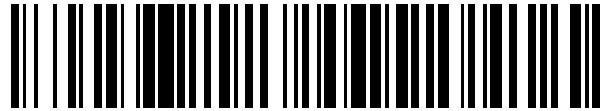


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 475 190**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2008 E 08707553 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 2121973**

54 Título: **Método para discriminar polimorfismos mononucleotídicos (SNP)**

30 Prioridad:

06.02.2007 EP 07075101

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.07.2014

73 Titular/es:

BIOMERIEUX B.V. (100.0%)

BOSEIND 15

5281 RM BOXTEL, NL

72 Inventor/es:

WEUSTEN, JOS y

DE KOCK, MAARTEN, JOHANNES, DAVID

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 475 190 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

Método para discriminar polimorfismos mononucleotídicos (SNP)

La presente invención proporciona un método para discriminar polimorfismos mononucleotídicos (SNP) que ofrece una sensibilidad y especificidad mejoradas.

5 Un polimorfismo mononucleotídico (SNP) es un cambio de una sola base o mutación puntual, pero incluye también las denominadas mutaciones "indel" (inserciones o deleciones de un nucleótido), que da como resultado la variación genética entre individuos. Los SNP, que constituyen aproximadamente un 90 % de toda la variación genética humana, aparecen cada 100 a 300 bases a lo largo del genoma humano de 3.000 millones de bases. Sin embargo, los SNP pueden aparecer mucho más frecuentemente en otros organismos como virus. Los SNP pueden aparecer
10 en regiones de codificación o de no codificación del genoma. Un SNP en la región de codificación principal puede cambiar o no la secuencia de aminoácidos de un producto proteico. Un SNP en una región de no codificación puede alterar los sitios promotores o procesadores y puede afectar a la transcripción y/o procesamiento génicos. El conocimiento de si un individuo tiene SNP particulares en una región genómica de interés puede proporcionar suficiente información para desarrollar aplicaciones de diagnóstico, preventivas y terapéuticas para una variedad de enfermedades.

15 Existen muchos métodos para genotipar SNP. Un requisito clave de un método de genotipado de SNP es que distinga inequívocamente entre las variantes alélicas presentes. Como los seres humanos son diploides, existen tres posibles genotipos para un SNP bialélico: que el paciente tenga una secuencia de tipo silvestre homocigótica, una secuencia mutada homocigótica o la secuencia heterocigótica. La mayoría de estos métodos pueden separarse en cuatro grupos basados en los mecanismos celulares: hibridación específica de alelo, ligamiento de oligonucleótidos específico de alelo, extensión de cebador y secuenciación.

Más recientemente, la aparición de la PCR instantánea ha permitido el desarrollo de métodos homogéneos para la detección de SNP tales como el análisis de la curva de fusión de sondas de FRET y el ensayo de nucleasa fluorogénica 5', también conocido como el ensayo TaqMan®. Estos métodos son atractivos porque se logra la
25 amplificación de señal y la detección alélica en un solo tubo cerrado. Usan sondas oligonucleotídicas específicas de alelo fluorogénicas (ASO) y se llevan a cabo generalmente en termocicladores instantáneos que comprenden un fluorímetro integrado. Estos métodos requieren un diseño de sonda así como una composición de tampón y ajuste de las condiciones de ciclado por PCR apropiados. Por tanto, en estas condiciones de ciclado, una de las variables más importantes para optimizar es la temperatura de asociación (T_a), que es la temperatura que permite la unión de los cebadores a hebras de ADN sencillas. Una T_a baja puede causar la síntesis de productos de PCR no específicos, mientras que el uso de una T_a alta puede reducir el rendimiento de un producto de PCR deseado. Por consiguiente, el uso de una T_a óptima minimiza, pero no evita, la hibridación cruzada del ADN diana con un cebador incluso en presencia de un desapareamiento. La diferencia en eficacia de la amplificación por PCR entre los cebadores puede no ser suficientemente grande para permitir una fácil discriminación entre el nucleótido normal y el nucleótido
35 mutado.

Para mejorar la detección de SNP por PCR instantánea, se ha optimizado la monitorización de fluorescencia.

El análisis de la curva de fusión de sondas de hibridación de FRET es una tecnología patentada por la Universidad de Utah (documento WO-A-97/46707). En su configuración más sencilla, la mezcla de reacción incluye dos sondas oligonucleotídicas que hibridan con regiones adyacentes de la secuencia diana. Los extremos 3' y 5' adyacentes de las dos sondas se marcan con tintes fluorescentes. La luz fluorescente emitida por el "donante" excita el fluoróforo del "aceptor", creando un complejo fluorogénico único. El complejo se forma solo cuando las sondas se unen a sitios adyacentes en ADN amplificado. Una vez se completa la amplificación por PCR, se genera una "curva de fusión" mediante calentamiento lento del heterodúplex de amplicón/sonda y medida de los cambios de fluorescencia resultantes de la disociación de la sonda y el amplicón. El principio del análisis de la curva de fusión es que cada
45 ADN bicatenario tiene su propia temperatura de fusión (T_m) específica, que se define como la temperatura a la que un 50 % del ADN se vuelve monocatenario. Por tanto, la curva de temperatura difiere en los alelos normal y mutante. El desapareamiento mononucleotídico entre la sonda mutada y el alelo de tipo silvestre causa que la sonda se disocie o funda a una temperatura menor que el complejo formado con el alelo mutante.

Aunque esta tecnología puede usarse para identificar SNP en un ácido nucleico, sufre no obstante algunos inconvenientes en aplicaciones prácticas. Como las diferencias en las secuencias entre los dos tipos de alelos son muy pequeñas, es muy posible que la sonda diseñada para unirse preferentemente a un tipo de amplicón muestre también unión al otro tipo de amplicón. Por ejemplo, en el caso de sustitución como SNP, el efecto sobre la cinética de fusión de los productos de PCR es demasiado pequeño para detectarse fiablemente.

Una alternativa común al enfoque de la curva de fusión es usar sondas de hidrólisis (TaqMan®). Esta técnica se da a conocer en la solicitud internacional WO-A-92/02638. El ensayo de exonucleasa 5' usa inactivación por FRET para analizar el ADN diana amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las sondas son oligonucleótidos que contienen restos fluoróforos e inactivadores localizados preferiblemente en los extremos 5' y 3'. El enfoque usa dos sondas de ASO marcadas complementarias de los alelos mutante y normal. Las dos sondas contienen

diferentes tintes fluorescentes indicadores, pero comparten un tinte inactivador común. Cuando están intactas, las sondas no tienen fluorescencia debido a la proximidad de los tintes indicador e inactivador. Durante la fase de asociación de la PCR, las dos sondas compiten por la hibridación a sus secuencias diana en 5' de los sitios cebadores. La sonda hibridada se escinde posteriormente por la actividad 5' nucleasa de la polimerasa de *Thermophilus aquaticus* (Taq) a medida que se extiende el cebador. Esto da como resultado la separación de los tintes indicadores del inactivador, causando aumentos significativos de la emisión de fluorescencia. El genotipado se determina mediante la medida de la intensidad de fluorescencia de los dos tintes indicadores después de amplificación por PCR. Puesto que las sondas TaqMan® se digieren durante la amplificación por PCR instantánea, no están disponibles sondas para el análisis de la curva de fusión postamplificación. Explotando esta tecnología de ensayo de nucleasa 5' clásico, se genera una señal de fluorescencia independiente de la temperatura durante el proceso de PCR por la degradación por exonucleasa de una sonda TaqMan hibridada.

Este método necesita un diseño cuidadoso de las sondas para permitir la discriminación de las dianas polimórficas, ya que las sondas perfectamente coincidentes se degradan preferentemente y generan aumentos de la señal de fluorescencia. Como se afirma anteriormente para el análisis de la curva de fusión, esta técnica genera problemas similares de riesgo de artefactos.

Por tanto, sigue existiendo demanda de métodos altamente sensibles que sean útiles para determinar SNP en secuencias de ácido nucleico.

La amplificación instantánea ha permitido el desarrollo de ensayos cualitativos de genotipado de SNP como se expone anteriormente, pero también de ensayos cuantitativos para la expresión génica o medida de la carga vírica. En estos campos, los datos obtenidos durante la amplificación se usan para determinar la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra original. Han sido necesarios un montón de estudios para efectuar ensayos cuantitativos y existen varios métodos. En el caso del proceso de amplificación NASBA, asociado a la detección de balizas moleculares, se ha descrito un método para la cuantificación de las cargas víricas en *Nucleic Acids Research*, 2002, vol. 30, n°6 e26. Este método permite determinar la cantidad de ARN de VIH-1 en una muestra original. La evaluación de esta cantidad está basada en la cinética de la fluorescencia generada por la combinación tanto de la velocidad de transcripción de NASBA como de la velocidad de asociación de la baliza con su amplicón/diana específico. Cuando se coamplifica el ARN de tipo silvestre (WT) en presencia de una cantidad fija de ARN calibrador (Q), se determina una variable de cuantificación por el cociente de

$$k_{1,WT}V_{WT}/k_{1,Q}V_Q$$

siendo $k_{1,ARN}$ (que representa $k_{1,WT}$ y $k_{1,Q}$) la constante de la velocidad de reacción de unión de la baliza molecular y V_{ARN} (que representa V_{WT} y V_Q) la velocidad de transcripción. Un montón de estudios con ensayos de VIH-1 han mostrado que esta variable de cuantificación es de hecho una estimación robusta de la concentración de ARN WT a concentraciones de ARN calibrador fijas.

Berard C. *et al.* (2004) describen un ensayo NASBA instantáneo con sondas de baliza molecular en el que la relación de sonda abierta/cerrada de los datos de señal fluorescente brutos se usa como variable discriminadora para discriminar entre SNP heterocigóticos u homocigóticos (*Biotechniques*, vol. 37, n° 4, p. 680-685).

Al contrario que todas las expectativas, los inventores de la presente invención han encontrado que la variable de cuantificación citada anteriormente $k_{1,WT}V_{WT}/k_{1,Q}V_Q$, como se usa para ensayos basados en NASBA cuantitativos, puede usarse como variable discriminadora para ensayos de genotipado de SNP, con mucho mejores resultados que la clasificación basada en las señales de fluorescencia solas.

Por tanto, la presente invención es un método para genotipar en ensayos de tipado aplicados a una muestra biológica, conteniendo la muestra un ácido nucleico diana de interés, y siendo susceptible el ácido nucleico diana de contener un polimorfismo mononucleotídico (SNP), que comprende las etapas de:

- efectuar una amplificación instantánea de la diana, generando múltiples copias de amplicones, en presencia de al menos dos sondas marcadas diferentes, permitiendo cada sonda la detección instantánea de la posición de SNP tanto del tipo silvestre como de al menos una posible mutación,
- evaluar el valor o valores de la variable discriminadora basándose en las señales de cada combinación de dos sondas de detección, y
- discriminar entre los genotipos.

En caso de un ensayo bialélico, la discriminación entre genotipos tiene lugar para identificar el mutante heterocigótico del tipo silvestre homocigótico o mutante homocigótico.

El poder discriminador del valor de la variable discriminadora está basado en las constantes de la velocidad de reacción de asociación relativa (k_1), puesto que las relaciones de velocidad de transcripción se cancelan como se explica a continuación.

En los ensayos de tipado, la teoría tras los valores de k_1 es más compleja que para los ensayos cuantitativos con calibradores bien diseñados debido a la reactividad cruzada de las sondas con diferentes tipos de amplicones. Por tanto, para ensayos de tipado bialélico, tienen que distinguirse cuatro constantes de velocidad de reacción de unión:

- 5 • $k_{WT \rightarrow WT}$: que refleja la constante de velocidad de reacción de una sonda de tipo silvestre que se une a un amplicón de tipo silvestre,
- $k_{WT \rightarrow m}$: que refleja la constante de velocidad de reacción de una sonda de tipo silvestre que se une a un amplicón mutado,
- $k_{m \rightarrow WT}$: que refleja la constante de velocidad de reacción de una sonda mutada que se une a un amplicón de tipo silvestre,
- 10 • $k_{m \rightarrow m}$: que refleja la constante de velocidad de reacción de una sonda mutada que se une a un amplicón mutado.

Debido a la especificidad de las sondas, el valor de $k_{m \rightarrow WT}$ es considerablemente menor que el valor de $k_{WT \rightarrow WT}$ y esta afirmación se aplica de forma similar también a $k_{WT \rightarrow m}$ respecto a $k_{m \rightarrow m}$.

- 15 Aunque los ensayos de tipado son por definición de naturaleza no cuantitativa, la variable de cuantificación que puede derivarse de las dos curvas de fluorescencia puede usarse como variable discriminadora para clasificación. Para explicar esto, se considera un ensayo de tipado bialélico. En el caso de una muestra homocigótica, existe solo un tipo de ARN de amplicón, y ambas balizas se unen a él. Por tanto, la velocidad de transcripción hace referencia solo a un tipo de amplicón (amplicón de tipo silvestre o mutado).

- 20 Si se considera la amplificación de la diana homocigótica de tipo silvestre, se usa la señal generada por la sonda de tipo silvestre para evaluar el valor de $k_{WT \rightarrow WT} V_{WT}$, siendo V_{WT} la velocidad de transcripción del amplicón de tipo silvestre. Como el amplicón es el único producido, se usa la señal generada por la sonda para evaluar el valor de $k_{m \rightarrow WT} V_{WT}$. Por lo tanto, el cociente usado en los ensayos cuantitativos $k_{1,WT} V_{WT} / k_{1,Q} V_Q$ se reduce a $k_{WT \rightarrow WT} V_{WT} / k_{m \rightarrow WT} V_{WT}$ que a su vez se reduce a $k_{WT \rightarrow WT} / k_{m \rightarrow WT}$, puesto que la velocidad de transcripción se cancela. Por consiguiente, según una realización del método, se realiza la evaluación del valor de la variable discriminadora para el tipo silvestre homocigótico mediante la evaluación de la relación $k_{WT \rightarrow WT} / k_{m \rightarrow WT}$ o su recíproco.

- 25 De forma similar, para el genotipo mutado homocigótico, el cociente se reduce a $k_{WT \rightarrow m} V_m / k_{m \rightarrow m} V_m$ y posteriormente a $k_{WT \rightarrow m} / k_{m \rightarrow m}$. Resultará evidente que la primera relación ($k_{WT \rightarrow WT} / k_{m \rightarrow WT}$) será numéricamente considerablemente mayor que la segunda ($k_{WT \rightarrow m} / k_{m \rightarrow m}$). Posteriormente, según una realización del método, se realiza la evaluación del valor de la variable discriminadora para el tipo mutante homocigótico mediante la evaluación de la relación de $k_{WT \rightarrow m} / k_{m \rightarrow m}$ o su recíproco.

- 30 En el caso de genotipo heterocigótico, existen dos dianas diferentes. Cuando los materiales de partida de la amplificación son ADN, resultará evidente que las concentraciones de amplicones en la muestra después de la amplificación son idénticas, puesto que ambos alelos están presentes en la misma cantidad. También, debido a la diferencia muy pequeña en la secuencia diana, las velocidades de transcripción de los amplicones se considerarán idénticas. El cociente se reduce ahora a una combinación de $k_{WT \rightarrow WT}$ y $k_{WT \rightarrow m}$ en el numerador, que refleja la unión de la sonda de tipo silvestre, y una combinación de $k_{m \rightarrow m}$ y $k_{m \rightarrow WT}$ en el denominador, que refleja la unión de la sonda mutada. Debido a las concentraciones iguales de los dos genes, esta combinación es una adición y el cociente es por lo tanto $(k_{WT \rightarrow WT} + k_{WT \rightarrow m}) / (k_{m \rightarrow m} + k_{m \rightarrow WT})$. Por consiguiente, según una realización del método, la evaluación del valor de la variable discriminadora para el tipo heterocigótico se realiza mediante la evaluación de la relación $(k_{WT \rightarrow WT} + k_{WT \rightarrow m}) / (k_{m \rightarrow m} + k_{m \rightarrow WT})$ o su recíproco.

- 40 Un trabajador experto apreciará que es posible, a partir de las enseñanzas de la presente invención, usar relaciones para evaluar la presencia de SNP que pueden desviarse ligeramente de la relación según la invención mencionada anteriormente, pero funcionar no obstante. Por ejemplo, en lugar de una adición, son también concebibles una operación de sustracción, multiplicación o división. Cualquier otra solución que haga uso de estas relaciones caerá dentro del alcance de protección de dicha invención.

- 45 Puesto que las relaciones de velocidad de transcripción se cancelan y solo permanecen las velocidades de unión de sonda, el valor de la variable discriminadora observado es independiente de la cantidad exacta de diana, cebadores y enzimas, e independiente de la actividad de las enzimas. Por tanto, el valor de la variable discriminadora puede ser útil en ensayos de genotipado que impliquen otros métodos de amplificación que NASBA, como por ejemplo PCR.

- 50 Según una realización del método, se realiza la evaluación del valor de la variable discriminadora para cada combinación de dos sondas de detección mediante la evaluación de las constantes de velocidad de reacción de asociación relativa (k_1) de reacciones en que las dos sondas de detección se unen a los amplicones.

Según otra realización del método, se realiza la evaluación del valor de la variable discriminadora para cada combinación de dos sondas de detección mediante la evaluación de las constantes de velocidad de reacción de disociación relativa (k_2) de reacciones en que las dos sondas de detección se disocian de los amplicones.

Por tanto, la evaluación del valor de la variable discriminadora para cada sonda de detección permite determinar el genotipo. La escala en que se expresa la variable discriminadora puede dividirse en intervalos usando umbrales cuyos valores dependen de las propiedades de la sonda. Por consiguiente, según una realización del método, los intervalos de valores que pueden alcanzar las variables discriminadoras derivadas de la combinación de dos señales de sonda pueden dividirse en intervalos usando umbrales, de tal modo que los valores que pueden alcanzar las variables discriminadoras para cada genotipo se agrupen en uno de estos intervalos.

En el caso de un SNP bialélico, los valores que puede alcanzar la variable discriminadora se dividen en tres intervalos usando umbrales:

- Un intervalo menor contendrá

10 ○ el agrupamiento de tipo silvestre homocigótico si la primera sonda permite la detección del tipo mutante mientras que la segunda sonda permite la detección del tipo silvestre. Las primera y segunda sondas hacen referencia a la posición de la velocidad de reacción en la relación de variable discriminadora. La velocidad de reacción de la primera muestra está en el numerador y la velocidad de reacción de la segunda muestra esta en el denominador.

15 ○ el agrupamiento de tipo mutante homocigótico si la primera sonda permite la detección del tipo silvestre mientras que la segunda sonda permite la detección del tipo mutante;

- un intervalo superior contendrá

20 ○ el agrupamiento de tipo silvestre homocigótico si la primera sonda permite la detección del tipo silvestre mientras que la segunda sonda permite la detección del tipo mutante.

20 ○ el agrupamiento de tipo mutante homocigótico si la segunda sonda permite la detección del tipo silvestre mientras que la primera sonda permite la detección del tipo mutante;

- un intervalo mediano (entre el intervalo inferior y superior, y no superpuesto) contendrá el agrupamiento de tipo heterocigótico.

25 Según otra realización, la presente invención es un método para genotipar en ensayos de tipado multialélicos en que han de detectarse más de dos categorías genéticas.

30 En caso de tener que usarse dos sondas, se aplican los mismos principios que se exponen anteriormente, pero el intervalo de valores que puede alcanzar el valor discriminador ha de dividirse en más de tres intervalos. Por ejemplo, para ensayos de tipado trialélicos, un intervalo contendrá el agrupamiento de resultados de tres alelos WT, un intervalo los resultados de dos alelos de tipo silvestre y uno mutante, un intervalo un alelo de tipo silvestre y dos mutantes y el cuarto los resultados de los tres alelos mutantes. Para ensayos de tipado trialélicos, los genotipos pueden ser, por ejemplo, AAA, AAG, AGG y GGG. De forma similar, para los ensayos de tipado bialélicos, la variable discriminadora evalúa $k_{1,A \rightarrow A}/k_{1,G \rightarrow A}$, $(2k_{1,A \rightarrow A}+k_{1,A \rightarrow G})/(2k_{1,G \rightarrow A}+k_{1/G \rightarrow G})$, $(k_{1,A \rightarrow A}+2 k_{1,A \rightarrow G}) / (k_{1,G \rightarrow A}+2 k_{1,G \rightarrow G})$ y $k_{1,A \rightarrow G}/k_{1,G \rightarrow G}$, respectivamente. Esto conduce entonces a cuatro intervalos diferentes, estando los dos grupos medianos más cerca entre sí.

35 En caso de tener que usar tres o más sondas, los valores de la variable discriminadora pueden derivarse de cada combinación de dos curvas de fluorescencia. Han de usarse estrategias de combinación multidimensionales que usan los mismos principios.

40 Preferiblemente, la sonda contiene uno o más nucleótidos y/o análogos nucleotídicos que tienen una modificación que aumenta la afinidad. La sensibilidad a los polimorfismos se reduce porque aumenta la afinidad de la sonda por el sitio polimórfico. Por tanto, la sonda puede reconocer varios amplicones, conteniendo cada amplicón un SNP diferente conocido o desconocido. Igualmente, es concebible reemplazar nucleótidos individuales o algunos de un cebador por otros nucleótidos, a condición de que la especificidad de dichos cebadores y la temperatura de fusión de dichos cebadores no se altere demasiado. Resulta evidente para el trabajador experto que, aparte de los nucleótidos habituales A, G, C y T, pueden aplicarse también nucleótidos modificados tales como inosina, 2'-O-metilo, etc. en cebadores y sondas. Son otros ejemplos al menos un nucleótido que contiene una base modificada tal como 5-metil-desoxicitidina, 5-dimetilaminodesoxiuridina, desoxiuridina, 2,6-diaminopurina, 5-bromodesoxiuridina o cualquier otra base modificada que permita la hibridación. Se encuentran nucleótidos modificados adicionales en las patentes de EE.UU. nº 5.405.950 y 5.633.364 (ambas de Mock y Lovern). Las enseñanzas de la presente invención hacen posibles dichas modificaciones, partiendo del objeto en cuestión de las reivindicaciones.

50 Según una realización del método, se efectúa la amplificación poniendo en contacto la muestra con un par de cebadores, estando el cebador directo e inverso en ambos lados de la posición de SNP. Cuando se efectúa el proceso NASBA, el cebador directo está en 5' y el cebador inverso está en 3' de la posición de SNP. En caso de efectuar la amplificación por PCR, el cebador directo está en 3' y el cebador inverso está en 5' de la posición de SNP.

Según otra realización del método, se efectúa una amplificación instantánea poniendo en contacto la muestra al mismo tiempo con un par de cebadores y con al menos las dos sondas marcadas.

Según cualquiera de las realizaciones del método, cada sonda permite la detección instantánea por hibridación con el amplicón, incluyendo el híbrido de sonda-amplicón dicha posición de SNP.

- 5 De nuevo según otra realización del método, cada sonda difiere de las demás por su marcaje, que proporciona una señal distinguible, y por su secuencia, que difiere en al menos un nucleótido.

La secuencia de sonda corresponde a la diana de tipo silvestre o a una posible mutación.

En una realización particular del método, las sondas están constituidas por balizas moleculares.

En otra realización particular del método, la secuencia de ácido nucleico diana es de ADN.

- 10 De nuevo en otra realización particular del método, la reacción de amplificación es un método de amplificación basado en la transcripción, preferiblemente el método NASBA.

El proceso NASBA se describe en la patente europea nº EP-B-0.329.822. Aunque este proceso permite la amplificación de ARN, puede usarse para amplificar ácido nucleico bicatenario como se describe en la solicitud de patente europea EP-A-1.366.179. La ventaja principal de estos métodos frente a la PCR es que se efectúan isotérmicamente.

- 15

Es otro objeto de la presente invención un kit de ensayo para la detección del genotipo en ensayos de tipado de SNP aplicados a una muestra biológica, que comprende:

- un conjunto de cebadores oligonucleotídicos,
- al menos dos sondas oligonucleotídicas que comprenden una secuencia de ácido nucleico sustancialmente complementaria de al menos parte de la secuencia de ácido nucleico amplificada, una sonda dedicada a la identificación del tipo silvestre y la otra sonda dedicada a la identificación del tipo mutante, estando dotada cada sonda con un marcaje detectable, diferente entre sí, y
- reactivos de amplificación adecuados.

- 20

En una realización particular del kit, se asocia al menos uno de los cebadores oligonucleotídicos, denominado cebador directo, con un promotor de ARN polimerasa, preferiblemente una ARN polimerasa de T7.

- 25

En una realización particular del kit, comprende adicionalmente una sonda oligonucleotídica que contiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridar con la región del ácido nucleico amplificada usando el cebador directo y el cebador inverso.

Finalmente, la invención se refiere a un kit de ensayo en el que los reactivos de amplificación adecuados posibilitan un método de amplificación basado en la transcripción, preferiblemente el método NASBA.

- 30

DEFINICIONES

Según la presente invención, el término “alelo” hace referencia a una cualquiera o más de las formas alternativas de un gen o segmento de ADN dado: ambos o todos los alelos de un gen o segmento de ADN dado se refieren al mismo rasgo o característica, pero el producto o función codificado por un alelo particular difiere, cualitativa y/o cuantitativamente, del codificado por otros alelos de dicho gen o segmento de ADN.

- 35

Por tanto, el término “multialélico” hace referencia a un locus polimórfico caracterizado por la presencia de más de un alelo. El término “bialélico” hace referencia a un locus polimórfico caracterizado por dos alelos diferentes. Por tanto, un SNP bialélico es un SNP multialélico.

El término “genotipo”, como se usa en la presente memoria, hace referencia a la identidad de los alelos presentes en un individuo o muestra. Típicamente, se hace referencia al genotipo del individuo con respecto a un gen particular de interés y, en individuos poliploides, se hace referencia a la combinación de alelos que porta el individuo.

- 40

El término “genotipar” consiste en determinar el alelo específico o el nucleótido específico en el locus polimórfico.

Se entiende por “ácido nucleico” (AN) tanto ADN como ARN, ambos en cualquier configuración posible, concretamente, en forma de ácido nucleico bicatenario (bc) o en forma de ácido nucleico monocatenario (mc) o como una combinación de los mismos (en parte bc o mc). Dichos ácidos nucleicos corresponden a una sucesión de al menos dos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que comprenden opcionalmente al menos un nucleótido modificado.

- 45

Este polinucleótido puede estar también modificado a nivel del enlace internucleotídico tal como, por ejemplo, fosforotioatos, H-fosfonatos, alquilfosfonatos, a nivel del esqueleto tal como, por ejemplo, α -oligonucleótidos

(documento FR-A-2.607.507) o ANP (M. Egholm *et al.*, *J. Am. Chern. Soc.*, 114, 1895-1897, 1992) o 2'-O-alquilribosas. Cada una de estas modificaciones puede tomarse en combinación a condición de que esté presente al menos un fosfato en el ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser natural o sintético, un oligonucleótido, un polinucleótido, un fragmento de ácido nucleico, un ARN ribosómico, un ARN mensajero, un ARN transferente o un ácido nucleico obtenido mediante una técnica de amplificación enzimática tal como:

- 5
- PCR (reacción en cadena de la polimerasa), descrita en la patente de EE.UU. n° 4.683.195, patente de EE.UU. n° 4.683.202 y patente de EE.UU. n° 4.800.159, y su derivado PCR-TI (PCR con transcripción inversa), en particular en un formato de una etapa como se describe en la patente EP-B-0.569.272;
- RCR (reacción en cadena de reparación), descrita en la solicitud de patente WO-A-90/01069;
- 10
- 3SR (replicación de secuencia automantenida) con la solicitud de patente WO-A-90/06995;
- NASBA (amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico) con la solicitud de patente WO-A-91/02818; y
- TMA (amplificación mediada por transcripción) con U.S.

15 Dicho “ácido nucleico” puede usarse como cebadores y sondas. El término “cebador” como se usa en la presente memoria hace referencia a un oligonucleótido de origen natural (por ejemplo, como fragmento de restricción) o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario de una hebra de ácido nucleico (secuencia molde o diana) cuando se dispone en las condiciones adecuadas (por ejemplo, tampón, sal, temperatura y pH) en presencia de nucleótidos y un agente para polimerización de ácido nucleico, tal como una polimerasa dependiente de ADN o dependiente de ARN.

20 Normalmente, un conjunto de cebadores consistirá en al menos dos cebadores, un cebador “en 3’” y un cebador “en 5’”, que definen conjuntamente el amplicón (la secuencia que se amplificará usando dichos cebadores).

La “secuencia diana” se define como la parte de la molécula de ácido nucleico para detectar. Se amplifica mediante cebadores y enzimas relacionadas con la amplificación. La amplificación conduce a la formación de “amplicones”, que son moléculas de ácido nucleico que se detectan físicamente por hibridación con la sonda.

25 Como se usa en la presente memoria, el término “sonda” se pretende que comprenda una extensión de nucleótidos que hibridan con el amplicón. Preferiblemente, la parte hibridante es una extensión de 10-50, más preferiblemente 15-35, lo más preferiblemente 15-30 nucleótidos. La sonda según la invención es preferiblemente una denominada baliza molecular (BM). Se ha descrito una clase de sondas oligonucleotídicas, a la que se hace referencia como balizas moleculares, que facilitan la detección homogénea de secuencias diana de ácido nucleico específicas (Piatek *et al.* (1998) *Nature Biotechnology* 16: 359-363; Tyagi y Kramer (1996) *Nature Biotechnology* 14: 303-308). Las balizas moleculares son oligonucleótidos monocatenarios que tienen una estructura de tallo-bucle. La porción de bucle contiene la secuencia complementaria con el amplicón (de ADN o ARN). El tallo está formado por la hibridación de la secuencia complementaria del extremo 3’ con el extremo 5’. El tallo puede no estar relacionado con el amplicón y es bicatenario. Un brazo del tallo se marca con un tinte fluorescente (floróforo), mientras que el otro se acopla con un resto inactivador. En el estado de tallo-bucle, la sonda no produce fluorescencia debido a que la energía del fluoróforo se transfiere a la molécula inactivadora. Cuando la baliza molecular hibrida con el amplicón, se pierde la estructura de tallo-bucle y se separan inactivador y fluoróforo. En esa etapa, la fluorescencia emitida por el fluoróforo puede detectarse y cuantificarse.

30

35

El término “variable discriminatoria” significa una variable de respuesta que puede derivar de las respuestas observadas de dos sondas, y que puede usarse para la clasificación final. La “variable discriminatoria” puede llamarse también “variable de cuantificación”, que puede derivar de las curvas de fluorescencia.

40

Se describirá ahora adicionalmente la invención, a modo de ejemplos, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- 45
- La Figura 1 representa los resultados obtenidos con una técnica según el estado de la técnica. La señal de fluorescencia observada aumenta para las dos señales de balizas moleculares, no conduciendo a una discriminación suficiente. Leyenda: A, genotipo AA; G genotipo GG; H, genotipo heterocigótico GA.
- La Figura 2 representa los resultados obtenidos con la técnica según la presente invención. Se representan los valores de la variable de cuantificación en el eje vertical de una escala logarítmica frente a la relación de relaciones de fluorescencia de la figura 1. El único modo de conseguir la discriminación requerida entre los grupos está basado en el valor de la variable de cuantificación representado en el eje vertical. Leyenda: A, genotipo AA; G, genotipo GG; H, genotipo heterocigótico GA.
- 50

Ejemplo:

La trombosis es una dolencia humana importante, que mata a cientos de miles y debilita a millones cada año por infarto de miocardio, embolia pulmonar o apoplejía. Los factores de riesgo incluyen tanto afecciones hereditarias

como adquiridas. Generalmente, podría surgir una tendencia a la trombosis por rutas de coagulación hiperactivas, mecanismos anticoagulantes hipoactivos o fibrinólisis hipoactiva. Las mutaciones en los genes que codifican proteínas en estas rutas desempeñan un papel importante en la predisposición a la trombosis.

5 Uno de los posibles SNP se refiere al gen que codifica uno de los factores de coagulación, que es el factor II. En una localización específica, puede estar presente un nucleótido G (tipo silvestre) o A (mutante).

10 Se sometieron muestras clínicas de tres grupos de pacientes (de tipo silvestre homocigótico, mutante homocigótico y heterocigótico) al ensayo de factor II NucliSens EasyQ. En este ensayo, se amplifica el ADN genómico en presencia de ambas balizas moleculares. Debido a la acumulación de producto de amplificación, se generan señales de fluorescencia. Se encuentra una medida sencilla de la cantidad de señal en la relación de señal de fluorescencia observada máxima con el tiempo frente al nivel de fondo inicial.

La clasificación obvia está basada en la medida de este aumento de fluorescencia:

- en el caso de un genotipo homocigótico, se espera que domine un tipo de señal (A o G),
- mientras que en el genotipo heterocigótico, harán su aparición ambas señales.

15 Sin embargo, debido a la gran homología entre los genotipos, no pueden desarrollarse balizas moleculares completamente específicas y, como resultado, como puede observarse en la Figura 1, ambas señales hacen su aparición en los tres grupos. Claramente, el grupo de genotipo GG está separado de los otros dos (GA y AA), pero estos dos muestran una superposición considerable.

20 Como alternativa, se usó la variable de cuantificación. Los resultados se presentan en la Figura 2. En el eje horizontal, se presenta la relación de aumentos de señal de fluorescencia. Claramente, la separación de los valores de la variable de cuantificación es completa.

Se presentan en la Tabla 1 siguiente algunas estadísticas de resumen de los valores de la variable de cuantificación:

Genotipo	n	Mín	Máx	Media	DE
AA	90	-1,71	-1,42	-1,58	0,075
GA	90	-1,20	-1,03	-1,11	0,042
GG	54	-0,25	+0,13	+0,03	0,087

Tabla 1

REIVINDICACIONES

1. Método para genotipado en ensayos de tipado aplicados a una muestra biológica, conteniendo la muestra un ácido nucleico diana de interés y siendo el ácido nucleico diana susceptible de contener un polimorfismo mononucleotídico (SNP) bialélico, que comprende las etapas de:

- 5 - efectuar una amplificación por NSABA o TMA de la diana, generando múltiples copias de amplicones, en presencia de al menos dos sondas marcadas diferentes, siendo cada sonda una baliza molecular que permite la detección instantánea de la posición de SNP tanto del tipo silvestre como de al menos una posible mutación,
- 10 - evaluar el valor o valores de la variable discriminatoria basándose en las señales de cada combinación de dos sondas de detección, y
- discriminar entre los genotipos basándose en el valor de la variable discriminatoria,

en el que el valor de la variable discriminatoria para un genotipo heterocigótico es una relación seleccionada del grupo consistente en $(k_{WT \rightarrow WT} + k_{WT \rightarrow m}) / (k_{m \rightarrow m} + k_{m \rightarrow WT})$, $(k_{WT \rightarrow WT} - k_{WT \rightarrow m}) / (k_{m \rightarrow m} - k_{m \rightarrow WT})$, $(k_{WT \rightarrow WT} \times k_{WT \rightarrow m}) / (k_{m \rightarrow m} \times k_{m \rightarrow WT})$, $(k_{WT \rightarrow WT} / k_{WT \rightarrow m}) / (k_{m \rightarrow m} / k_{m \rightarrow WT})$ y sus recíprocos;

- 15 el valor de la variable discriminatoria para un genotipo mutante homocigótico es una relación de $k_{WT \rightarrow m} / k_{m \rightarrow m}$ o su recíproco; y

el valor de la variable discriminatoria para un tipo silvestre homocigótico es una relación de $k_{WT \rightarrow WT} / k_{m \rightarrow WT}$ o su recíproco.

- 20 2. Método según la reivindicación 1, en el que la amplificación se efectúa poniendo en contacto la muestra con un par de cebadores, estando los cebadores directo e inverso en ambos lados de la posición de SNP.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 precedentes, en el que cada sonda permite la detección instantánea por hibridación con el amplicón, incluyendo el híbrido de sonda-amplicón dicha posición de SNP.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 precedentes, en el que cada sonda difiere de las demás por su marcaje, que proporciona una señal distinguible, y por su secuencia, que difiere en al menos un nucleótido.

- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 precedentes, en el que la evaluación del valor de la variable discriminatoria para cada combinación de dos sondas de detección se realiza mediante la evaluación de:

- las constantes de la velocidad de reacción de asociación relativa (k_1) de reacciones en que las dos sondas de detección se unen a los amplicones; o

- 30 - las constantes de la velocidad de reacción de disociación relativa (k_2) de reacciones en que las dos sondas de detección se disocian de los amplicones.

6. Método según la reivindicación 5, en el que los intervalos de valores que pueden alcanzar las variables discriminatorias derivadas de una combinación de dos señales de sonda pueden dividirse en intervalos usando umbrales, de tal modo que los valores que pueden alcanzar las variables discriminatorias para cada genotipo se agrupan en uno de estos intervalos.

- 35 7. Método según la reivindicación 6, en el que los valores que puede alcanzar la variable discriminatoria se dividen en tres intervalos usando umbrales.

8. Método según la reivindicación 6, en el que los valores que puede alcanzar la variable discriminatoria para una diana heterocigótica se agrupan en el intervalo mediano.

- 40 9. Método según las reivindicaciones 4 y 6, en el que cuando los valores que puede alcanzar la variable discriminatoria se agrupan en el intervalo inferior, la secuencia diana es:

a. de tipo silvestre homocigótico si la primera sonda permite la detección del tipo mutante mientras que la segunda sonda permite la detección del tipo silvestre,

b. de tipo mutante homocigótico si la primera sonda permite la detección del tipo silvestre mientras que la segunda muestra permite la detección del tipo mutante.

- 45 10. Método según las reivindicaciones 4 y 6, en el que cuando los valores que puede alcanzar la variable discriminatoria se agrupan en el intervalo superior, la secuencia diana es:

a. de tipo silvestre homocigótico si la primera sonda permite la detección del tipo silvestre mientras que la segunda sonda permite la detección del tipo mutante,

b. de tipo mutante homocigótico si la segunda sonda permite la detección del tipo silvestre mientras que la primera sonda permite la detección del tipo mutante.

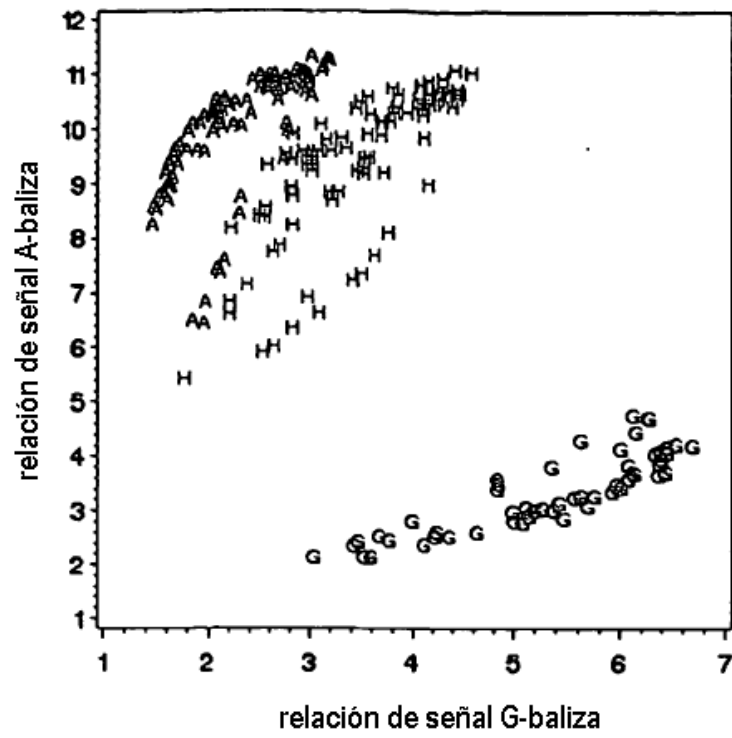


FIGURA 1

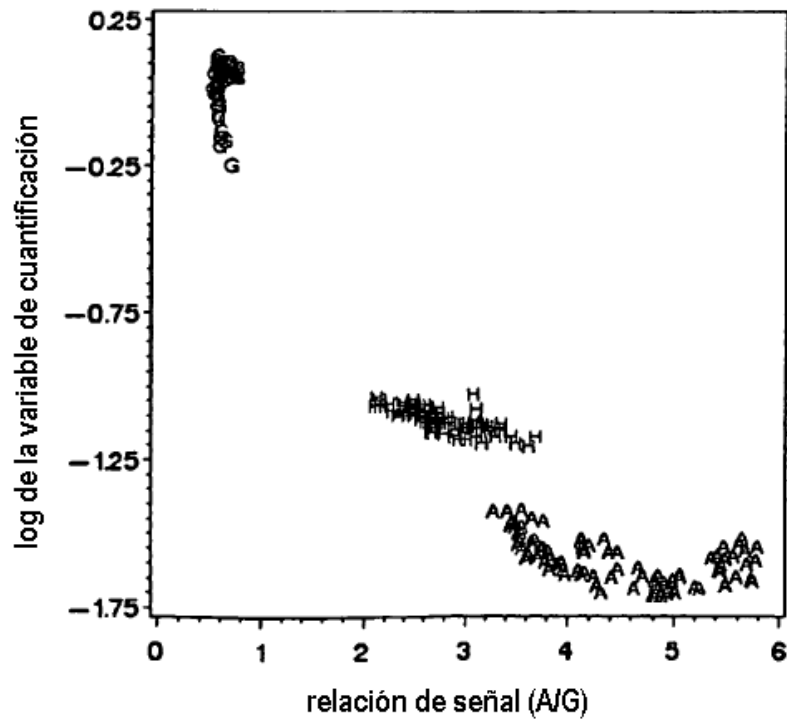


FIGURA 2