, *Pharmacogenomics*, 6,351-355 (1996)). Aunque los productos de amplificación de PCR específica de alelos y PCR larga pueden detectarse en geles, los productos de PCR larga están limitados en cierto grado a la detección en gel. En consecuencia, las metodologías actuales requieren el uso de geles para detectar ciertos tipos de mutaciones.

Se sabe bien, sin embargo, que el procesamiento de geles consume tiempo y es por lo tanto caro. Además, no existe una plataforma sencilla que permita la detección de, por ejemplo, polimorfismos de base sencilla y deleciones grandes usando un formato sencillo que sea fácilmente susceptible de automatización. En consecuencia, existe la necesidad de medios para detectar productos de amplificación de múltiples y diferentes tipos de polimorfismos en una plataforma automática sencilla.

Johansson 1. *et al.*: "PCR-based genotyping for duplicated and deleted CYP2D6 genes", *Pharmacogenetics* vol. 6, nº 4, 1996, páginas 351-355, describen métodos basados en PCR para detección de alelos que tienen genes de CYP2D6 activos duplicados, multiplicados o delecionados, pudiendo usarse los métodos para genotipar individuos como metabolizadores bajos, intermedios, rápidos, normales o ultrarrápidos.

Stüven T. *et al.*: "Rapid detection of CYP2D6 null alleles by long-distance and multiplex-polymerase chain reaction", *Pharmacogenetics*, vol. 6, nº 5, 1996, páginas 417-421, enseñan un procedimiento de genotipación de CYP2D6 rápido que comprende amplificación de más de un ácido nucleico diana en la misma mezcla de reacción de amplificación.

El documento EP-B-0 463 395 describe cebadores para la detección de genes para enzimas que metabolizan fármacos, especialmente para la detección de la presencia o ausencia de secuencias de nucleótidos mutadas dentro de los genes de "metabolizadores bajos" de fármacos.

El documento WO 98/48052 describe un método basado en amplificación para detectar secuencias de ácidos nucleicos mutantes.

El documento WO 97/32040 proporciona un sistema de detección para su uso en un método para detectar la presencia o ausencia de una secuencia de ácido nucleico predeterminada en una muestra de ácido nucleico.

Roberts R. *et al.*: "Rapid and Comprehensive Determination of Cytochrome P450 CYP2D6 Poor Metabolizer Genotypes by Multiplex Polymerase Chain Reaction", *Human Mutation*, vol 16, 2000, páginas 77-85, describe un método de sistema de mutación refractario de amplificación múltiple (ARMS) basado en PCR, que identifica simultáneamente algunos alelos del gen CYP2D6.

Wetmur J.G. *et al.*: "DNA Probes: Applications of the Principles of Nucleic Acid Hybridization", *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 26(3/4), 1991, páginas 227-259, describen aspectos cuantitativos de termodinámica y cinética de hibridación de ácidos nucleicos, y la síntesis o biosíntesis y la detección de sondas marcadas, con un análisis de sus límites de sensibilidad y especificidad.

### Breve descripción de la invención

Se proporcionan en este documento métodos capaces de analizar secuencias de ácido nucleico polimórficas de una manera adecuada para automatización. Los métodos son particularmente adecuados para detectar secuencias de ácido nucleico que tengan una variante que sea una deleción o inserción grande. Típicamente, tales variaciones estarán en el orden de cincuenta nucleótidos o más. Provechosamente, los métodos para detectar tales secuencias de ácidos nucleicos variantes son fácilmente susceptibles de automatización y se incorporan fácilmente a un panel de ensayos que analizan múltiples tipos de polimorfismos genéticos.

De acuerdo con un método, la presencia de una deleción o una inserción en una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de ensayo comprende las etapas de: a) poner en contacto la muestra de ensayo con reactivos de amplificación y un conjunto de cebadores de amplificación para formar una mezcla de reacción en la que el conjunto de cebadores de amplificación hibridan con la secuencia de ácido nucleico diana y una secuencia de ácido nucleico convencional en la muestra de ensayo; b) someter la mezcla de reacción a condiciones de amplificación para formar un producto de amplificación de secuencia de ácido nucleico diana y un producto de amplificación de ácido nucleico convencional; c) hibridar una primera sonda con el producto de amplificación de secuencia diana y una segunda sonda con el producto de amplificación de secuencia de ácido nucleico convencional para formar híbridos de producto de amplificación de secuencia diana/primer sonda e híbridos de producto de amplificación de ácido nucleico convencional/segunda sonda; d) detectar los híbridos; y e) comparar las señales de la primera y segunda sondas marcadas para determinar la presencia de la deleción o inserción en la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra de ensayo.

### Descripción detallada de la invención

Las llamadas "variantes grandes" tales como deleciones o inserciones de múltiples bases pueden detectarse de acuerdo con los métodos proporcionados en este documento usando tecnología de amplificación de ácido nucleico. Además, los métodos para detectar tales variaciones emplean técnicas que no requieren el uso de, por ejemplo, geles, y son por lo tanto fácilmente susceptibles de automatización. Como resultado, pueden realizarse ahora ensayos para variantes grandes en un sistema automático que también puede usarse para detectar "variantes más pequeñas" tales como polimorfismos de nucleótido sencillo.

Generalmente, los métodos para detectar grandes variaciones en una secuencia de ácido nucleico en una muestra de ensayo se basan en la especificidad de cebadores de amplificación empleados para amplificar tales secuencias y/o la especificidad de sondas de hibridación empleadas para detectar productos de una reacción de amplificación. Estos métodos pueden aplicarse en reacciones de amplificación bien conocidas en la técnica que emplean

secuencias de ácido nucleico relativamente cortas (o “cebadores”) y reactivos de amplificación para cebar síntesis de múltiples copias de una secuencia diana en una muestra de ensayo. Las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, en la actualidad, se conocen bien y los ejemplos de reacciones de amplificación que pueden emplearse de acuerdo con métodos proporcionados en este documento incluyen LCR descrito en la Patente Europea N° 320 308 y sus variaciones, tales como LCR de huecos descrita en la Patente de Estados Unidos N° 5.792.607, NASBA o reacciones similares tales como TMA descrita en la Patente de Estados Unidos N° 5.399.491. Los ensayos invasores usan por ejemplo una enzima “cleavase” y preferiblemente PCR que se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.195 y 4.683.202.

La frase “reactivos de reacción de amplificación” como se usa en este documento significa reactivos que se conocen bien para su uso en reacciones de amplificación de ácidos nucleicos y pueden incluir pero sin limitación: un reactivo sencillo o múltiple, reactivos, enzima o enzimas que tienen de forma separada o individualmente actividad transcriptasa inversa, polimerasa y/o ligasa; co-factores de enzima tales como magnesio o manganeso; sales; dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD); y desoxinucleósido trifosfatos (dNTP) tales como, por ejemplo, desoxiadenosín trifosfato, desoxiguanosín trifosfato, desoxicitidín trifosfato y timidín trifosfato. Los reactivos de amplificación exactos empleados son en gran medida una elección de un experto en la materia basándose en la reacción de amplificación particular empleada.

La expresión “muestra de ensayo” como se usa en este documento significa cualquier cosa sospechosa de contener una “secuencia diana” que es una secuencia que se amplifica o detecta usando los métodos proporcionados en este documento. Una “secuencia potencial” o “secuencia diana potencial” como se usa en este documento es una secuencia diana que contiene o es sospechosa de contener una versión variante de la secuencia diana. La muestra de ensayo deriva o puede derivar de cualquier fuente, tal como por ejemplo, fuentes biológicas incluyendo sangre, plasma, fluido del cristalino, fluido cerebroespinal, leche, fluido ascítico, fluido sinovial, fluido peritoneal, fluido amniótico, tejido, caldos de fermentación, cultivos celulares, productos de una reacción de amplificación, productos de síntesis de ácido nucleico y similares. Las muestras de ensayo también pueden ser de, por ejemplo, fuentes ambientales o forenses incluyendo aguas residuales o tela. La muestra de ensayo puede usarse directamente como se obtiene de la fuente o después de un pre-tratamiento para modificar el carácter de la muestra. Por lo tanto, la muestra de ensayo puede pre-tratarse antes de su uso, por ejemplo, preparando plasma a partir de sangre, aislando células a partir de fluidos biológicos, homogeneizando tejido, rompiendo células o partículas virales, preparando líquidos a partir de materiales sólidos, diluyendo fluidos viscosos, filtrando líquidos, destilando líquidos, concentrando líquidos, inactivando componentes de interferencia, añadiendo reactivos, purificando ácidos nucleicos y similares.

De acuerdo con una realización para detectar deleciones o inserciones grandes, se seleccionan secuencias de cebadores de modo que hibriden y ceben la amplificación de una secuencia que no contiene una deleción grande, pero no amplificará la misma secuencia cuando contiene esa deleción grande. Una “deleción grande” generalmente se refiere a una deleción de ocho o más nucleótidos consecutivos y preferiblemente cincuenta o más nucleótidos consecutivos, más preferiblemente doscientos o más nucleótidos, de una secuencia de ácido nucleico. De acuerdo con esta realización, cuando está presente la deleción grande, el sitio en el que el cebador se uniría de otro modo está ausente de la secuencia diana. Preferiblemente, el sitio de unión a cebador está completamente ausente de la secuencia diana cuando está presente la deleción grande. En consecuencia, cuando una mezcla de reacción que comprende el cebador o cebadores, reactivos de amplificación y la muestra de ensayo se forma y se somete a condiciones de amplificación, se formará un producto de amplificación en ausencia de la deleción, pero no se formará en los casos en los que esté presente la deleción.

“Cebador” como se usa en este documento tiene su significado habitual y típicamente es una secuencia de ácido nucleico corta (también conocida como un oligonucleótido) típicamente al menos de ocho nucleótidos de longitud, preferiblemente al menos de diez nucleótidos de longitud y más preferiblemente de entre diez y cien nucleótidos de longitud.

La expresión “condiciones de amplificación” como se usa en este documento significa condiciones que soportan la hibridación y extensión de secuencias de cebadores. Como se conoce en la técnica las condiciones de amplificación varían con la reacción de amplificación empleada. Por ejemplo, en reacciones de amplificación tales como PCR y LCR, el aumento y reducción de la temperatura en el ambiente de la mezcla de reacción, tal como por termociclación, son condiciones de amplificación apropiadas. En casos en los que se emplean las llamadas reacciones de amplificación isotérmicas, tales como NASBA o TMA, no se requiere continuamente aumentar y reducir la temperatura como con PCR o LCR. Las condiciones de amplificación para reacciones isotérmicas generalmente requieren disociar secuencias bicatenarias, químicamente o con calor para permitir que los cebadores se unan y se produzca amplificación. En cualquier caso, las condiciones de amplificación se conocen bien y son la elección de los expertos en la materia basándose en la reacción de amplificación que se emplee.

Un conjunto preferido de condiciones de amplificación incluyen someter una mezcla de reacción al siguiente ciclo: (a) aumentar la temperatura de la mezcla de reacción a una temperatura suficiente para disociar secuencias de ácidos nucleicos bicatenarios, (b) reducir la temperatura de la mezcla de reacción para permitir que los cebadores de PCR y una sonda hibriden con el ácido nucleico y por lo tanto formen híbridos de cebadores e híbridos de sondas, (c) aumentar la temperatura de la mezcla de reacción a una temperatura suficiente para disociar los híbridos de

sondas, si la sonda no es completamente complementaria del ácido nucleico, pero no es suficiente para disociar los híbridos de cebadores y (d) aumentar la temperatura de la mezcla de reacción a una temperatura suficiente para activar la polimerasa. El número exacto de veces que se repite el ciclo dependerá de la concentración de la secuencia diana original en la muestra de ensayo pero preferiblemente el ciclo se repite al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 20 veces y más preferiblemente más de 30 veces. También se entenderá que el ciclo anterior puede incluir además una etapa en la que se detectan productos de amplificación después de cada ciclo de una manera de tipo "en tiempo real".

Las temperaturas precisas a las que, por ejemplo, se disocian las secuencias de ácido nucleicos bicatenarios, hibridan o se disocian los cebadores y sondas y la polimerasa está activa, dependen de la longitud y composición de las secuencias implicadas, y la fuente de la polimerasa. Teniendo en cuenta los factores anteriores, sin embargo, un experto en la materia puede determinar fácilmente las temperaturas más apropiadas para conseguir las funciones anteriores de forma empírica [véase por ejemplo, Wetmur, J.G., *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*; 26 págs. 227-259 (1991)]. Se ha descubierto sin embargo que, en la mayoría de los casos, las temperaturas por encima de 90 °C, y preferiblemente temperaturas entre 92 °C y 100 °C, son suficientes para disociar secuencias de ácidos nucleicos bicatenarios. Las temperaturas que son más eficaces para formar híbridos de cebadores e híbridos de sondas están típicamente entre 45 °C y 65 °C, más típicamente entre 55 °C y 59 °C. Las temperaturas suficientes para disociar los híbridos de sondas, si la sonda no es completamente complementaria del ácido nucleico, pero no es suficiente para disociar los híbridos de cebadores, incluyen temperaturas al menos un grado Celsius por encima de la temperatura de formación de híbridos y más típicamente 2 o más grados Celsius por encima de la temperatura de formación de híbridos. Las polimerasas termoestables están típicamente activas a temperaturas entre 60 °C y 90 °C, pero se cree más típicamente que son óptimamente activas a 72 °C.

La presencia de una deleción grande en una secuencia de ácido nucleico también puede detectarse con una señal positiva en lugar de detectar la presencia de una deleción grande cuando no se detecta producto de amplificación, y por lo tanto no se detecta señal cuando está presente la deleción grande, como se ha explicado anteriormente. Por ejemplo, los cebadores pueden seleccionarse de modo que cuando la deleción esté presente las secuencias estén en proximidad suficientemente cercana para permitir que el producto de extensión de un cebador actúe como un molde para otro cebador. En otras palabras, el producto de extensión de un cebador incluirá un sitio de unión para el otro cebador. En ausencia de la deleción, sin embargo los cebadores no se unirán o se unirán a sitios tan distantes entre sí que la enzima empleada para extender los cebadores no sea capaz de realizar dicha función de forma suficiente para permitir la amplificación eficaz. Por lo tanto, cuando se somete a condiciones de amplificación, un producto de amplificación se formará cuando la deleción esté presente pero no cuando la deleción esté ausente. Como resultado, el producto de amplificación de la secuencia que contiene la deleción puede detectarse como un indicio de una secuencia tal en la muestra de ensayo.

Los productos de amplificación formados de las maneras descritas anteriormente, si los hubiera, pueden detectarse y la presencia de una señal detectable puede indicar la presencia o ausencia de la deleción. Para asegurar que la no detección de un producto de amplificación particular se correlaciona con la ausencia de una secuencia diana particular, y no es resultado de la ineficacia de la reacción de amplificación (es decir, reactivos y condiciones de amplificación), puede emplearse una secuencia de control. El uso de una secuencia de control es particularmente ventajoso cuando la no detección de un producto de amplificación es indicativa de la presencia de una deleción grande.

Una secuencia de control es una secuencia diana que se añade a mezcla de reacción, o se sabe que está presente en la mezcla de reacción, y se amplifica cuando la mezcla de reacción se somete a condiciones de amplificación a pesar de la presencia o ausencia de la deleción grande en una secuencia de ácido nucleico. Las secuencias de control que no se añaden a la mezcla de reacción, pero se conoce de otro modo que están presentes en la muestra de ensayo, pueden incluir, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico que están presentes uniformemente en un genoma y no dentro de la región que contiene la deleción grande que se ensaya. También pueden añadirse cebadores apropiados a la mezcla de reacción para amplificar la secuencia de control.

Como alternativa, pueden seleccionarse secuencias de control de modo que usen los mismos cebadores usados para amplificar la secuencia que potencialmente contiene la deleción grande, tal como usando un pseudogén relacionado con la secuencia potencial como la secuencia de control. El producto de control puede detectarse para determinar que la reacción de amplificación sea eficaz y por lo tanto asegure que la no detección de la secuencia diana, que podría contener la deleción grande, se debe de hecho a la presencia de la deleción y no a un fallo de la reacción de amplificación. Las secuencias de control también pueden emplearse cuando la presencia de un producto de amplificación detectable indica la presencia de una deleción, para asegurar que la no detección de la secuencia diana se debe de hecho a la ausencia de la deleción y no a un fallo de la reacción de amplificación.

La presencia de una deleción grande en una secuencia de ácido nucleico contenida en una muestra de ensayo también puede detectarse por co-amplificación de una segunda secuencia diana (o secuencia convencional) en combinación con la secuencia que potencialmente contiene la deleción grande (la secuencia potencial). Similarmente a lo anterior, las secuencias de cebadores hibridan con una parte de la secuencia potencial en una región que está ausente cuando la deleción está presente y se observa por lo tanto una pérdida de producto de

amplificación en tales casos. De acuerdo con esta realización, también pueden detectarse inserciones grandes o amplificación génicas en una secuencia de ácido nucleico. Las inserciones grandes o amplificación génicas se refieren a un fenómeno en el que se repite una secuencia de ácido nucleico, habitualmente en forma de tándem, en un genoma. En consecuencia, cuando está presente una inserción grande, las secuencias de cebadores tienen un aumento del número de secuencias diana iniciales y por lo tanto se observa un aumento de la concentración de producto de amplificación cuando está presente la inserción grande. Preferiblemente, se detectan inserciones de al menos cincuenta pares de bases, más preferiblemente, doscientos pares de bases y más preferiblemente mil pares de bases usando este método.

Las sondas de hibridación específicas para la secuencia potencial y la secuencia convencional pueden emplearse para detectar los productos de amplificación generados para las secuencias respectivas. Las señales de grupos generadores de señal presentes en los cebadores o sondas pueden detectarse después de cada uno de los productos de amplificación. Las señales pueden después compararse. La señal detectada del producto de amplificación de la secuencia convencional actúa como un punto de referencia para determinar si está presente una amplificación o delección. En particular, si la señal de la secuencia potencial es más baja que la señal detectada a partir de la secuencia convencional, está presente una delección en la secuencia potencial hallada en la muestra de ensayo. Por otro lado si la señal de la secuencia potencial es más alta que la de la secuencia convencional, entonces está presente una amplificación génica en la secuencia potencial hallada en la muestra de ensayo.

De forma similar a la secuencia de control analizada anteriormente, la secuencia convencional puede añadirse a la mezcla de reacción en concentraciones adecuadas para realizar la comparación anterior. Preferiblemente, sin embargo, la secuencia convencional se selecciona de secuencias que se sabe que están presentes en la muestra de ensayo y que se sabe que están presentes en un número de copias particular. Se ha descubierto que las secuencias dentro de genes o pseudogenes homólogos de la secuencia potencial son útiles para fines de actuación como una secuencia convencional. Tales ejemplos son secuencias convencionales particularmente atractivas debido a que las secuencias de cebadores pueden seleccionarse de modo que al menos un cebador de un conjunto puede emplearse para amplificar tanto una secuencia convencional como la secuencia potencial para reducir de este modo el número de reactivos empleados en un ensayo. Las secuencias de cebadores para este fin pueden seleccionarse comparando las secuencias de la secuencia potencial y la secuencia convencional para sitios de cebadores adecuados que amplificarán ambas secuencias. Como resultará evidente posteriormente, también es importante en esta comparación seleccionar una secuencia del gen o pseudogén homólogo y la secuencia potencial que contiene al menos un sitio de cebador común, pero también contiene al menos una distinción de un par de bases en las secuencias entre los sitios de unión al cebador. Por lo tanto, es más preferible seleccionar una secuencia convencional de la secuencia del gen o pseudogén homólogo que contiene los mismos sitios de unión al cebador que la secuencia potencial pero es divergente de la secuencia potencial en la región entre los sitios de unión al cebador.

Los productos de amplificación de la secuencia potencial, sin los hubiera, y la secuencia convencional se detectan después usando sondas que son específicas para una de las secuencias. En la práctica, por lo tanto, se forma una mezcla de reacción poniendo en contacto una muestra de ensayo con reactivos de amplificación y conjuntos de cebadores para amplificar la secuencia potencial y la secuencia convencional. La mezcla de reacción se sitúa en condiciones de amplificación para formar un producto de amplificación a partir de la secuencia convencional y un producto de amplificación a partir de la secuencia potencial, en el caso de que no contenga la delección grande. Se hibridan después sondas, específicas para los productos de amplificación respectivos, con los productos de amplificación para formar híbridos de sonda/secuencia convencional e híbridos de sonda/secuencia potencial. Los híbridos respectivos pueden diferenciarse usando diversos esquemas de marcaje o separación bien conocidos en la técnica y analizados posteriormente y pueden detectarse las señales respectivas. Puede compararse después cualquier señal asociada con los híbridos de sonda/secuencia potencial con la señal de los híbridos de sonda/secuencia convencional. En el caso de que no se detecte señal o se detecte una señal disminuida de los híbridos de sonda/secuencia potencial, en comparación con la señal asociada con híbridos de sonda/secuencia convencional, está presente la delección. Por el contrario, en el caso en el que se detecte una señal aumentada de los híbridos de sonda/secuencia potencial, en comparación con la señal asociada con híbridos de sonda/secuencia convencional, está presente una inserción grande. También es posible, de la manera anterior, determinar cualitativamente el alcance de la mutación para determinar de este modo, por ejemplo, si una mutación está presente de forma heterocigota u homocigota en la secuencia potencial.

Debido a la capacidad para detectar delecciones grandes o inserciones grandes de la manera descrita anteriormente, pueden ahora detectarse ensayos para estos tipos de variantes junto con variantes más pequeñas, tales como polimorfismos de nucleótido sencillo, en una plataforma automática usando cualquiera de las técnicas de detección y marcaje convencionales bien conocidas. La selección de marcadores particulares usados para detectar los productos de amplificación dependiendo de su presencia en una sonda o cebador marcado es la elección de los expertos en la materia basándose en la plataforma de detección seleccionada.

El término "marcador" como se usa en este documento se refiere a una molécula o resto que tiene una propiedad o característica que es capaz de detección. Un marcador puede ser directamente detectable, como con, por ejemplo, radioisótopos, fluoróforos, quimioluminóforos, enzimas, partículas coloidales, micropartículas fluorescentes, pares de

transferencia de energía resonante de fluorescencia (FRET), y similares. Como alternativa, un marcador puede ser indirectamente detectable, como con, por ejemplo, miembros de unión específicos. Se entenderá que los marcadores directamente detectables pueden requerir componentes adicionales tales como, por ejemplo, sustratos, reactivos desencadenantes, luz y similares para permitir la detección del marcador. Cuando se usan marcadores indirectos para detección, estos se usan típicamente en combinación con un conjugado que generalmente es un miembro de unión específico unido a un marcador directamente detectable. Como se usa en este documento, miembro de unión específico significa un miembro de un par de unión, es decir, dos moléculas diferentes en las que una de las moléculas a través de, por ejemplo, medios químicos o físicos se unen específicamente a la otra molécula. Además de pares de unión específicos de antígeno y anticuerpo, otros pares de unión específicos incluyen, pero no se pretende que se limiten a, avidina y biotina; haptenos y anticuerpos específicos para haptenos; secuencias de nucleótidos complementarias; y similares.

Las plataformas de detección que pueden emplearse para detectar los productos de amplificación incluyen cualquiera de las técnicas homogéneas o heterogéneas bien conocidas en la materia. Los ejemplos de plataformas de detección homogéneas incluyen el uso de marcadores de FRET unidos con sondas que emiten una señal en presencia de la secuencia diana. Los ensayos denominados TaqMan descritos en la Patente de Estados Unidos Número 5.210.015 y ensayos de Balizas Moleculares descritos en la Patente de Estados Unidos Número 5.925.517 son ejemplos de técnicas que pueden emplearse para detectar de forma homogénea secuencias de ácidos nucleicos.

Los formatos heterogéneos típicamente emplean un reactivo de captura para separar secuencias amplificadas de otros materiales empleados en la reacción. Los reactivos de captura típicamente son un material de soporte sólido que está recubierto con uno o más miembros de unión específicos del mismo o diferentes miembros de unión. Un "material de soporte sólido", como se usa en este documento, se refiere a cualquier material que sea insoluble, o pueda hacerse insoluble por una reacción posterior. Los materiales de soporte sólido pueden ser por lo tanto un látex, plástico, plástico derivatizado, metal magnético o no magnético, superficie o superficies de vidrio o silicio de tubos de ensayo, pocillos de microtitulación, láminas, perlas, micropartículas, microplacas y otras configuraciones conocidas por los expertos en la materia. Un reactivo de captura ejemplar incluye una matriz que generalmente comprende oligonucleótidos o polinucleótidos inmovilizados en un material de soporte sólido de una manera definida en el espacio.

Por lo tanto, un formato de ensayo heterogéneo puede emplearse para detectar secuencias diana que contienen delecciones o inserciones grandes, o un panel de secuencias diana que tienen tanto variantes de nucleótido sencillo como delecciones o amplificaciones grandes. Por ejemplo, puede realizarse un panel para detectar \*3, \*4, \*5 y \*6, o combinaciones de los mismos, de acuerdo con los métodos enseñados en la Patente de Estados Unidos US-A1-20020102549 presentada el 18 de abril de 1997. En particular, pueden seleccionarse cebadores para amplificar cada una de las secuencias diana potenciales, de acuerdo con los principios anteriores, y combinarse con un reactivo de amplificación y muestra de ensayo en recipientes de reacción separados o el mismo recipiente de reacción para formar mezclas de reacción o una mezcla de reacción. En casos en los que los reactivos se sitúan en un recipiente de reacción sencillo, pueden ser necesarios ajustes en las concentraciones de los reactivos de amplificación. Los ajustes para tales mezclas de reacción "múltiples" se conocen bien y se han descrito en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Número 5.582.989. La mezcla o mezclas de reacción pueden situarse en condiciones de amplificación para formar productos de amplificación. Las sondas, que pueden formar parte de la mezcla de reacción inicial o añadirse en una etapa separada, pueden hibridarse con los productos de amplificación si los hubiera para detectar la presencia de las diversas secuencias diana en las muestras de ensayo. Para facilitar la detección de una manera de tipo heterogénea, las sondas pueden marcarse con un primer miembro de unión que es específico para su compañero de unión que se une a un material de soporte sólido tal como una micropartícula. De forma similar, los cebadores pueden marcarse con un segundo miembro de unión específico para un conjugado como se ha definido anteriormente. Los productos de amplificación unidos a las sondas pueden después separarse de la mezcla de reacción restante poniendo en contacto la mezcla de reacción con el soporte sólido anterior y retirando después el soporte sólido de la mezcla de reacción. Puede después ponerse en contacto cualquier híbrido de producto de amplificación/sonda unido al soporte sólido con un conjugado para detectar la presencia de los híbridos en el soporte sólido.

Están disponibles muchos esquemas de detección heterogéneos para diferenciar las diversas señales producidas por los diversos productos de amplificación en el soporte sólido. Por ejemplo, pueden emplearse diferentes miembros de unión específicos para unir diferentes productos de amplificación para separar soportes sólidos. Como alternativa, todos los productos de amplificación pueden unirse en un soporte sólido sencillo pero pueden emplearse diferentes miembros de unión específicos para unir selectivamente distintos conjugados con los productos de amplificación de modo que se asocie una señal diferente con cada uno de los diversos productos de amplificación. Se entenderá que en el caso de que se realice un ensayo para un panel de secuencias diana, pueden emplearse las técnicas anteriores pero sería innecesario.

Las secuencias potenciales que contienen delecciones, inserciones o amplificaciones grandes o un panel de secuencias diana que tienen tanto variantes de nucleótido sencillo como delecciones, inserciones o amplificaciones grandes pueden detectarse usando también técnicas homogéneas. Por ejemplo, puede realizarse un panel para

detectar \*3, \*4, \*5 y \*6, o combinaciones de los mismos, de acuerdo con los métodos enseñados en la Patente de Estados Unidos Número 5.925.517. En particular, pueden formarse mezclas de reacción separadas que contienen una muestra de ensayo, cebadores, reactivos de amplificación y una sonda de Baliza Molecular para cada secuencia diana potencial en recipientes de reacción separados. Como alternativa, todos los reactivos necesarios para amplificar y detectar las diversas secuencias diana pueden formarse en un recipiente de reacción sencillo como en el formato de tipo heterogéneo anterior. Las mezclas de reacción (mezcla) pueden situarse en condiciones de amplificación para formar diversos productos de amplificación. La sonda de baliza molecular puede después hibridarse con los diversos productos de amplificación, si los hubiera. Los híbridos formados de este modo pueden después detectarse directamente para indicar la presencia de una secuencia diana en la muestra de ensayo. En casos en los que se forme una mezcla de reacción sencilla para fines de detectar múltiples secuencias diana, pueden emplearse diferentes grupos de generación de señal en las diversas sondas de Baliza Molecular para distinguir entre los diferentes productos de amplificación.

Si se forman productos de amplificación o no de acuerdo con los métodos en este documento se detecta de una manera heterogénea u homogénea, provechosamente, los productos pueden detectarse en un aparato sencillo. Por ejemplo, el aparato sencillo puede ser cualquier medio para detectar marcadores asociados con los productos de amplificación tales como, por ejemplo, un lector de placas, espectrofotómetro e instrumentos similares habitualmente para detectar marcadores.

Como se ha observado anteriormente, las secuencias variantes que pueden detectarse de acuerdo con los métodos proporcionados en este documento pueden asociarse con una capacidad disminuida para metabolizar fármacos, una incapacidad para metabolizar fármacos, o un aumento de la capacidad para metabolizar fármacos. Por lo tanto, cuando se detectan tales variantes asociadas con estas diferentes capacidades, esta información puede emplearse para tomar decisiones de fármacos o dosificación de fármacos. Por ejemplo, en casos en los que se detecta una secuencia variante asociada con una incapacidad para metabolizar un fármaco o clase de fármacos particular, puede prescribirse al paciente que proporciona la muestra de ensayo un fármaco que no esté afectado por la variante particular detectada. En otros casos en los que se detecta una variante en una muestra de ensayo de un paciente que se asocia con un aumento o reducción del metabolismo para un fármaco o clase de fármacos particular, pueden proporcionarse al paciente instrucciones de dosificación que no sean contradictorias con el fenotipo detectado. En todos los casos cuando una muestra de ensayo es de un paciente la información obtenida usando los métodos proporcionados en este documento puede emplearse para prestar regímenes de tratamiento farmacéutico precisos.

Los ejemplos a continuación ilustran realizaciones preferidas de la presente invención y no son limitantes de las reivindicaciones y memoria descriptiva de ningún modo.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos demuestran detección de polimorfismos en el gen *CYP2D6* usando las sondas y cebadores de oligómeros de ADN proporcionados en este documento. Estos cebadores y sondas de ADN se identifican como SECUENCIA ID N°:2, SECUENCIA ID N°: 3, SECUENCIA ID N°: 4, SECUENCIA ID N°: 5, SECUENCIA ID N°: 6, SECUENCIA ID N°: 7, SECUENCIA ID N°: 8, SECUENCIA ID N°: 9, SECUENCIA ID N°: 10, SECUENCIA ID N°: 11, SECUENCIA ID N°: 12, SECUENCIA ID N°: 13, SECUENCIA ID N°: 14, SECUENCIA ID N°: 15, SECUENCIA ID N°: 16, SECUENCIA ID N°: 17 y SECUENCIA ID N°: 18. Una parte de una secuencia representativa del gen *CYP2D6* se designa en este documento SECUENCIA ID N°:1.

En los siguientes ejemplos, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 5 se usan como cebadores de amplificación específicos para partes del gen *CYP2D6* tanto de tipo silvestre como variante. Los cebadores de amplificación SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3 se usan con sondas de hibridación interna SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 18. Los cebadores de amplificación de SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 5 se usan con sondas de hibridación interna SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14 y SEC ID N°: 15. SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 12 y SEC ID N°: 14 son sondas de hibridación interna para detectar alelos de tipo silvestre en el producto de amplificación del gen *CYP2D6*. SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 18 son sondas de hibridación interna para detectar producto de amplificación del gen *CYP2D6* variante.

### Ejemplo 1

#### Preparación de Sondas y Cebadores del Gen *CYP2D6*

A. Cebadores de *CYP2D6*. Se diseñaron cebadores para unirse y permitir amplificación de la secuencia diana que contiene los alelos tanto de tipo silvestre como variantes en el gen *CYP2D6* por PCR de hibridación de oligonucleótidos. Estos cebadores fueron SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 5. SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3 son específicos para una región en el gen *CYP2D6* que contiene tres polimorfismos. SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 5 son específicos para una región diferente en el gen *CYP2D6* que contiene otros polimorfismos. Las



secuencias de cebadores se sintetizaron usando metodología de síntesis de oligonucleótidos convencional. Adicionalmente, SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 5 se haptenizaron con carbazol en sus extremos 5' usando química de acoplamiento de cianoetil fosforamidita convencional como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.424.414.

5  
 B. Sondas de CYP2D6 de Tipo Silvestre y Variantes. Se diseñaron sondas para hibridar con las secuencias diana amplificadas de alelos de tipo silvestre o variantes en el gen *CYP2D6* por hibridación de oligonucleótidos. Estas sondas fueron SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 8 y SEC ID N°: 10 para los alelos de tipo silvestre y SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 18 para los alelos variantes en la región  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65  
 amplificada por los cebadores SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3. Las sondas fueron SEC ID N°: 12 y SEC ID N°: 14 para los alelos de tipo silvestre y SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 15 para los alelos variantes en la región amplificada por los cebadores SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 5. Se sintetizaron secuencias de sonda usando metodología de síntesis de oligonucleótidos convencional. SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 8 y SEC ID N°: 10 se haptenizaron con 2 dansilos en el extremo 5' y se bloquearon con fosfato en el extremo 3'. SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 18 se haptenizaron con 2 adamantanos en el extremo 5' y se bloquearon con fosfato en el extremo 3'. SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 14 se haptenizaron con 2 dansilos en el extremo 5' o un dansilo sencillo, seguido de 5 timidinas, otro dansilo y 5 timidinas en el extremo 5' y se bloquearon con fosfato en el extremo 3'. SEC ID N°: 12 y SEC ID N°: 15 se haptenizaron con 2 adamantanos en el extremo 5' o un adamantano sencillo, seguido de 5 timidinas, otro adamantano y 5 timidinas más en el extremo 5', y se bloquearon con fosfato en el extremo 3'. Se indica que las sondas sintetizadas con las politimidinas en el extremo 5' tienen un enlazador poli-T. Todas las síntesis usaron química de acoplamiento de cianoetil fosforamidita convencional como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.464.746

## Ejemplo 2

### Detección de Polimorfismos de CYP2D6

Se aisló ADN de sangre completa usando el Kit de Aislamiento de ADN Puregene (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN) según las directrices del fabricante. Las muestras se genotiparon por PCR específica de alelos como se describe en Daly AK, Steen VM, Fairbrother KS y Idle JR in *Methods in Enzymology*, Vol. 272, Capítulo 22 (1996), y en Wang S-L, Huang J-D, Lai M-D, Lui B-H y Lai M-L en *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 53, pp. 410-418 (1993). Esto permitió que se identificaran las muestras como de tipo silvestre homocigotas, variantes homocigotas o heterocigotas en los cinco polimorfismos de *CYP2D6* que se ensayan en este documento.

El ADN de las muestras anteriores se amplificó por PCR y se detectó usando cebadores SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3 con los pares de sondas correspondientes (de tipo silvestre o variante) para tres alelos diferentes y usando cebadores SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 5 con los pares de sondas correspondientes (de tipo silvestre o variante) para dos alelos diferentes. Cada mezcla de reacción contenía un par de cebadores y un par de sondas (tipo silvestre o variante) para la detección de polimorfismos de *CYP2D6*. Los pares de sonda usados con los cebadores SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3 fueron las sondas SEC ID N°: 6 (tipo silvestre) y SEC ID N°: 7 (variante) para la detección de polimorfismo \*2, las sondas SEC ID N°: 8 (tipo silvestre) y SEC ID N°: 9 (variante) para la detección de polimorfismo \*3, o las sondas SEC ID N°: 10 (tipo silvestre) y SEC ID N°: 11 (variante) para la detección de polimorfismo \*9. Los pares de sondas usados con los cebadores SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 5 fueron las sondas SEC ID N°: 12 (tipo silvestre) y SEC ID N°: 13 (variante) para la detección de polimorfismo \*4, o las sondas SEC ID N°: 14 (tipo silvestre) y SEC ID N°: 15 (variante) para la detección de polimorfismo \*6. Los cebadores y sondas se sintetizaron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1 y las sondas SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14 y SEC ID N°: 15 usadas fueron las marcadas con enlazadores de politimidina.

Se realizó PCR en tampón de PCR 10X (GeneAmp<sup>®</sup>, Perkin Elmer, Applied Biosystems División, Foster City, CA) a una concentración final de 1X, que contenía Tris-HCl 10 mM, pH 8,3 y cloruro potásico 50 mM. Se usó ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* recombinante (Amplitaq<sup>®</sup>, Perkin Elmer, Applied Biosystems División, Foster City, CA) a una concentración de 5 unidades/reacción, con dNTP (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) presentes a una concentración final de 200 µM cada uno. Se usaron cebadores SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3 a una concentración de 10 nM cada uno, y se usaron cebadores SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 5 a una concentración de 95 nM cada uno. Las concentraciones finales para las diversas sondas fueron como sigue: SEC ID N°: 6 a 80 nM, SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 11 a 42,5 nM, SEC ID N°: 10 a 100 nM, SEC ID N°: 8 y SEC ID N°: 9 a 150 nM, y SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14 y SEC ID N°: 15 a 200 nM. También estaba presente una concentración final de cloruro magnésico 1,5 mM (GeneAmp<sup>®</sup>, Perkin Elmer, Applied Biosystems División, Foster City, CA) en la mezcla de reacción. El volumen de reacción total fue de 0,2 ml, con un volumen de muestra de 20 µl. El control negativo consistía en la muestra de ADN purificado de alelo opuesto, es decir el ADN variante purificado fue un control negativo cuando se ensayó usando la sonda de tipo silvestre y viceversa.

Las mezclas de reacción se amplificaron en un Termociclador LCx<sup>®</sup>. Las mezclas de reacción se incubaron en primer lugar a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificación por PCR a 95 °C durante 60 segundos, 55 °C durante 60 segundos, después 72 °C durante 60 segundos. Después de que las mezclas de reacción se termociclaran, las mezclas se mantuvieron a 97 °C durante 5 minutos y se consiguió hibridación de oligo sonda

reduciendo la temperatura a 12 °C en un periodo de 2 minutos. Las muestras se mantuvieron a 12 °C durante un mínimo de 5 minutos, y a continuación hasta que los productos de reacción se analizaron y detectaron.

5 Los productos de reacción se detectaron en el sistema Abbott LCx<sup>®</sup> (disponible de Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Se usó una suspensión de micropartículas revestidas con anticarbazol, un conjugado de fosfatasa alcalina/anticuerpo antiadamantano y un conjugado de β-galactosidasa/anticuerpo antidansilo (disponible de Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) junto con el LCx<sup>®</sup> para capturar y detectar los productos de reacción. Los sustratos de enzima usados fueron 4-metil-umbeliferil fosfato (MUP) y ácido 7-β-D-galactopiranosiloxi coumarin-4-acético - (2-hidroxietyl) amida (AUG) con la tasa de conversión de sustrato a producto medida e indicada como  
10 cuentas/segundo/segundo (c/s/s).

15 Los datos de estos experimentos se presentan en la TABLA 1 y muestran que las sondas de tipo silvestre detectaron alelos de CYP2D6 tanto de tipo silvestre homocigotos como heterocigotos pero no detectaron alelos de CYP2D6 variantes homocigotos como positivos. Las sondas variantes detectaron alelos de CYP2D6 tanto variantes homocigotos como heterocigotos pero no detectaron alelos de CYP2D6 de tipo silvestre homocigotos como positivos. Como se esperaba, ambas sondas detectaron las muestras heterocigotas puesto que contienen un alelo de tipo silvestre y uno variante. Por lo tanto, todas las sondas mostraron excelente especificidad.

TABLA 1

Genotipo de CYP2D6	Tasa de LCx <sup>®</sup> de sonda de tipo silvestre	Tasa de LCx <sup>®</sup> de sonda variante
*2 - Tipo silvestre homocigoto	1223,0	145,6
*2 - Heterocigoto	819,3	449,6
*2 - Variante homocigoto	107,1	811,0
*3 - Tipo silvestre homocigoto	671,6	83,0
*3 - Heterocigoto	521,7	229,6
*9 - Tipo silvestre homocigoto	1539,1	81,0
*9 - Variante homocigoto	99,9	811,7
*4 - Tipo silvestre homocigoto	390,2	75,5
*4 - Heterocigoto	236,4	412,0
*4 - Variante homocigoto	57,5	549,6
*6 - Tipo silvestre homocigoto	1151,7	81,8
*6 - Heterocigoto	962,8	208,7

20

Ejemplo 3

Sondas con y sin Enlazadores de Politimidina

25 Se ensayaron muestras de ADN purificadas seleccionadas, preparadas con en el Ejemplo 2, con respecto a polimorfismos \*4 y \*6 usando sondas de tipo silvestre y variantes con y sin enlazadores de politimidina (poli-T). Estas sondas fueron SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14 y SEC ID N°: 15 preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 1, con o sin poli-T en los extremos 5' intercaladas con los grupos hapteno. Las muestras se amplificaron por  
30 PCR y se detectaron usando estas sondas con cebadores SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 5 como se ha descrito en el Ejemplo 2. Todas las muestras se ensayaron por duplicado.

La media de los resultados de este experimento se proporciona en la Tabla 2. Estos resultados muestran que las sondas con el enlazador poli-T tenían una señal más alta que las sondas sin el enlazador.

35

TABLA 2

Genotipo de CYP2D6	Sonda con enlazador Poli-T		Sonda sin enlazador Poli-T	
	Tasa de LCx <sup>®</sup> de tipo silvestre	Tasa de LCx <sup>®</sup> de variante	Tasa de LCx <sup>®</sup> de tipo silvestre	Tasa de LCx <sup>®</sup> de variante
*4-Tipo silvestre homocigoto	433,9	145,1	313,0	186,1

*4 - Variante homocigoto	90,5	1291,9	40,4	838,7
*6-Tipo silvestre homocigoto	1461,6	100,0	937,5	50,8
*6 - Heterocigoto	1130,4	272,5	603,7	119,0

#### Ejemplo 4

##### Efecto de la Longitud de la Sonda en la Detección de \*2

- 5 El efecto de la longitud de sonda en la detección de alelos se ensayó usando la sonda marcada con adamantano para detección de la variante \*2. Las longitudes de sonda ensayadas fueron una 11mer (SEC ID N°: 16), una 13mer (SEC ID N°: 7), una 15mer (SEC ID N°: 17) y una 17mer (SEC ID N°: 18).
- 10 Se purificó ADN de las muestras genotipadas como tipo silvestre o variante para \*2 como en el Ejemplo 2. Se amplificaron por PCR replicaciones sencillas de estas muestras y se detectaron como en el Ejemplo 2 usando cebadores SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3 con una de las cuatro longitudes de sondas mutantes marcadas en cada mezcla de reacción.
- 15 Los resultados, mostrados a continuación en la Tabla 3, indican que la longitud de sonda óptima es una 13mer, produciéndose el emparejamiento erróneo entre el alelo variante y de tipo silvestre en la posición 7. Una longitud de sonda más corta (la 11mer) no fue capaz de hibridar bien con la diana variante, dando como resultado una señal escasamente por encima del fondo para el ADN con emparejamiento erróneo (tipo silvestre). Aunque longitudes de sonda más largas (la 15mer y 17mer) hibridaron con la diana coincidente, también mostraron fondos más altos con la diana con emparejamiento erróneo. Por lo tanto, cuanto mayor sea la sonda (por encima de la longitud óptima de 13mer), peor es la diferenciación para una diana con un emparejamiento erróneo de base sencilla.
- 20

TABLA 3

Muestra	Tasa de LCx <sup>®</sup> de Longitud de Sonda Variante (c/s/s)			
	11mer	13mer	15mer	17mer
ADN Variante (Coincidente)	111,5	647,3	914,2	481,8
ADN de tipo silvestre (Emparejamiento erróneo)	90,9	79,6	340,6	417,0

#### Ejemplo 5

##### Detección de Vehículos Heterocigotos de \*5

- 30 En este ejemplo, la mutación \*5 se detecta en muestras de sangre humana que eran heterocigotas para la mutación \*5 o son homocigotas para la secuencia no variante. Los genotipos de las muestras se determinaron usando PCR específica de alelos y PCR larga.

- 35 Las selecciones de cebadores y sondas se basaron en secuencias para *CYP2D6*, *CYP2D7P* y *CYP2D\*5* que tienen los números de acceso de GenBank respectivos M33388, M33387, y X90927. Específicamente, un cebador directo fue específico para *CYP2D6* (SEC ID N°: 19) y otro cebador directo (SEC ID N°: 20) fue específico para un pseudogén de *CYP2D6*, concretamente *CYP2D7P*. Un cebador inverso (SEC ID N°: 21) era común para las secuencias diana tanto *CYP2D6* como *CYP2D7P* en la medida en que participa en la amplificación de ambas secuencias. SEC ID N°: 22 es una Baliza Molecular marcada en su extremo 5' con fluoresceína y dabcilo en su extremo 3'. SEC ID N°: 22 (en la región que no es autocomplementaria) es perfectamente complementaria del producto de amplificación de *CYP2D6* y tiene un emparejamiento erróneo de un par de bases sencillo con el producto de amplificación de *CYP2D7P*. Otra sonda de Baliza Molecular no marcada (SEC ID N°: 23) era (en la región que no es autocomplementaria) perfectamente complementaria con el producto de amplificación de *CYP2D7P*. Se usó SEC ID N°: 23 para fines de proporcionar una sonda competitiva para el producto de amplificación de *CYP2D7P*. Los cebadores y Balizas Moleculares se sintetizaron usando química de cianoetil fosforamidita convencional como se describe en la Patente de Estados Unidos Número 5.464.746.
- 45

- 50 La reacción de amplificación y detección del producto de amplificación se procesaron en un formato de dosis unitaria y se leyó en tiempo real (es decir después de cada ciclo de amplificación) usando un termociclador Perkin-Elmer 7700. Los reactivos para amplificación y detección se situaron en un recipiente de reacción sencillo para ciclación y detección. En particular cada reacción de 50 µl contenía tampón de PCR Gibco BRL 1x (Gibco, Inc.; Grand Island, NY), cloruro magnésico 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, 2,5 unidades de Taq polimerasa Gibco BRL Platinum, 0,1 µM de

cada cebador, 0,1 µM de cada sonda, 12,5 ng de ADN de muestra genómica y 0,15 µl de control de heptanucleótido conjugado con Texas-Red. Las muestras se obtuvieron de Interstate Blood Bank, Inc. (Chicago, IL).

5 Se situaron los recipientes de reacción individuales en el termociclador y se realizaron 45 ciclos como sigue: 60 segundos a 94 °C, 20 segundos a 59 °C, 40 segundos a 61 °C y 40 segundos a 72 °C. Se tomó una lectura fluorescente en la etapa de 61 °C de cada ciclo.

10 Las designaciones de muestra junto con el número de ciclo en el que era detectable una lectura fluorescente sobre un valor umbral dado (Ct) se muestran en la Tabla 4. Las muestras designadas A1, B1, C1, D1 y E1 fueron heterocigotas para \*5. Ninguna de las otras muestras contenía \*5. Como se ve a partir de los datos, las señales de las muestras que contenían \*5 se detectaron uniformemente en ciclos posteriores a las muestras que no contenían \*5 en gran medida debido a que las muestras sin \*5 contenían una mayor proporción de secuencia diana para amplificación.

15

TABLA 4

Designación de la Muestra	Ct
A1	34
A2	32
B1	36
B2	30
C1	36
C2	31
D1	34
D2	30
E1	33
E2	31
F1	30
F2	29
G1	29
G2	30
H1	30

LISTA DE SECUENCIAS

20

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: D. Katz  
M. Gentile-Davey  
M. Cornwell  
J. Huff  
25 J. Yu

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS BASADA EN AMPLIFICACIÓN

30

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 18

(iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA

35

(A) DESTINATARIO: Abbott Laboratories  
(B) CALLE: 100 Abbott Park Road  
(C) CIUDAD: Abbott Park  
(D) ESTADO: Illinois  
(E) PAÍS: Estados Unidos  
(F) CP: 60064-3500

(v) FORMA LEÍBLE POR ORDENADOR:

- 5
- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
  - (B) ORDENADOR: Macintosh
  - (C) SISTEMA OPERATIVO: Sistema 7.0.1
  - (D) SOFTWARE: Microsoft Word 5.1a

(vi) DATOS DE SOLICITUD ACTUAL:

- 10
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
  - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
  - (C) CLASIFICACIÓN:

(vii) INFORMACIÓN DE MANDATARIO/AGENTE:

- 15
- (A) NOMBRE: Paul D. Yasger
  - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 37.477
  - (C) NÚMERO DE EXPEDIENTE:
- 20

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:

- (A) TELÉFONO: 847/937-2341
  - (B) TELEFAX: 847/938-2623
  - (C) TÉLEX:
- 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 30
- (A) LONGITUD: 1450 bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) CADENA: doble
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 35

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico (tipo silvestre)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 1:

TAGGGTTGGA	GTGGGTGGTG	GATGGTGGGG	CTAATGCCTT	CATGGCCACG	50
CGCACGTGCC	CGTCCCACCC	CCAGGGGTGT	TCCTGGCGCG	CTATGGGCC	100
GCGTGGCGCG	AGCAGAGGCG	CTTCTCCGTG	TCCACCTTGC	GCAACTTGGG	150
CCTGGGCAAG	AAGTCGCTGG	AGCAGTGGGT	GACCGAGGAG	GCCGCCTGCC	200
TTTGTGCCGC	CTTCGCCAAC	CACTCCGGTG	GGTGATGGGC	AGAAGGGCAC	250
AAAGCGGGAA	CTGGGAAGGC	GGGGGACGGG	GAAGGCGACC	CCTTACCCGC	300
ATCTCCCACC	CCCAGGACGC	CCCTTTCGCC	CCAACGGTCT	CTTGGACAAA	350
GCCGTGAGCA	ACGTGATCGC	CTCCCTCACC	TGCGGGCGCC	GCTTCGAGTA	400
CGACGACCCT	CGCTTCCTCA	GGCTGCTGGA	CCTAGCTCAG	GAGGGACTGA	450
AGGAGGAGTC	GGGCTTCTG	CGCGAGGTGC	GGAGCGAGAG	ACCGAGGAGT	500
CTCTGCAGGG	CGAGCTCCCG	AGAGGTGCCG	GGGCTGGACT	GGGGCCTCGG	550
AAGAGCAGGA	TTTGCATAGA	TGGGTTTGGG	AAAGGACATT	CCAGGAGACC	600
CCACTGTAAG	AAGGGCCTGG	AGGAGGAGGG	GACATCTCAG	ACATGGTCTGT	650
GGGAGAGGTG	TGCCCGGGTC	AGGGGGCACC	AGGAGAGGCC	AAGGACTCTG	700
TACCTCCTAT	CCACGTCAGA	GATTTTCGATT	TTAGGTTTCT	CCTCTGGGCA	750
AGGAGAGAGG	GTGGAGGCTG	GCACTTGGGG	AGGGACTTGG	TGAGGTCAGT	800
GGTAAGGACA	GGCAGGCCCT	GGGTCTACCT	GGAGATGGCT	GGGGCCTGAG	850
ACTTGTCCAG	GTGAACGCAG	AGCACAGGAG	GGATTGAGAC	CCCGTTCTGT	900
CTGGTGTAGG	TGTGAATGC	TGTCCCCGTC	CTCCTGCATA	TCCCAGCGCT	950
GGCTGGCAAG	GTCCTACGCT	TCCAAAAGGC	TTTCTTGACC	CAGCTGGATG	1000
AGCTGCTAAC	TGAGCACAGG	ATGACCTGGG	ACCCAGCCCA	GCCCCCCCGA	1050
GACCTGACTG	AGGCCTTCCT	GGCAGAGATG	GAGAAGGTGA	GAGTGGCTGC	1100
CACGGTGGGG	GGCAAGGGTG	GTGGGTTGAG	CGTCCCAGGA	GGAATGAGGG	1150
GAGGTTGGGC	AAAAGGTTGG	ACCAGTGCAT	CACCCGGCGA	GCCGCATCTG	1200
GGCTGACAGG	TGCAGAATTG	GAGGTCATTT	GGGGGCTACC	CCGTTCTGTC	1250
CCGAGTATGC	TCTCGGCCCT	GCTCAGGCCA	AGGGGAACCC	TGAGAGCAGC	1300
TTCAATGATG	AGAACCTGCG	CATAGTGGTG	GCTGACCTGT	TCTCTGCCGG	1350
GATGGTGACC	ACCTCGACCA	CGCTGGCCTG	GGGCCTCCTG	CTCATGATCC	1400
TACATCCGGA	TGTGCAGCGT	GAGCCCATCT	GGGAAACAGT	GCAGGGGCCG	1450

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 2:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 2:  
TGAGACTTGT CCAGGTGAAC 20

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 3:  
CCTGCACTGT TTCCGAGA 18

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18
- (B) TIPO: ácido nucleico

- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 4:  
GTGGATGGTG GGGCTAAT 18

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 5:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- 15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 5:  
20 CTCCTCGGTCTCTCGCTC 18

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 13 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 6:  
AACCTGCGCA TAG 13

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 7:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 13 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 40 (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 7:  
45 AACCTGTGCA TAG 13

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 13 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- 55 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 8:  
GAGCACAGGA TGA 13

60 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 65 (A) LONGITUD: 13 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 9:  
 GAGCACGGAT GAC 13

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 14 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 10:  
 GATGGAGAAG GTGA 14

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 14 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 11:  
 GATGGAGGTG AGAG 14

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 12:

35

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

40

(A) LONGITUD: 13 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 12:  
 CCCCAGGACG CCC 13

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

50

(A) LONGITUD: 13 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

55

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 13:  
 CCCCAGGACG CCC 13

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 14:

60

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

65

(A) LONGITUD: 14 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal



(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 14:  
GAGCAGTGGG TGAC 14

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 14 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 15:  
GAGCAGGGGT GACC 14

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 16:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 11 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 16:  
ACCTGTGCAT A 11

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 15 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°:17:  
GAACCTGTGC ATAGT 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 18:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 17 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 18:  
AGAACCTGTG CATAGT 17

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 60 (A) LONGITUD: 21 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 19:

CCCCAAAACG GAAGACAAAT C 21

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 20:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 15 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 20:  
TCCCGCACAC GCCTC 15

15

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

20

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 21:  
TGCGAACTC GTCCTGGTC 20

25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 22:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 35 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 22:  
CCGCACACAG GACTGGCTAC CTCTCTGGGC TGCGG 35

40

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N°: 23:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

50

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 23:  
CGACCACAGG ACTGGCCACC TCTCTGGGTC G 31

55

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana sospechosa de tener deleciones o inserciones de una base sencilla o múltiple en una muestra de ensayo que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto la muestra de ensayo con reactivos de amplificación que comprenden una polimerasa, un par de cebadores y una sonda para formar una mezcla de reacción;
- (b) realizar un ciclo que comprende las etapas de:
- 10 (i) mantener la mezcla de reacción durante un tiempo y a una temperatura por encima de 90 °C suficientes para disociar las secuencias de ácido nucleico bicatenario,
- (ii) mantener la mezcla de reacción durante un tiempo y durante una temperatura de 45 °C a 65 °C para permitir que los cebadores y sonda hibriden con el ácido nucleico y formen de este modo híbridos de cebadores e híbridos de sondas;
- 15 (iii) mantener la mezcla de reacción durante un tiempo y a una temperatura al menos 1 °C por encima de la temperatura en (ii), suficientes para disociar los híbridos de sondas, si la sonda no es completamente complementaria del ácido nucleico y
- (iv) aumentar la temperatura de la mezcla de reacción a una temperatura suficiente para activar la polimerasa,
- 20 (c) realizar de forma repetida el ciclo de la etapa (b) para formar un producto de amplificación; y
- (d) detectar el producto de amplificación como un indicio de la presencia de la secuencia de ácido nucleico en la muestra de ensayo.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el que la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico polimórfica.
3. Un método para determinar si una deleción o inserción de al menos 50 pares de bases está presente en el ADN en una muestra de ensayo que comprende las etapas de:
- 30 (a) poner en contacto la muestra de ensayo con reactivos de amplificación, comprendiendo los reactivos de amplificación cebadores de amplificación, una sonda y una polimerasa, para formar una mezcla de reacción en la que el conjunto de cebadores de amplificación hibridan con la secuencia de ácido nucleico diana y una secuencia de ácido nucleico convencional en la muestra de ensayo;
- 35 (b) someter la mezcla de reacción a condiciones de amplificación para formar un producto de amplificación de secuencia de ácido nucleico diana y un producto de amplificación de ácido nucleico convencional, comprendiendo las condiciones de amplificación las etapas de:
- 40 (i) mantener la mezcla de reacción durante un tiempo y a una temperatura por encima de 90 °C suficientes para disociar las secuencias de ADN bicatenarias,
- (ii) mantener la mezcla de reacción durante un tiempo y durante una temperatura de 45 °C a 65 °C para permitir que las sondas y los cebadores de amplificación hibriden con el ADN y formar de este modo híbridos de cebadores e híbridos de sondas;
- 45 (iii) mantener la mezcla de reacción durante un tiempo y a una temperatura al menos 1 °C por encima de la temperatura en (ii) suficientes para disociar los híbridos de sondas, si la sonda no es completamente complementaria del ADN;
- (iv) aumentar la temperatura de la mezcla de reacción a una temperatura suficiente para activar la polimerasa;
- 50 (c) detectar los híbridos de sondas de amplificación de secuencia de ácido nucleico diana;
- (d) detectar los híbridos de sondas de amplificación de ácido nucleico convencional; y
- (e) comparar los híbridos de sondas de amplificación de secuencia de ácido nucleico diana con los híbridos de sondas de amplificación de ácido nucleico convencional para determinar si está presente una deleción o inserción de al menos 50 pares de bases en el ADN en la muestra de ensayo.
- 55 4. El método de la reivindicación 3, en el que la deleción o inserción es de al menos 200 pares de bases.
5. El método de la reivindicación 3, en el que la deleción o inserción es de al menos 1000 pares de bases.
- 60 6. El método de la reivindicación 3, en el que la inserción o deleción está en el locus de CYP2D6.