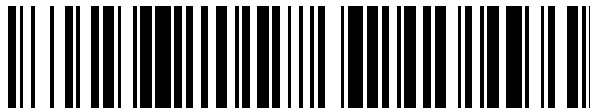


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 653**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2009 E 09740853 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2337865**

54 Título: **Amplificación específica de alelo usando un cebador con un nucleótido modificado**

30 Prioridad:

20.10.2008 US 106783 P

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

28.01.2015

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**WILL, STEPHEN GORDON;
NEWTON, NICOLAS y
TSAN, ALISON**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 527 653 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

Amplificación específica de alelo usando un cebador con un nucleótido modificado

5 La amplificación específica de alelo de ácidos nucleicos permite la amplificación y el análisis simultáneos de la secuencia diana. La amplificación específica de alelo se usa habitualmente cuando se sospecha que el ácido nucleico diana tiene una o más subpoblaciones con una variación (polimorfismo) en su secuencia. Se usan polimorfismos de ADN en el análisis del perfil de ADN (criminalística, ensayos de paternidad, tipificación de tejidos para trasplantes de órganos), mapeo genético, así como detección de mutaciones poco habituales, tales como las que aparecen en células cancerosas en el fondo de células con ADN normal.

10 En una amplificación específica de alelo exitosa, la variante deseada del ácido nucleico diana se amplifica, mientras que las otras variantes no, al menos no a un nivel detectable. Un ensayo de amplificación específico de alelo típico implica una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la que al menos un cebador es complementario de la región con un polimorfismo sospechado. El diseño del cebador específico de alelo es tal que se produce extensión del cebador solamente cuando está presente una cierta variante del polimorfismo. En su forma más sencilla, el cebador específico de alelo tiene un nucleótido 3' terminal complementario de la variante deseada del nucleótido polimórfico en la diana. Con frecuencia, una única falta de coincidencia en el extremo 3' terminal del cebador es suficiente para evitar la amplificación de las variantes no deseadas de la secuencia diana. Sin embargo, la especificidad de la amplificación varía en gran medida entre diferentes secuencias 3' terminales: algunas faltas de coincidencia bloquean eficazmente la extensión por la polimerasa, mientras que otras no, véase Patente de Estados Unidos N° 5.639.611.

15 El éxito de la diferenciación alélica depende de la incapacidad de la ADN polimerasa para extender cebadores no coincidentes. Esta incapacidad de la ADN polimerasa puede modularse ajustándose a las condiciones de reacción para conseguir la selectividad máxima. No obstante, la escasa selectividad de la PCR específica de alelo sigue siendo un problema para muchas secuencias polimórficas.

20 Un enfoque para aumentar la especificidad implica modificar por ingeniería genética cebadores de amplificación con un nucleótido o nucleótidos no coincidentes internos. Este enfoque ha demostrado ser exitoso en algunos sistemas, véase Patente de Estados Unidos 5.137.806.

25 Otro enfoque para aumentar la especificidad implica la modificación química de los cebadores. Por ejemplo, se descubrió que ciertas modificaciones 2'-C y 4'-C de la desoxirribosa de algunos nucleótidos en el cebador potencian la diferenciación de alelos por la polimerasa, véase Gaster, J. y Marx, A., Chem. Eur. J. 2005, 11: 1861-1870. En otro estudio, se ha descubierto que la diferenciación alélica está potenciada por el uso de una base pirimidínica no natural en uno de los nucleótidos en el cebador, específicamente, pseudoisocitidina con diversos sustituyentes en la posición 6 del anillo de pirimidina, véase Patente de Estados Unidos N° 7.408.051. Otro enfoque, la Solicitud de PCT WO00/43544, describe el uso de cebadores modificados por la inclusión de nucleótidos de etenoadenina que tienen una modificación en el grupo amino exocíclico en PCR específica de alelos. Se muestra además que la especificidad es mucho mayor si el cebador tanto inverso como directo contiene nucleótidos modificados.

30 Se desvelan además cebadores modificados en la Solicitud de Patente Europea 0 974 672 y la Patente de Estados Unidos 6.001.611; ninguno de los documentos dicen nada, sin embargo, acerca de una reacción de amplificación específica de alelo. La Solicitud de Patente Europea 0 974 672 se dirige a un método para llevar a cabo Polimorfismo de Longitud de Fragmento Amplificado (AFLP); los cebadores usados en el proceso para amplificar específicamente dianas adaptadoras contienen nucleótidos que pueden modificarse en el grupo amino exocíclico. La Patente de Estados Unidos 6.001.611 desvela cebadores que contienen un nucleótido modificado (por ejemplo, grupo bencilo o alquilo) en la posición -1 a -5 en relación con el nucleótido 3' para usar para reacciones de PCR generales.

35 En el contexto de la PCR específica de alelo en tiempo real, la selectividad del ensayo puede medirse como la diferencia en el número de ciclos umbral (Ct) entre los moldes coincidentes y no coincidentes. Una mayor diferencia indica un mayor retardo en la amplificación del molde no coincidente y por lo tanto una mayor diferenciación entre alelos. Se ha mostrado que la desoxirribosa modificada da como resultado diferencias de Ct de entre 1 y 14 ciclos. El uso de pseudoisocitidina dio como resultado un retardo de 7 ciclos en la amplificación del molde no coincidente. Este grado de diferenciación es insuficiente para muchas aplicaciones, cuando la muestra contiene varias variantes del molde, compitiendo todas para su amplificación. Con frecuencia el molde no coincidente está presente en cantidades mucho mayores que el molde coincidente. Por ejemplo, en muestras tisulares, solamente una fracción pequeña de células puede ser maligna y portar la mutación ("molde coincidente"), a la que se dirige el ensayo de amplificación específico de alelo. El molde presente en células normales puede amplificarse menos eficazmente, pero los abrumadores números de células normales superarán cualquier retardo en la amplificación y eliminarán cualquier ventaja del molde mutante. Para detectar mutaciones poco habituales en presencia de molde de tipo silvestre, es necesario mejorar la especificidad del ensayo de amplificación específico de alelo.

65

Sumario de la invención

En general, la invención se refiere a un método mejorado de amplificación específica de alelo, en el que uno o más nucleótidos en el cebador o los cebadores específicos de alelo se modifican por un enlace covalente de un grupo modificador definido con un grupo amino exocíclico de la base nucleotídica. La modificación puede producirse de forma interna o en el extremo 3' del cebador, o ambos.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para amplificación específica de alelo de una variante de una secuencia diana, que existe en forma de varias secuencias variantes, que comprende

- (a) proporcionar una muestra, que contiene posiblemente al menos una variante de una secuencia diana;
- (b) proporcionar un primer oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana;
- (c) proporcionar un segundo oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana, que tiene al menos un nucleótido 3' terminal complementario solamente de una variante de la secuencia diana; en el que dicho segundo oligonucleótido incorpora al menos un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico, en el que dicha base se selecciona de un grupo que consiste en N⁶-bencil-adenina, N⁶-para-*terc*-butil-bencil adenina, N²-alquil-guanina y N⁴-bencil-citosina;
- (d) proporcionar condiciones adecuadas para la hibridación de dichos primer y segundo oligonucleótidos con al menos una variante de la secuencia diana; y
- (e) proporcionar condiciones adecuadas para la extensión del segundo oligonucleótido por un biocatalizador que incorpora nucleótidos; en el que dicho biocatalizador es capaz de extender dicho segundo oligonucleótido cuando hibrida con la variante de la secuencia diana para la que tiene dicho nucleótido 3' terminal complementario, y sustancialmente menos cuando dicho segundo oligonucleótido se hibrida con la variante de la secuencia diana para la que tiene un nucleótido 3' terminal no complementario.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para detectar una variante de una secuencia diana en una muestra, que existe en forma de varias secuencias variantes que comprende

- (a) hibridar un primer y segundo oligonucleótidos con al menos una variante de la secuencia diana; en el que el primer oligonucleótido es al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y el segundo oligonucleótido es al menos parcialmente complementario de una o varias variantes de la secuencia diana y tiene un nucleótido 3' terminal complementario de solamente una variante de la secuencia diana, incorporando dicho segundo oligonucleótido al menos un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico, en el que dicha base se selecciona de un grupo que consiste en N⁶-bencil-adenina, N⁶-para-*terc*-butil-bencil adenina, N²-alquil-guanina y N⁴-bencil-citosina;
- (b) extender el segundo oligonucleótido con un biocatalizador que incorpora nucleótidos; en el que dicho biocatalizador es capaz de extender de forma detectable solamente el oligonucleótido, hibridado con la variante de la secuencia diana para la que tiene dicho nucleótido 3' terminal complementario; y
- (c) detectar los productos de dicha extensión de segundo oligonucleótido, en los que la extensión indica la presencia de la variante de una secuencia diana para la que el oligonucleótido tiene un nucleótido 3' terminal complementario.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un kit para amplificación específica de alelo de una secuencia diana, que existe en forma de varias secuencias variantes, que comprende

- (a) un primer oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana;
- (b) un segundo oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y que tiene un nucleótido 3' terminal complementario de solamente una variante de la secuencia diana; en el que dicho segundo oligonucleótido incorpora al menos un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico, en el que dicha base se selecciona de un grupo que consiste en N⁶-bencil-adenina, N⁶-para-*terc*-butil-bencil adenina, N²-alquil-guanina y N⁴-bencil-citosina; y
- (c) un biocatalizador que incorpora nucleótidos, nucleósido trifosfatos, tampón adecuado para la extensión de ácidos nucleicos por biocatalizadores que incorporan nucleótidos y un conjunto de instrucciones para realizar amplificación específica de alelos.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un oligonucleótido para realizar una amplificación específica de alelo de una secuencia diana, que existe en forma de varias secuencias variantes, que comprende

- una secuencia al menos parcialmente complementaria de una parte de una o más variantes de dicha secuencia diana;
- un nucleótido 3' terminal que es complementario de solamente una variante de dicha secuencia diana;
- al menos un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico, en el que dicho nucleótido modificado se localiza en las posiciones -5, -4, -3, -2 o -1 en relación con el nucleótido 3' terminal, en

el que dicha base se selecciona de un grupo que consiste en N⁶-bencil-adenina, N⁶-para-*terc*-butil-bencil adenina, N²-alquil-guanina y N⁴-bencil-citosina; y

- que tiene una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEC ID N^o: 4, 5, 8, 11 y 13.

5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático del ensayo de amplificación específico de alelo de la presente invención.

La Figura 2 muestra los resultados de la amplificación específica de alelo usando cebadores con modificaciones de bases internas.

La Figura 3 muestra los resultados de la amplificación específica de alelo usando cebadores con una o más modificaciones de bases internas y 3' terminales.

La Figura 4 muestra los resultados de la amplificación específica de alelo usando un cebador con una modificación de bases y diversas ADN polimerasas.

La Figura 5 muestra los resultados de la amplificación específica de alelo usando cebadores de bases modificadas en presencia de cantidades excesivas de molde no coincidente.

La Figura 6 muestra un ejemplo de un formato de cebador-sonda scorpion o de tipo scorpion dentro de la intención de la invención.

La Figura 7 muestra una representación esquemática de la estructura de un formato de ARMS scorpion que puede usarse de acuerdo con la invención.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Al describir y reivindicar la presente invención, se usarán las siguientes definiciones.

La expresión "ácido nucleico" se refiere a polímeros de nucleótidos (por ejemplo, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de nucleótidos, etc.) y que comprende ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN), híbridos de ADN-ARN, oligonucleótidos, polinucleótidos, aptámeros, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), conjugados de PNA-ADN, conjugados de PNA-ARN, etc., que comprenden nucleótidos unidos covalentemente entre sí, de una manera lineal o ramificada. Un ácido nucleico es típicamente monocatenario o bicatenario y generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener cadenas principales alternativas, incluyendo, por ejemplo, fosforamida (Beaucage *et al.* (1993) *Tetrahedron* 49(10): 1925); fosforotioato (Mag *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 1437; y Patente de Estados Unidos N^o 5.644.048), fosforoditioato (Briu *et al.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111: 2321), enlaces *O*-metilfosforamidita (véase Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press (1992)), y cadenas principales y enlaces de ácido nucleico peptídico (véase, Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114: 1895). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen los que tienen cadenas principales con carga positiva (Denpcy *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097); cadenas principales no iónicas (Patentes de Estados Unidos N^o 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863) y cadenas principales no de ribosa, incluyendo las descritas en las Patentes de Estados Unidos N^o 5.235.033 y 5.034.506. También se incluyen ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos dentro de la definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins *et al.* (1995) *Chem. Soc. Rev.* pp. 169-176), y se describen también análogos en, por ejemplo Rawls, *C & E News* 2 Jun. 1997 página 35. Estas modificaciones de la cadena principal de fosfato-ribosa pueden realizarse para facilitar la adición de restos adicionales tales como marcadores, o para alterar la estabilidad y semivida de dichas moléculas en ambientes fisiológicos.

Además de las bases heterocíclicas de origen natural que se encuentran típicamente en ácidos nucleicos (por ejemplo, adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), los análogos de nucleótidos también pueden incluir bases heterocíclicas de origen no natural, tales como las descritas en, por ejemplo, Seela *et al.* (1999) *Helv. Chim. Acta* 82: 1640. Ciertas bases usadas en análogos de nucleótidos actúan como modificadores de la temperatura de fusión (T_m). Por ejemplo, algunas de estas incluyen 7-desazapurinas (por ejemplo, 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, etc.), pirazolo[3,4-*d*]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo, propinil-dU, propinil-dC, etc.), y similares, véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N^o 5.990.303. Otras bases heterocíclicas representativas incluyen, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina; derivados 8-aza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; derivados 7-desaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitidina; 5-fluorocitidina; 5-clorocitidina; 5-yodocitidina; 5-bromocitidina; 5-metilcitidina; 5-propinilcitidina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluorouracilo; 5-clorouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracilo y similares.

Un "nucleósido" se refiere a un componente de ácido nucleico que comprende un base o grupo básico (que comprende al menos un anillo homocíclico, al menos un anillo heterocíclico, al menos un grupo arilo y/o similares)

unido covalentemente con un resto de azúcar (un azúcar ribosa o un azúcar desoxirribosa), un derivado de un resto de azúcar, o un equivalente funcional de un resto de azúcar (por ejemplo, un anillo carbocíclico). Por ejemplo, cuando un nucleósido incluye un resto de azúcar, la base se une típicamente con una posición 1' de ese resto de azúcar. Como se ha descrito anteriormente, una base puede ser una base de origen natural o una base de origen no natural. Los nucleósidos ejemplares incluyen ribonucleósidos, desoxirribonucleósidos, didesoxirribonucleósidos y nucleósidos carbocíclicos.

Un "nucleótido" se refiere a un éster de un nucleósido, por ejemplo, un éster de fosfato de un nucleósido, que tiene uno, dos, tres o más grupos fosfato unidos covalentemente con una posición 5' de un resto de azúcar del nucleósido.

Un "nucleótido de purina" se refiere a un nucleótido que comprende una base purínica, mientras que un "nucleótido de pirimidina" se refiere a un nucleótido que comprende una base pirimidínica.

Un "oligonucleótido" se refiere a un polímero de ácido nucleico que incluye al menos dos, pero típicamente 5-50 nucleótidos y más típicamente, entre 15 y 35 nucleótidos. El tamaño exacto de un oligonucleótido depende en general de diferentes factores, incluyendo la función última o uso del oligonucleótido. Pueden prepararse oligonucleótidos por cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, clonación y digestión de restricción de secuencias apropiadas, o síntesis química directa por un método tal como el método de fosfotriéster de Narang *et al.* (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 90-99; el método de fosfodiéster de Brown *et al.* (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 109-151; el método de dietifosforamidita de Beaucage *et al.* (1981) *Tetrahedron Lett.* 22: 1859-1862; el método de triéster de Matteucci *et al.* (1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103: 3185-3191; métodos de síntesis automática; el método de soporte sólido de la Patente de Estados Unidos N° 4.458.066 o cualquier otro método químico conocido en la técnica.

Un "ácido nucleico cebador" o "cebador" es un oligonucleótido que puede hibridar con un ácido nucleico diana y permite la extensión o elongación de cadena usando un biocatalizador que incorpora nucleótidos. Aunque se utilizan en ocasiones otras longitudes de cebadores, los cebadores típicamente varían de 15 a 35 nucleótidos. Los ácidos nucleicos cebadores cortos utilizan generalmente temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con ácidos nucleicos molde. Un ácido nucleico cebador que es al menos parcialmente complementario de una subsecuencia de un ácido nucleico molde es típicamente suficiente para hibridar con el ácido nucleico molde para que se produzca extensión. Sin embargo, el éxito de la extensión requiere en general mayor complementariedad (es decir menos faltas de coincidencia con el molde) en el extremo 3' del cebador. Un ácido nucleico cebador puede marcarse, si se desea, incorporando un marcador detectable por técnicas radiológicas, espectroscópicas, fotoquímicas, bioquímicas, inmunoquímicas o químicas.

Un "cebador extendido" se refiere a un cebador al que se han añadido uno o más nucleótidos adicionales. "Extensión de cebadores" es la acción de la enzima por la que se añaden nucleótidos adicionales al cebador.

Un "ácido nucleico molde", "molde" o "diana" se refiere a un ácido nucleico con el que puede hibridar un ácido nucleico cebador y puede extenderse en condiciones adecuadas. En el contexto de la amplificación de ácido nucleico, "diana" es preferentemente una región de ácido nucleico bicatenario, que consiste en las secuencias al menos parcialmente complementarias de al menos dos secuencias de cebadores y la secuencia intermedia. Una diana también puede ser un ácido nucleico monocatenario, que consiste en una secuencia al menos parcialmente complementaria de un cebador y una secuencia parcialmente idéntica al segundo cebador. Los ácidos nucleicos molde pueden existir como fragmentos de ácido nucleico aislados o ser parte de un fragmento de ácido nucleico mayor. Los ácidos nucleicos diana pueden derivar o aislarse de esencialmente cualquier fuente, tal como microorganismos cultivados, microorganismos no cultivados, mezclas biológicas complejas, tejidos, sueros, tejidos o muestras antiguos o conservados, aislados ambientales o similares. Además, los ácidos nucleicos molde opcionalmente incluyen o derivan de ADNc, ARN, ADN genómico clonado, bibliotecas de ADN genómico, ADN o ARN fragmentado enzimáticamente, ADN o ARN fragmentado químicamente, ADN o ARN fragmentado físicamente o similares. Los ácidos nucleicos molde también pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en este campo.

Como se usa en el presente documento, un "gen" se refiere a cualquier segmento de ADN asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen secuencias codificantes y, opcionalmente, las secuencias reguladoras requeridas para la expresión de las secuencias codificantes.

Los ácidos nucleicos se "extienden" o se "elongan" cuando se incorporan nucleótidos adicionales en los ácidos nucleicos, por ejemplo por un biocatalizador que incorpora nucleótidos, en el extremo 3' de un ácido nucleico.

Un "resto" o "grupo" se refiere a una de las partes en las que algo, tal como una molécula, se divide (por ejemplo, un grupo funcional, un grupo sustituyente, o similares). Por ejemplo, un nucleótido típicamente comprende un grupo de base (por ejemplo, adenina, timina, citosina, guanina, uracilo o un análogo), un resto de azúcar y uno o más grupos fosfato.

Un "grupo alquilo" se refiere a un resto de hidrocarburo lineal, ramificado o cíclico saturado e incluye todos los isómeros posicionales, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo, pentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, hexilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1-etil-1-metilpropilo y 1-etil-2-metilpropilo, *n*-hexilo, ciclohexilo, *n*-heptilo, *n*-octilo, 2-etilhexilo, *n*-nonilo, *n*-decilo y similares. Un grupo alquilo típicamente comprende aproximadamente 1-20 átomos de carbono y más típicamente comprende aproximadamente 2-15 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar sustituidos o no sustituidos.

Un "grupo alcoxi" se refiere a un grupo alquilo que comprende un átomo de oxígeno e incluye, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, pentoxi, heptiloxi, octiloxi y similares.

Un "grupo arilo" se refiere a un grupo sustituyente de átomos o resto que deriva de un compuesto aromático. Los grupos arilo ejemplares incluyen, por ejemplo, grupos fenilo o similares. Los grupos arilo incluyen opcionalmente múltiples anillos aromáticos (por ejemplo, grupos difenilo, etc.). Además, un grupo arilo puede ser sustituido o no sustituido.

Un "grupo ariloxi" se refiere a un grupo arilo que comprende un átomo de oxígeno e incluye, por ejemplo, fenoxi, clorofenoxi, metilfenoxi, metoxifenoxi, butilfenoxi, pentilfenoxi, benciloxi y similares.

Un "grupo alquilo-arilo" se refiere a un grupo que comprende restos de alquilo y arilo. Los ejemplos de los grupos alquilo-arilo incluyen grupos bencilo, grupos toliolo y grupos xililo.

Un ensayo de amplificación es "selectivo" o "selectivo para alelo" si produce una predominancia (es decir, una mayoría pero menos del 100 %) de un producto sobre otros posibles productos. Un ensayo se describe como "selectivo para alelo" siempre que la amplificación de la variante no deseada (no coincidente) de la secuencia diana sea detectable. La expresión ensayo de amplificación "específico" o "específico de alelo" se usa si se forma en exclusiva uno de los productos posibles. En el ensayo en el que la amplificación de la diana no deseada (no coincidente) es indetectable se denomina "específico de alelo". A medida que los métodos de detección se hacen más sensibles, algunos ensayos que previamente se conocía que eran específicos de alelo, resultan ser selectivos de alelo, es decir, alguna amplificación de variantes indeseadas de la diana se hace detectable. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, se entiende que la expresión "específico de alelo" abarca amplificación tanto estrictamente específica de alelo, como selectiva de alelo.

Un "genotipo" se refiere a toda o parte de la constitución genética de una célula o sujeto, o un grupo de células o sujetos. Por ejemplo, un genotipo incluye las mutaciones particulares y/o alelos (por ejemplo, polimorfismos, tales como polimorfismos de nucleótidos individuales (SNP) o similares) presentes en un locus dado o distribuidos en un genoma.

Un "biocatalizador que incorpora nucleótidos" o "enzima que incorpora nucleótidos" se refiere a un catalizador (o enzima) que cataliza la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico. Las enzimas que incorporan nucleótidos ejemplares incluyen ADN polimerasas, ARN polimerasas, transferasas terminales, transcriptasas inversas, telomerasas y similares.

Una "enzima termoestable" se refiere a una enzima que es estable (es decir, resiste la degradación o desnaturalización) y conserva suficiente actividad catalítica cuando se somete a temperaturas elevadas durante periodos de tiempo seleccionados. Por ejemplo, una polimerasa termoestable conserva suficiente actividad para efectuar reacciones de extensión de cebadores posteriores, cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para desnaturalizar ácidos nucleicos bicatenarios. Se conocen bien en la técnica condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de ácidos nucleicos y se ejemplifican en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.683.202 y 4.683.195. Como se usa en el presente documento, una polimerasa termoestable es típicamente adecuada para su uso en una reacción de ciclos de temperatura tal como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). Los ejemplos de polimerasas de ácido nucleico termoestables incluyen ADN polimerasa Taq de *Thermus aquaticus*, polimerasa Z05 de *Thermus* sp., polimerasa de *Thermus flavus*, polimerasas de *Thermotoga* marítima, tales como polimerasas TMA-25 y TMA-30, ADN polimerasa Tth y similares.

Una enzima "modificada" se refiere a una enzima que comprende un polímero de aminoácidos en el que al menos un monómero difiere de la secuencia de referencia, tal como una forma nativa o de tipo silvestre de la enzima u otra forma modificada de la enzima. Las modificaciones ejemplares incluyen inserciones, deleciones y sustituciones de monómeros. Las enzimas modificadas también incluyen enzimas quiméricas que tienen secuencias componentes identificables, (por ejemplo, dominios estructurales o funcionales, etc.) derivadas de dos o más precursores. También se incluyen dentro de la definición de enzimas modificadas las que comprenden modificaciones químicas de la secuencia de referencia. Los ejemplos preferidos de polimerasas modificadas incluyen ADN polimerasa G46E E678G CS5, ADN polimerasa CS5 G46E L329A E678G, ADN polimerasa CS5 G46E L329A D640G S671F, ADN

polimerasa CS5 G46E L329A D640G S671F E678G, una ADN polimerasa CS6 G46E E678G, polimerasa Δ Z05, polimerasa Gold Δ Z05, polimerasa Δ Z05R, ADN polimerasa Taq E615G, polimerasa TMA-25 E678G, polimerasa TMA-30 E678G y similares.

5 La expresión "actividad nucleasa 5' a 3'" o "actividad nucleasa 5'-3'" se refiere a una actividad de una polimerasa de ácido nucleico, típicamente asociada con la síntesis de cadena de ácido nucleico, por la que se retiran nucleótidos del extremo 5' de la cadena de ácido nucleico, por ejemplo, ADN polimerasa de *E. coli* I tiene esta actividad, mientras que el fragmento de Klenow no.

10 Una polimerasa que "carece sustancialmente de actividad nucleasa 5'-3'" se refiere a una polimerasa que tiene 50 % o menos (por ejemplo, <25 %, <20 %, <15 %, <10 %) de actividad nucleasa 5'-3' que la ADN polimerasa Taq. Se conocen bien en la técnica métodos para medir la actividad nucleasa 5'-3' y condiciones para su medición. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.466.591. Los ejemplos de ADN polimerasas que carecen sustancialmente de actividad nucleasa 5' a 3' incluyen el fragmento Klenow de ADN polimerasa de *E. coli* I; una ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) que carecen de los 235 aminoácidos N-terminales (por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.616.494 y denominado habitualmente en la técnica "fragmento de Stoffel"). Otros ejemplos incluyen una ADN polimerasa termoestable que tiene suficientes deleciones (por ejemplo, deleciones N-terminales), mutaciones o modificaciones para eliminar o inactivar el dominio responsable de la actividad nucleasa 5'-3'. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.795.762.

20 Un "marcador" se refiere a un resto unido (covalentemente o no covalentemente), con una molécula y capaz de proporcionar información acerca de la molécula. Los marcadores ejemplares incluyen marcadores fluorescentes, marcadores colorimétricos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, marcadores radiactivos, grupos modificadores de masa, anticuerpos, antígenos, biotina, haptenos y enzimas (incluyendo peroxidasa, fosfatasa, etc.).

25 Un "inicio en caliente", en el contexto de una reacción de amplificación de ácido nucleico, se refiere a un protocolo, en el que al menos un reactivo crítico se mantiene fuera de la mezcla de reacción (o, si está presente en la mezcla de reacción, el reactivo permanece inactivo) hasta que la temperatura se eleva lo suficiente para proporcionar la especificidad de hibridación necesaria del cebador o los cebadores. Una "enzima de inicio en caliente" es una enzima, típicamente una ácido nucleico polimerasa, capaz de actuar como el reactivo "retenido" o inactivo en un protocolo de inicio en caliente.

30 Una "formación de pares de bases de Watson-Crick" o simplemente "formación de pares de bases" se refiere a enlaces de hidrógeno "convencionales" dentro de una molécula de ácido nucleico bicatenaria. La formación de pares de bases de Watson-Crick es la unión por enlaces de hidrógeno entre adenina y timina, entre guanina y citosina, entre adenina y uracilo y entre análogos de estas bases.

35 Los términos "scorpion" o "tipo scorpion" indican una combinación de cebador-sonda unimolecular como se describe en Whitcombe *et al.*, (1999), "Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescent", Nature Biotech. 17: 804-807. Los cebadores scorpion o de tipo scorpion dentro de la intención de la presente invención incorporan los elementos típicos del scorpion, concretamente una parte de sonda, una parte de bucle de tallo y una parte de cebador. Un ejemplo de formato de cebador-sonda unimolecular "scorpion" o de "tipo scorpion" se ilustra esquemáticamente en la Fig. 7.

40 Como se ha mencionado anteriormente, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método de amplificación específica de alelo, que comprende (a) proporcionar una muestra, que posiblemente contiene al menos una variante de una secuencia diana; (b) proporcionar un primer oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de más de una variante de la secuencia diana; (c) proporcionar un segundo oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana, que tiene un nucleótido 3'-terminal complementario de solamente una variante de la secuencia diana; en el que dicho segundo oligonucleótido incorpora al menos un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico, en el que dicha base se selecciona de un grupo que consiste en N⁶-bencil-adenina, N⁶-para-*terc*-butil-bencil adenina, N²-alquil-guanina y N⁴-bencil-citosina; (d) proporcionar condiciones adecuadas para la hibridación de dichos primero y segundo oligonucleótidos a al menos una variante de la secuencia diana; (e) proporcionar condiciones adecuadas para la extensión de oligonucleótidos por un nucleótido que incorpora un biocatalizador; en el que dicho biocatalizador es capaz de extender dicho segundo oligonucleótido cuando hibrida con la variante de la secuencia diana para la que tiene dicho nucleótido 3' terminal complementario, y sustancialmente menos cuando dicho segundo oligonucleótido se hibrida con la variante de la secuencia diana para la que tiene un nucleótido 3' terminal no complementario; y opcionalmente (f) detectar el producto de dicha amplificación.

45 El segundo oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana, que tiene un nucleótido 3'-terminal complementario de solamente una variante de la secuencia diana se denomina "oligonucleótido selectivo", "cebador selectivo" o "cebador selectivo de alelo". El oligonucleótido selectivo de la presente invención comprende 10-50, más preferentemente 15-35 nucleótidos, la mayoría de ellos complementarios

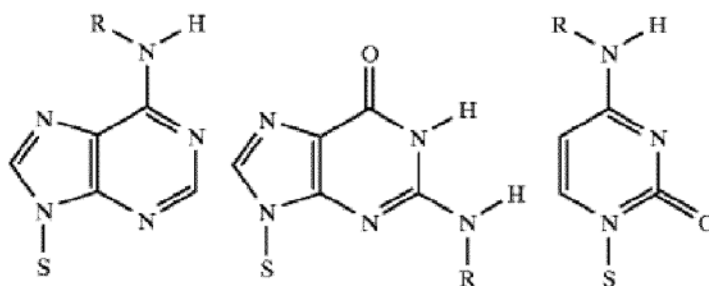
de una secuencia en más de una variante de la secuencia diana. El nucleótido 3' terminal del oligonucleótido es complementario de una variante de la secuencia diana, que se va a amplificar y no complementario de otras variantes. El oligonucleótido selectivo de la presente invención incluye uno o más nucleótidos con una base, covalentemente modificado en el grupo amino exocíclico. En realizaciones preferidas, el nucleótido de base modificada aparece entre 1 y 5, más preferentemente 3 nucleótidos cadena arriba del nucleótido 3' terminal (también designadas las posiciones -1, -2, -3, -4, -5 o N-1, N-2, N-3, N-4, N-5 en el presente documento). En otras realizaciones, el nucleótido de base modificada es el nucleótido 3' terminal. En algunas realizaciones, el nucleótido de base modificada aparece tanto en el extremo 3' terminal como al menos una vez más, en otra parte dentro del oligonucleótido.

El cebador específico de alelo de la presente invención puede incorporar diversos aspectos de diseño de cebadores conocidos en la técnica. Por ejemplo, el cebador puede tomar la forma de una combinación de cebador-sonda unimolecular denominada "scorpion" y descrita en Whitcombe *et al.*, (1999), "Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescent", Nature Biotech. 17: 804-807. El cebador scorpion diseñado de acuerdo con la presente invención incorpora los elementos típicos del scorpion, concretamente una parte de sonda, una parte de bucle de tallo y una parte de cebador. Además, en un scorpion diseñado de acuerdo con la presente invención, la parte de cebador tiene un extremo 3' complementario de la posición variante. La parte de cebador en un scorpion diseñado de acuerdo con la presente invención contiene uno o más nucleótidos modificados químicamente como se describe en el presente documento. Los nucleótidos con modificaciones covalentes de los grupos amino exocíclicos se han descrito en la Patente de Estados Unidos Nº 6.001.611. La síntesis de dichos nucleótidos, y oligonucleótidos que incorporan dichos nucleótidos también se describe en la patente 611.

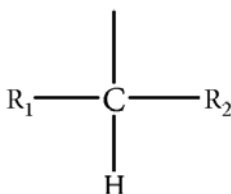
De acuerdo con la presente invención, una modificación adecuada del grupo amino exocíclico está relacionada con la presencia de las siguientes propiedades: (1) la modificación interfiere con pero no evita la formación de pares de bases de Watson-Crick de la base modificada con la base complementaria en el ácido nucleico bicatenario; (2) la modificación interfiere con pero no evita la extensión del cebador que contiene la base modificada por la ácido nucleico polimerasa; (3) la modificación permite la síntesis de la cadena complementaria de la cadena que incorpora la base modificada; y (4) la modificación aumenta la selectividad de un cebador que incorpora la modificación.

Los ejemplos de grupos amino exocíclicos incluyen los grupos amino en la posición 6 de adenosina, posición 2 de guanosina y posición 4 de citidina. Los grupos amino exocíclicos que forman parte de la formación de pares de bases con la cadena de ácido nucleico complementaria también pueden aparecer en diversas bases nitrogenadas no convencionales en nucleótidos. Los ejemplos de nucleósidos con bases no convencionales incluyen, sin limitación, 3-metiladenosina, 7-metilguanosina, 3-metilguanosina, 5-metilcitidina y 5-hidroximetilcitidina. Las modificaciones adecuadas de grupos amino exocíclicos de dichas bases no convencionales también pueden seleccionarse de acuerdo con el método de la presente invención.

Las estructuras de los nucleótidos modificados que contienen una base adenina, guanina y citosina modificada, respectivamente, se muestran a continuación



en las que S representa el resto de azúcar, y R representa el grupo modificador. Se prevé una diversidad de grupos modificadores, en los que dicha base se selecciona de un grupo que consiste en N⁶-bencil-adenina, N⁶-para-*terc*-butil-bencil adenina, N²-alquil-guanina y N⁴-bencil-citosina, que poseen las cuatro propiedades indicadas anteriormente. Se desvelan además grupos modificadores que tienen la estructura:



en la que R_1 y R_2 se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alcoxi, arilo sustituido o no sustituido y fenoxi.

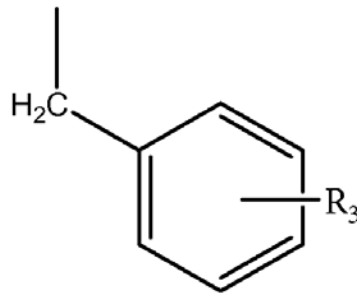
5 Los grupos alquilo pueden ser ramificados o no ramificados.

Los grupos alquilo pueden ser alquilos C_1 - C_{20} , por ejemplo alquilos C_1 - C_{10} .

Los grupos alcoxi pueden ser alcoxi C_1 - C_{20} , por ejemplo alcoxi C_1 - C_{10} .

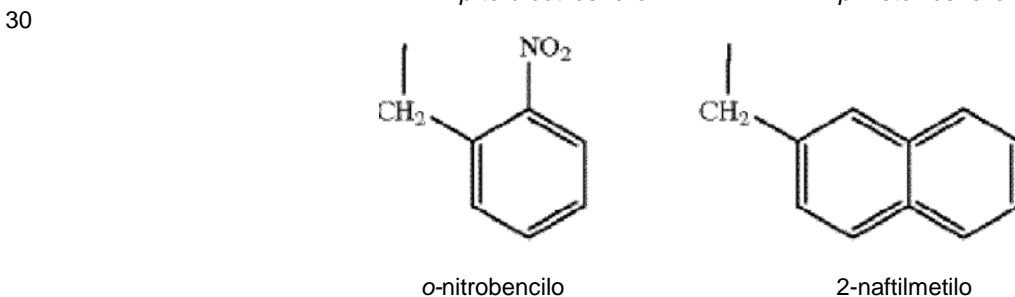
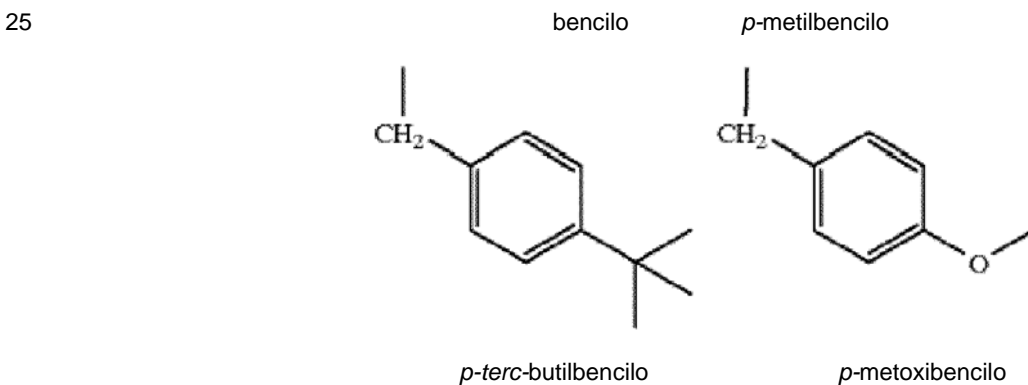
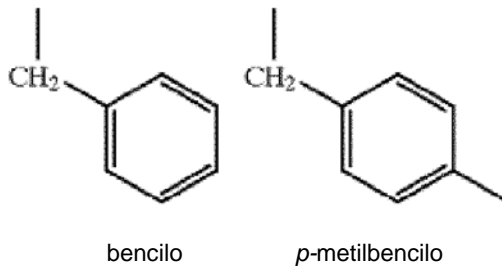
10 El arilo puede ser fenilo o naftilo sustituido o no sustituido.

También se desvelan nucleótidos en los que R es un grupo bencilo o un grupo bencilo sustituido. Los grupos bencilo sustituidos pueden tener la siguiente estructura:



15 en la que R_3 representa un grupo alquilo ramificado o no ramificado C_1 - C_6 , más preferentemente un grupo alquilo ramificado o no ramificado C_1 - C_4 , un grupo alcoxi o un grupo nitro. Preferentemente, R_3 está unido en la posición para.

20 Se desvelan también grupos modificadores representados por las estructuras mostradas a continuación:



En general, la selección empírica de un grupo modificador adecuado particular de la clase de compuestos descrita en el presente documento puede llevarse a cabo rutinariamente por un experto en la materia, basándose en la presencia de las cuatro propiedades enumeradas anteriormente. Preferentemente, la idoneidad de un grupo particular se determina empíricamente usando los cebadores con nucleótidos modificados en una reacción de amplificación específica de alelo. La idoneidad de la modificación se indica por la selectividad aumentada de la reacción utilizando un cebador con la modificación de base, en comparación con una reacción idéntica con un cebador no modificado. De acuerdo con la invención se proporcionan oligonucleótidos, en los que la base, modificada covalentemente en los grupos amino exocíclicos se selecciona de un grupo que consiste en N⁶-bencil-adenina, N⁶-para-*terc*-butil-bencil adenina, N²-alquil-guanina y N⁴-bencil-citosina.

En algunas realizaciones de la invención, la amplificación implica la reacción en cadena de la polimerasa, es decir, ciclos repetidos de desnaturalización del molde, atemperamiento (hibridación) del cebador oligonucleotídico con el molde, y extensión de cebador por el biocatalizador que incorpora nucleótidos. En algunas realizaciones, la hibridación y la extensión se producen en la etapa de la misma temperatura.

En algunas realizaciones, la reacción de amplificación implica un protocolo de inicio en caliente. En el contexto de amplificación específica de alelo, la selectividad de los cebadores específicos de alelo con respecto a la diana no coincidente puede potenciarse mediante el uso de un protocolo de inicio en caliente. Muchos protocolos de inicio en caliente se conocen en la técnica, por ejemplo, el uso de cera, que separa los reactivos críticos del resto de la mezcla de reacción (Patente de Estados Unidos N° 5.411.876), el uso de un ácido nucleico polimerasa, inactivada de forma reversible por un anticuerpo (Patente de Estados Unidos N° 5.338.671), un ácido nucleico polimerasa inactivada de forma reversible por un oligonucleótido que se diseña para unirse específicamente con su sitio activo (Patente de Estados Unidos N° 5.840.867) o el uso de un ácido nucleico polimerasa con modificaciones químicas reversibles, como se describe por ejemplo en las Patentes de Estados Unidos N° 5.677.152 y 5.773.528.

En algunas realizaciones de la invención, el ensayo de amplificación específico de alelo es el ensayo de PCR en tiempo real. En un ensayo de PCR en tiempo real, la medida de la amplificación es los "ciclos hasta el umbral" o valor Ct. Un valor Ct temprano refleja la rápida consecución del nivel de umbral y por lo tanto una amplificación más eficaz. El valor Ct tardío puede reflejar una amplificación ineficaz o inhibida. En el contexto de un ensayo de PCR en tiempo real específico de alelo, la diferencia en los valores de Ct entre los moldes coincidentes y no coincidentes es una medida de la diferenciación entre los alelos o la selectividad del ensayo.

El ensayo de amplificación específico de alelo puede emplear cualquier biocatalizador que incorpora nucleótidos adecuado conocido en la técnica. Para un ensayo de PCR específico de alelo, puede usarse cualquier biocatalizador que incorpore nucleótidos termoestables. En ocasiones es deseable usar una enzima sin la actividad correctora de errores (exonucleasa 3'-5'), tal como por ejemplo, ADN polimerasa Taq. También puede ser deseable y preferirse de acuerdo con la invención usar enzimas, que carecen sustancialmente o completamente de la actividad nucleasa 5'-3, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.795.762. Son ejemplos de dicha enzima la polimerasa Z05 y polimerasa ΔZ05. En ocasiones puede ser deseable tener una enzima con una capacidad de "inicio en caliente", tal como las enzimas modificadas de forma reversible descritas en las Patentes de Estados Unidos N° 5.677.152 y 5.773.528. Un ejemplo de una enzima de inicio en caliente es la polimerasa Gold ΔZ05.

Puede conseguirse detección de los productos de amplificación por cualquier método conocido en la técnica. Estos métodos incluyen el uso de cebadores y sondas marcados así como diversos colorantes de unión a ácido nucleico. Los medios de detección pueden ser específicos de una variante de la secuencia diana, o pueden ser genéricos de todas las variantes de la secuencia diana o incluso de todo el ADN bicatenario. Los métodos de detección no específicos pueden usarse cuando la amplificación de las variantes no deseadas de la diana sea mínima y se espere que quede por debajo del límite de detección del método.

Los productos de amplificación pueden detectarse después de haberse completado la amplificación, por ejemplo, por electroforesis en gel de los productos no marcados y tinción del gel con un colorante de unión a ácido nucleico. Como alternativa, los productos de amplificación pueden portar un marcador radiactivo o uno químico, bien en virtud de la incorporación durante la síntesis o en virtud de ser los productos de extensión de un cebador marcado. Después, o durante la electroforesis, los productos de amplificación marcados pueden detectarse con herramientas radiológicas o químicas adecuadas conocidas en la técnica. Después de la electroforesis, el producto también puede detectarse con una sonda específica de diana marcada por uno cualquier de los métodos conocidos en la técnica. La sonda marcada también puede aplicarse a la diana sin electroforesis, es decir, en un ensayo de "transferencia puntual" o similares.

En otras realizaciones, la presencia del producto de amplificación puede detectarse en un ensayo homogéneo, es decir un ensayo en el que se detecta el producto naciente durante los ciclos de amplificación, o al menos en el mismo tubo sin abrir y no se requiere manipulación postamplificación. Un ensayo de amplificación homogénea se ha descrito por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.210.015. El ensayo de amplificación homogéneo usando colorantes que se intercalan en ácido nucleico se ha descrito por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.871.908 y 6.56.627. El ensayo homogéneo también puede emplear sondas fluorescentes marcadas con dos

floróforos que interaccionan, tales como sondas de "baliza molecular" (Tyagi *et al.*, (1996) Nat. Biotechnol., 14: 303-308) o sondas de nucleasa marcadas con fluorescencia (Livak *et al.*, (1995) PCR Meth. Appl., 4: 357-362). En ciertas variaciones de estas tecnologías, un producto de amplificación también puede identificarse en virtud de su temperatura de fusión distintiva, véase Patentes de Estados Unidos N° 5.871.908 y 6.569.627. Los productos de amplificación también pueden detectarse usando una combinación de cebador-sonda unimolecular denominada "scorpion". Whitcombe *et al.*, (1999), "Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence", Nature Biotech. 17: 804-807. La parte de cebador del oligonucleótido scorpion puede ser un cebador específico de alelo diseñado de acuerdo con la presente invención.

Se desvela además una mezcla de reacción para amplificar específica o selectivamente una variante seleccionada de la secuencia diana, que comprende un primer oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de más de una variante de la secuencia diana, un segundo oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de más de una variante de la secuencia diana que tiene un nucleótido 3' terminal complementario de solamente una variante de la secuencia diana, en el que dicho segundo oligonucleótido incluye uno o más nucleótidos con una base, modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico, y un ácido nucleico diana, que se sabe que existe en más de una variante de secuencia. La mezcla de reacción puede comprender además los reactivos y soluciones generalmente necesarios para la amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo un biocatalizador que incorpora nucleótidos, precursores de ácido nucleico, es decir nucleósido trifosfatos e iones orgánicos e inorgánicos, adecuados para el apoyo de la actividad del biocatalizador que incorpora nucleótidos.

En otro aspecto, la invención proporciona kits para realizar amplificación específica de alelo de acuerdo con la invención. El kit incluye en general componentes específicos de ensayo así como componentes requeridos generalmente para realizar los ensayos de amplificación de ADN. Como los componentes específicos de ensayo, el kit de amplificación específico de alelo de la presente invención incluye típicamente al menos un oligonucleótido específico de alelo, al menos parcialmente complementario de más de una variante de la secuencia diana, que tiene un nucleótido 3' terminal complementario de solamente una variante de la secuencia diana y que tiene también uno o más nucleótidos con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico, en el que dicha base se selecciona de un grupo que consiste en N⁶-bencil-adenina, N⁶-para-*terc*-butil-bencil adenina, N²-alquil-guanina y N⁴-bencil-citosina, un segundo oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de más de una variante de la secuencia diana y, opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico de control que comprende una cantidad de al menos una variante de la secuencia diana de control, al menos parcialmente complementaria de los oligonucleótidos incluidos en el kit. En algunas realizaciones, puede incluirse más de una variante de la secuencia de ácido nucleico de control. Preferentemente entre las varias variantes de la secuencia de ácido nucleico de control incluidas en el kit, al menos una variante es complementaria del nucleótido 3' terminal del oligonucleótido selectivo de alelo. Como los componentes generalmente requeridos para la amplificación de ácido nucleico, el kit de la presente invención típicamente incluye uno o más de un biocatalizador que incorpora nucleótidos, precursores de ácido nucleico, tales como nucleósido trifosfatos (desoxirribonucleósido trifosfatos o ribonucleósido trifosfatos), opcionalmente, una pirofosfatasa para minimizar la pirofosforólisis de ácidos nucleicos, una uracilo *N*-glucosilasa (UNG) para protección contra contaminación de arrastre de reacciones de amplificación, reactivos previamente preparados y tampones necesarios para la reacción de amplificación y detección, y un conjunto de instrucciones para realizar amplificación específica de alelos de la presente invención.

En otro aspecto más, la invención proporciona un oligonucleótido para su uso en PCR específica de alelo. Un oligonucleótido típico para su uso en PCR específica de alelo de la presente invención comprende 10-50, más preferentemente 15-35 nucleótidos, la mayoría de ellos complementarios de una secuencia en más de una variante de la secuencia diana. Sin embargo, el nucleótido 3' terminal del oligonucleótido es complementario de una variante de la secuencia diana y no complementario de otras variantes. Además, el oligonucleótido de la presente invención incluye uno o más nucleótidos con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico, en el que dicha base se selecciona de un grupo que consiste en N⁶-bencil-adenina, N⁶-para-*terc*-butil-bencil adenina, N²-alquil-guanina y N⁴-bencil-citosina. El nucleótido de base modificada aparece entre 1 y 5 o, más preferentemente, por ejemplo, 1, 2, o 3 nucleótidos cadena arriba del nucleótido 3' terminal. En otras realizaciones, el nucleótido de base modificada aparece tanto en el extremo 3' como dentro del oligonucleótido. El oligonucleótido de la invención se caracteriza además por una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEC ID N°: 4, 5, 8, 11 y 13.

Sin quedar ligado a una teoría particular, los inventores plantean la hipótesis de que las modificaciones de bases covalentes de la presente invención, especialmente los grupos voluminosos, desestabilizan, pero no alteran completamente los enlaces de hidrógeno en el contexto de formación de pares de bases de Watson-Crick entre el cebador y el ácido nucleico molde. Cuando la modificación se combina con una base no complementaria en la misma posición o una cercana dentro del cebador (como en la variante no deseable o "no coincidente" de la secuencia diana), la debilidad combinada de los enlaces de hidrógeno desestabiliza el complejo de ácido nucleico diana-cebador en la medida en que la extensión del oligonucleótido por el biocatalizador que incorpora nucleótidos se inhibe parcial o completamente. Sin embargo, cuando la modificación de la base está presente sola, sin la base no complementaria (como en la variante deseable o "coincidente" de la secuencia diana, que se va a amplificar), el cebador se extiende eficazmente. La Figura 1 es un diagrama que ilustra la posición del polimorfismo y las

modificaciones de cebadores, y su papel para permitir la amplificación de la diana coincidente pero inhibir la amplificación de la diana no coincidente.

5 Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar al entendimiento de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

10 Los ejemplos a continuación utilizan una diana “coincidente” y una “no coincidente”. Como se usa en los ejemplos, la diana coincidente se diseña para que sea complementaria del cebador de amplificación específico de alelo. La diana no coincidente se diseña para tener una falta de coincidencia con el nucleótido 3’ terminal del cebador específico de alelo.

15 Como una diana coincidente, los ejemplos utilizan la mutación V600E del gen de BRAF humano. Esta mutación es un cambio de valina a glutamato del aminoácido 600, que resulta de una transición de timina (T) a adenina (A) en el nucleótido 1799 del gen de BRAF. La mutación se encuentra en muchos cánceres y se cree que contribuye a la progresión del cáncer, ya que da como resultado la activación constitutiva de la ruta MAPK. La detección de este cambio de un único nucleótido en una población de células tumorales tiene utilidad en el diagnóstico y tratamiento de cánceres humanos.

20 La diana mutante es “coincidente”, es decir, forma un par de Watson-Crick A-T con el nucleótido 3’ terminal de cada uno de los cebadores específicos de alelo (Tabla 1). La diana no coincidente es la secuencia de BRAF de tipo silvestre. La diana no coincidente forma una falta de coincidencia A-A con el nucleótido 3’ terminal de los cebadores específicos de alelo.

25

Tabla 1

Cebadores y sondas	
Cebadores específicos de alelo	
SEC ID N°: 3	5'-AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGA-3'
SEC ID N°: 4	5'-AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACXGA-3'
SEC ID N°: 5	5'-AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACYGA-3'
SEC ID N°: 7	5'-AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGY-3'
SEC ID N°: 8	5'-AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTYCAGY-3'
SEC ID N°: 10	5'-AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGX-3'
SEC ID N°: 11	5'-TAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTXCAGX-3'
Otros cebadores y sondas	
SEC ID N°: 6	5'-TAGCCTCAATTCTTACCATCCACAX-3'
SEC ID N°: 9	5'-FTCGATGGAGTQGGGTCCCATCAGTTTGAACACTTGTCTp-3'
X - N ⁶ -bencil-dA Y - N ⁶ -para- <i>terc</i> -butil-bencil-dA F - fluoróforo donante cx-FAM Q - Interruptor “Black Hole” BHQ-2 P - 3'-fosfato El nucleótido 3'-terminal corresponde a la posición variable en la diana	

Ejemplo 1

30 *Amplificación específica de alelo usando cebadores con modificaciones de bases internas*

En este ejemplo, estaban presentes dos variantes de la secuencia molde en cantidades iguales, una variante coincidente, complementaria de la secuencia del cebador y una variante no coincidente. La variante coincidente fue un ADN plasmídico con el inserto que incorpora la secuencia mutante de BRAF V600E (SEC ID N°: 1), mientras que la variante no coincidente era el mismo plásmido con la secuencia de tipo silvestre de BRAF (SEC ID N°: 2).

35

SEC ID N°: 1 (fragmento de secuencia mutante de BRAF V600E):

40 5'-AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAGAAATCTCGATGGAGTGGG
TCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCTA-3'

SEC ID N°: 2 (fragmento de secuencia de tipo silvestre de BRAF):

45 5'-AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTAAAATCTCGATGGAGTGGG
TCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCTA-3'

Los cebadores directos (SEC ID N°: 3, 4, 5) y el cebador inverso (SEC ID N°: 6) se muestran en la Tabla 1. Los cebadores contenían una N⁶-bencil-dA interna o una N⁶-para-*terc*-butil-bencil-dA interna cuando se indica.

5 Cada reacción de 100 µl contenía 10⁶ copias de cada diana, glicerol al 5 %, tricina 50 mM (pH 8,3), acetato potásico 25 mM (pH 7,5), 200 µM de cada uno de dATP, dCTP y dGTP, 400 µM de dUTP, 0,1 µM de uno de los cebadores directos (SEC ID N°: 3, 4 o 5), cebador inverso 0,7 µM (SEC ID N°: 6), colorante intercalador Syto-13 2 µM, DMSO al 1 %, 4 unidades de uracilo-N-glucosilasa (UNG), 10 unidades de polimerasa ΔZ05 y acetato magnésico 4 mM.

10 Se realizaron amplificación y análisis usando el instrumento Roche LightCycler 480. Las reacciones se sometieron al siguiente perfil de temperatura: 50 °C durante 5 minutos (etapa de UNG), 95 °C durante 10 minutos, seguido de 80 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 59 °C durante 40 segundos. Los datos de fluorescencia se recogieron al final de cada etapa de 59 °C.

15 Los resultados se muestran en la Figura 2. Los resultados de amplificación se expresan como un cambio en la fluorescencia en el intervalo de longitud de ondas de 450-500 nm. La selectividad de la amplificación se mide por la diferencia en el valor Ct (ΔCt) entre las dianas coincidentes y las no coincidentes. El ΔCt para cada experimento se indica en la Fig. 2. Los datos muestran que la variante coincidente (mutante) de la diana se amplificó selectivamente sobre la variante no coincidente (tipo silvestre). La selectividad se potenció por la modificación de bases de los nucleótidos en los cebadores.

20 *Ejemplo 2*

Amplificación específica de alelo usando cebadores con una o más modificaciones de bases 3' terminales e internas.

25 Para este experimento, se usaron las mismas dianas coincidente (mutante) y no coincidente (tipo silvestre) que en el Ejemplo 1. Los cebadores contenían modificaciones de bases en una posición interna, posición 3' terminal o ambas.

30 Cada reacción de 100 µl contenía 10⁶ copias de cada diana, glicerol al 5 %, tricina 50 mM (pH 8,3), acetato potásico 90 mM (pH 7,5), 200 µM de cada dATP, dCTP y dGTP, dUTP 400 µM, 0,5 µM de uno de los cebadores directos (SEC ID N°: 3, 5, 7 u 8), cebador inverso 0,5 µM (SEC ID N°: 6), sonda fluorogénica 0,2 µM (SEC ID N°: 9), DMSO al 1 %, 4 unidades de uracilo-N-glucosilasa (UNG), 10 unidades de polimerasa Z05 y acetato magnésico 5 mM.

35 Se realizaron amplificación y análisis usando el instrumento Roche LightCycler 480. Las reacciones se sometieron al siguiente perfil de temperatura: 50 °C durante 5 minutos (etapa UNG), 95 °C durante 10 minutos, seguido de 60 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 59 °C durante 40 segundos. Se recogieron datos de fluorescencia al final de cada etapa de 59 °C.

40 Los resultados se muestran en la Figura 3 en el mismo formato que los resultados del Ejemplo 1, excepto que la fluorescencia se mide en el intervalo de longitudes de onda de 483-553 nm. Los datos demuestran que las modificaciones de bases del cebador mejoran la selectividad del ensayo de amplificación, y varias bases modificadas pueden tener un efecto acumulativo en la selectividad.

Ejemplo 3

Amplificación específica de alelo usando un cebador con una modificación de bases y diversas ADN polimerasas.

45 En este ejemplo, se amplificaron las mismas dianas coincidente (mutante) y no coincidente (tipo silvestre) que en el Ejemplo 1, usando un cebador con una única modificación de base interna. La amplificación se llevó a cabo en presencia de polimerasa Z05, ΔZ05 o ΔZ05-Gold.

50 Las reacciones de Z05 contenían 10⁶ copias de cada molde, glicerol al 5 %, tricina 50 mM (pH 8,3), acetato potásico 90 mM (pH 7,5), 200 µM de cada uno de dATP, dCTP y dGTP, dUTP 400 µM, cebador directo 0,5 µM (SEC ID N°: 5), cebador inverso 0,5 µM (SEC ID N°: 6), colorante de intercalación Syto-13 2 µM, DMSO al 1 %, 4 unidades de uracilo-N-glucosilasa (UNG), 10 unidades de polimerasa Z05 y acetato magnésico 5 mM en 100 µl.

55 Las reacciones de ΔZ05 contenían 10⁶ copias de cada molde, glicerol al 5 %, tricina 50 mM (pH 8,3), acetato potásico 25 mM (pH 7,5), 200 µM de cada uno de dATP, dCTP y dGTP, dUTP 400 µM, cebador directo 0,1 µM (SEC ID N°: 5), cebador inverso 0,7 µM (SEC ID N°: 6), colorante de intercalación Syto-13 2 µM, DMSO al 1 %, 4 unidades de uracilo-N-glucosilasa (UNG), 10 unidades de polimerasa ΔZ05 y acetato magnésico 4 mM en 100 µl.

60 Las reacciones de ΔZ05-Gold contenían 10⁶ copias de cada molde, glicerol al 8 %, tricina 50 mM (pH 8,3), acetato potásico 45 mM (pH 7,5), 200 µM de cada uno de dATP, dCTP y dGTP, dUTP 400 µM, cebador directo 0,1 µM (SEC ID N°: 5), cebador inverso 0,7 µM (SEC ID N°: 6), colorante de intercalación Syto-13 2 µM, DMSO al 1 %, 2 unidades de uracilo-N-glucosilasa (UNG), 60 unidades de polimerasa ΔZ05-Gold y acetato magnésico 3 mM en 100 µl.

Los resultados se muestran en la Figura 4 en el mismo formato que los resultados del Ejemplo 2. Los datos demuestran la capacidad relativa de cada enzima para realizar amplificación selectiva de alelo usando cebadores de bases modificadas.

5 *Ejemplo 4*

Amplificación específica de alelo usando cebadores de bases modificadas en presencia de cantidades excesivas de molde no coincidente.

10 En este ejemplo, se usaron las mismas dianas coincidente (mutante) y no coincidente (tipo silvestre) que en el Ejemplo 1. Las dianas se amplificaron usando un cebador con una única modificación de alquilo interno. Para simular las muestras clínicas, las reacciones contenían un número de copias extremadamente bajo de la diana mutante (coincidente) sola o en presencia de un gran exceso de la diana de tipo silvestre (no coincidente). En una reacción separada, estaba presente una gran cantidad de la diana no coincidente sin ninguna diana coincidente.

15 Las reacciones de 100 μ l contenían la cantidad indicada de ADN diana, glicerol al 8 %, tricina 50 mM (pH 7,7), acetato potásico 45 mM (pH 7,5), 200 μ M de cada uno de dATP, dCTP y dGTP, dUTP 400 μ M, cebador directo 0,1 μ M (SEC ID N^o: 5), cebador inverso 0,7 μ M (SEC ID N^o: 6), sonda fluorogénica 0,2 μ M (SEC ID N^o: 9), DMSO al 1 %, 2 unidades de uracilo-N-glucosilasa (UNG), 60 unidades de polimerasa Δ Z05-Gold y acetato magnésico 3 mM.

20 Los resultados se muestran en la Figura 5 en el mismo formato que los resultados del Ejemplo 2. Los datos demuestran que en las condiciones ejemplares, la amplificación es específica de la diana coincidente, independientemente de la presencia o cantidad relativa de la diana no coincidente.

25 *Ejemplo 5*

Amplificación específica de alelo usando cebadores de tipo Scorpion ARMS con modificaciones de bases internas

TABLA 3

SEC ID Nº	FUNCION	SECUENCIA DE CEBADORES
3	CEBADOR DIRECTO	5'-AGTAAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGA-3'
12	CEBADOR DIRECTO, SONDA	5'-FCCC GCCGGACCCACTCCATCGAGCGCGGGQJAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGA-3'
5	CEBADOR DIRECTO	5'-AGTAAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACYGA-3'
13	CEBADOR DIRECTO, SONDA	5'-FCCC GCCGGACCCACTCCATCGAGCGCGGGQJAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACYGA-3'
14	CEBADOR INVERSO	5'-TAGCCTCAATTCCTACCATCCACAX-3'
15	SONDA	5'-FTCTCGATGGAGTGGGTCCQp-3'

X - N^o-bencil-dA
 Y - N^o-para-*terc*-butil-bencil-dA
 F – Fluoróforo donante cx-FAM
 Q – Interruptor "Black Hole" BHQ-2
 J - HEG
 P - 3'-fosfato
 * El nucleótido selectivo de alelo está subrayado (posición N o N-1 desde el extremo 3' terminal)

- En este ejemplo, estaban presentes dos variantes de la secuencia molde en cantidades iguales, una variante coincidente, complementaria de la secuencia del cebador y una variante no coincidente. La variante coincidente era un ADN plasmídico con el inserto que representaba la secuencia mutante de BRAF V600E (SEC ID N°: 1), mientras que la variante no coincidente era el mismo plásmido con la secuencia de tipo silvestre de BRAF (SEC ID N°: 2). Los cebadores directos (SEC ID N°: 3, 5, 12 y 13) y cebador inverso (SEC ID N°: 14) son como se describe en la Tabla 3. Los cebadores de ASPCR, directos, se diseñaron con el SNP en la posición 3' terminal, bien con o sin modificación de N6-*terc*-butil-bencil-dA. El cebador de ASPCR se empareja con una sonda de detección cadena arriba (SEC ID N°: 15) o se une con el complemento de sonda en un formato de tipo Scorpion cerrado.
- 10 Cada reacción de 50 μ l contenía 10^5 copias de una de las dianas, glicerol al 5 %, tricina 50 mM (pH 8,3), acetato potásico 150 mM (pH 7,5), 200 μ M de cada uno de dATP, dCTP y dGTP, dUTP 400 μ M, cebador directo 0,4 μ M, cebador inverso 0,4 μ M, DMSO al 1 %, 2 unidades de uracilo-N-glucosilasa (UNG), 10 unidades de polimerasa Z05 y acetato magnésico 3 mM. Se añadió sonda de detección 0,2 μ M a reacciones que contenían los cebadores 3 y 5 cuando el complemento de sonda no estaba ligado al cebador directo.
- 15 Se realizó amplificación y análisis usando el instrumento Roche LightCycler 480: Las reacciones se sometieron al siguiente perfil de temperaturas: 50 °C durante 5 minutos (etapa de UNG) seguido de 95 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 59 °C durante 40 segundos. Los datos de fluorescencia se recogieron en el intervalo de 495-525 nm al final de cada etapa de hibridación/extensión de 59 °C.
- 20 Los resultados se muestran en la Figura 6 y la Tabla 4. La selectividad de la amplificación se mide por la diferencia en el valor de Ct (Δ Ct) entre las dianas coincidente y la no coincidente. Δ Ct para cada experimento se indica en cada diagrama y se resume en la Tabla 4. Los datos muestran que la variante coincidente (mutante) de la diana se amplificó de forma selectiva sobre la variante no coincidente (tipo silvestre) usando bien el cebador y la sonda individuales o bien el cebador y la sonda ligados en un formato de tipo Scorpion cerrado.
- 25

TABLA 4

SEC ID Nº	SECUENCIA DE CEBADOR	POSICIÓN DEL NUCLEÓTIDO SELECTIVO	FORMATO DE CEBADOR	MODIFICACIÓN DEL SEGMENTO DE CEBADO	CT _{MEDIA} WT	CT _{MEDIA} MUT	ΔCT
3	AGTAAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCT ACAGA	extremo 3' terminal	Tradicional	ninguna	31,6	30,2	1,4
12	FCCCGCGGGGACCCACTCCATCGAGAG CGCGGGQJAGTAAAAAATAGGTGATTTT GGTCTAGCTACAGA	extremo 3' terminal	Scorpion ARMS	ninguna	34,7	29,2	5,5
5	AGTAAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCT ACYGA	extremo 3' terminal	Tradicional	Y en N-2	38,1	29,5	8,6
13	FCCCGCGGGGACCCACTCCATCGAGAG CGCGGGQJAGTAAAAAATAGGTGATTTT GGTCTAGCTACYGA	extremo 3' terminal	Scorpion ARMS	Y en N-2	51,4	32,6	18,8

REIVINDICACIONES

1. Un método de amplificación específica de alelo de una variante de una secuencia diana, que existe en forma de varias secuencias variantes, que comprende
- 5
- (a) proporcionar una muestra, que contiene posiblemente al menos una variante de una secuencia diana;
 - (b) proporcionar un primer oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana;
 - (c) proporcionar un segundo oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana, que tiene un nucleótido 3' terminal complementario de solamente una variante de la secuencia diana; en el que dicho segundo oligonucleótido incorpora al menos un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico, en el que dicha base se selecciona de un grupo que consiste en N⁶-bencil-adenina, N⁶-para-*terc*-butil-bencil adenina, N²-alquil-guanina y N⁴-bencil-citosina;
 - (d) proporcionar condiciones adecuadas para la hibridación de dichos primero y segundo oligonucleótidos con al menos una variante de la secuencia diana; y
 - (e) proporcionar condiciones adecuadas para la extensión de oligonucleótido por un biocatalizador que incorpora nucleótidos; en el que dicho biocatalizador es capaz de extender dicho segundo oligonucleótido cuando se hibrida con la variante de la secuencia diana para la que tiene dicho nucleótido 3' terminal complementario, y sustancialmente menos cuando dicho segundo oligonucleótido hibrida con la variante de la secuencia diana para la que tiene un nucleótido 3' terminal no complementario.
- 10
2. El método de la reivindicación 1, en el que el nucleótido que tiene una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico se localiza en las posiciones -5, -4, -3, -2 o -1 en relación con el extremo 3' del segundo oligonucleótido.
- 25
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho biocatalizador que incorpora nucleótidos en la etapa (e) es capaz de extender dicho segundo oligonucleótido, exclusivamente cuando dicho oligonucleótido hibrida con la variante de la secuencia diana con la que tiene dicho nucleótido 3' terminal complementario.
- 30
4. El método de la reivindicación 1, en el que dicho biocatalizador que incorpora nucleótidos se selecciona de un grupo que consiste en ADN polimerasa Taq, ADN polimerasa Z05, ADN polimerasa ΔZ05 y ADN polimerasa ΔZ05-Gold.
- 35
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia diana es SEC ID N^o: 1 y/o SEC ID N^o: 2.
6. El método de la reivindicación 1, en el que dicho segundo oligonucleótido tiene un formato scorpion o tipo scorpion.
- 40
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicho primer oligonucleótido es SEC ID N^o: 6 y/o dicho segundo oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en SEC ID N^o: 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11; 12 y 13.
- 45
8. Un método para detectar una variante de una secuencia diana en una muestra, que existe en forma de varias secuencias variantes que comprende
- (a) hibridar un primer y segundo oligonucleótidos con al menos una variante de la secuencia diana; en el que el primer oligonucleótido es al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y el segundo oligonucleótido es al menos parcialmente complementario de una o varias variantes de la secuencia diana y tiene un nucleótido 3' terminal complementario de solamente una variante de la secuencia diana, incorporando dicho segundo oligonucleótido al menos un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico, en el que dicha base se selecciona de un grupo que consiste en N⁶-bencil-adenina, N⁶-para-*terc*-butil-bencil adenina, N²-alquil-guanina y N⁴-bencil-citosina;
 - (b) extender el segundo oligonucleótido con un biocatalizador que incorpora nucleótidos; en el que dicho biocatalizador es capaz de extender de forma detectable solamente el oligonucleótido, hibridado con la variante de la secuencia diana para la que tiene dicho nucleótido 3' terminal complementario; y
 - (c) detectar los productos de dicha extensión del segundo oligonucleótido, en el que la extensión indica la presencia de la variante de una secuencia diana con la que el oligonucleótido tiene un nucleótido 3' terminal complementario.
- 50
- 55
9. Un kit para amplificación específica de alelo de una secuencia diana, que existe en forma de varias secuencias variantes, que comprende
- (a) un primer oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana;
 - (b) un segundo oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y que tiene un nucleótido 3' terminal complementario de solamente una variante de la secuencia diana; en
- 60
- 65

el que dicho segundo oligonucleótido incorpora al menos un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico, en el que dicha base se selecciona de un grupo que consiste en N⁶-bencil-adenina, N⁶-para-*terc*-butil-bencil adenina, N²-alquil-guanina y N⁴-bencil-citosina; y

5 (c) un biocatalizador que incorpora nucleótidos, nucleósido trifosfatos, tampón adecuado para la extensión de ácidos nucleicos por biocatalizadores que incorporan nucleótidos y un conjunto de instrucciones para realizar amplificación específica de alelo.

10. Un oligonucleótido para realizar una amplificación específica de alelo de una secuencia diana, que existe en forma de varias secuencias variantes, que comprende

- 10
- una secuencia al menos parcialmente complementaria de una parte de una o más variantes de dicha secuencia diana;
 - un nucleótido 3' terminal que es complementario de solamente una variante de dicha secuencia diana;
 - al menos un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico, en el que dicho nucleótido modificado se localiza en las posiciones -5, -4, -3, -2 o -1 en relación con el nucleótido 3' terminal, en el que dicha base se selecciona de un grupo que consiste en N⁶-bencil-adenina, N⁶-para-*terc*-butil-bencil adenina, N²-alquil-guanina y N⁴-bencil-citosina; y
 - que tiene una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEC ID N^o: 4, 5, 8, 11 y 13.
- 15

FIGURA 1

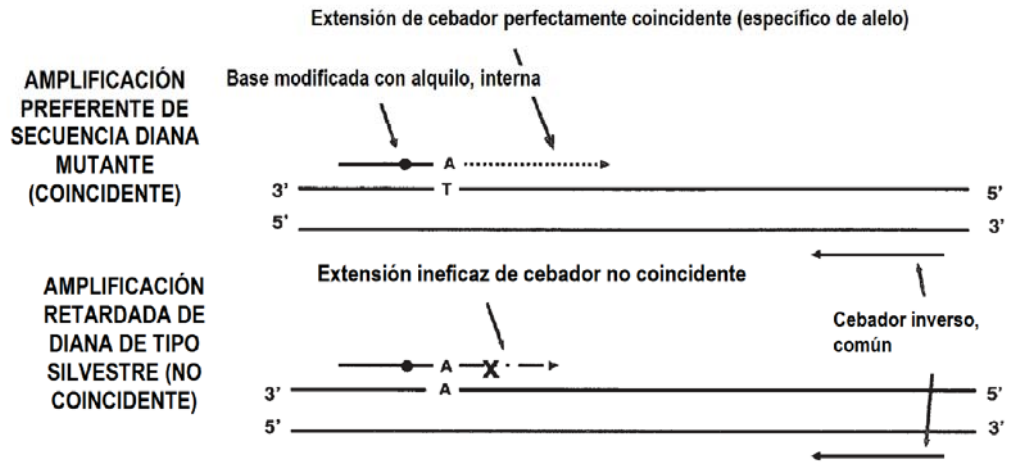


FIGURA 2

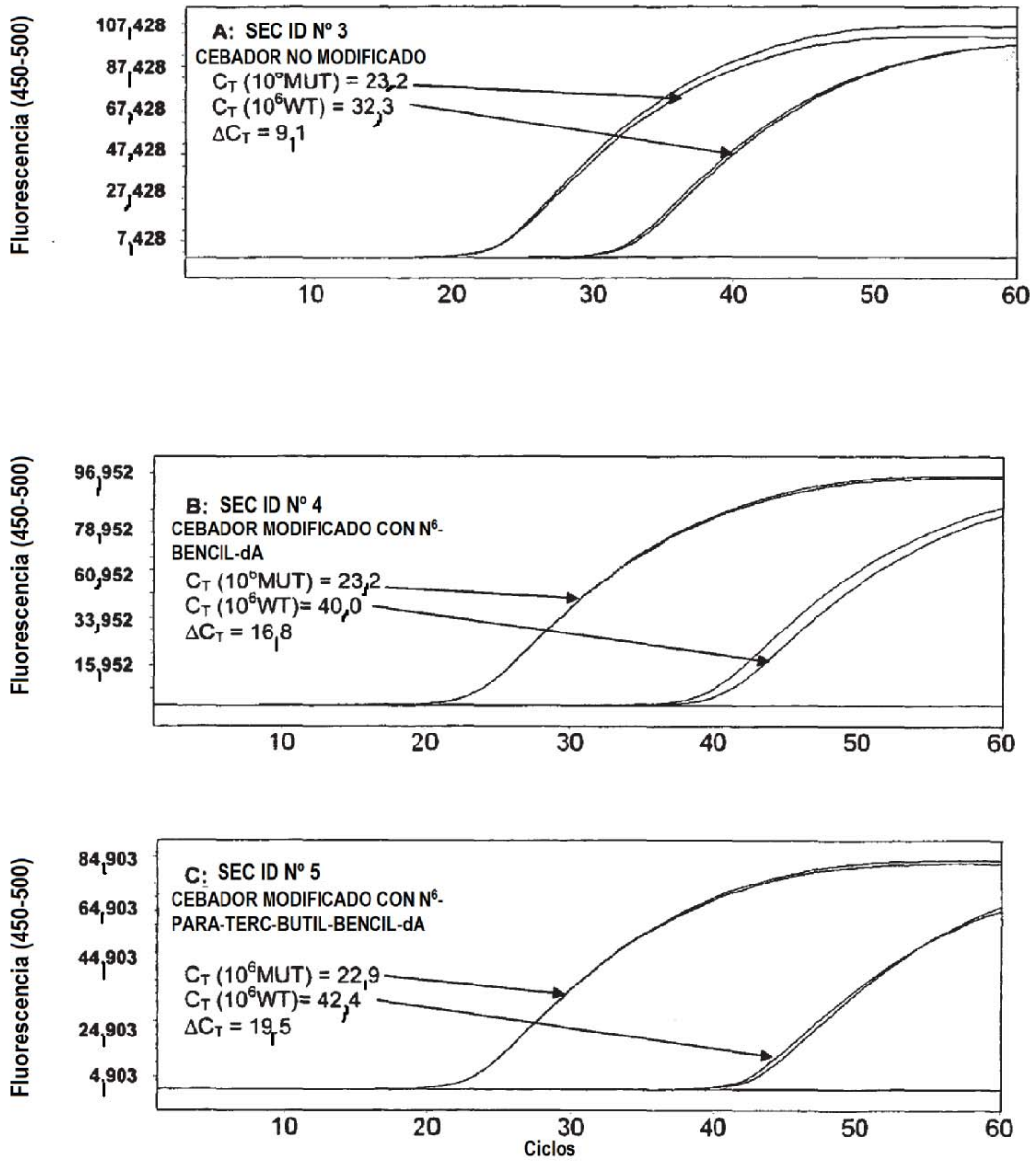


FIGURA 3

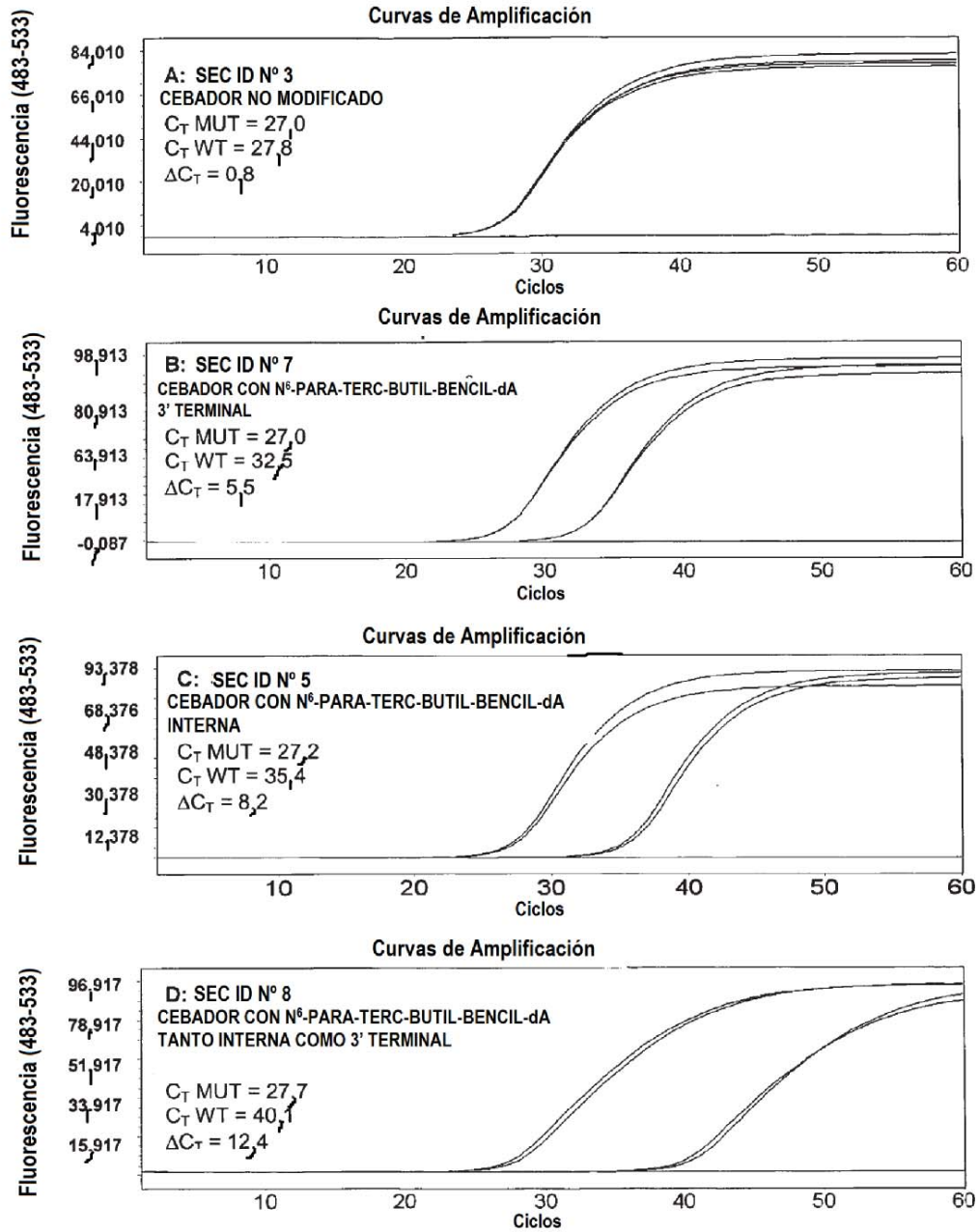


FIGURA 4

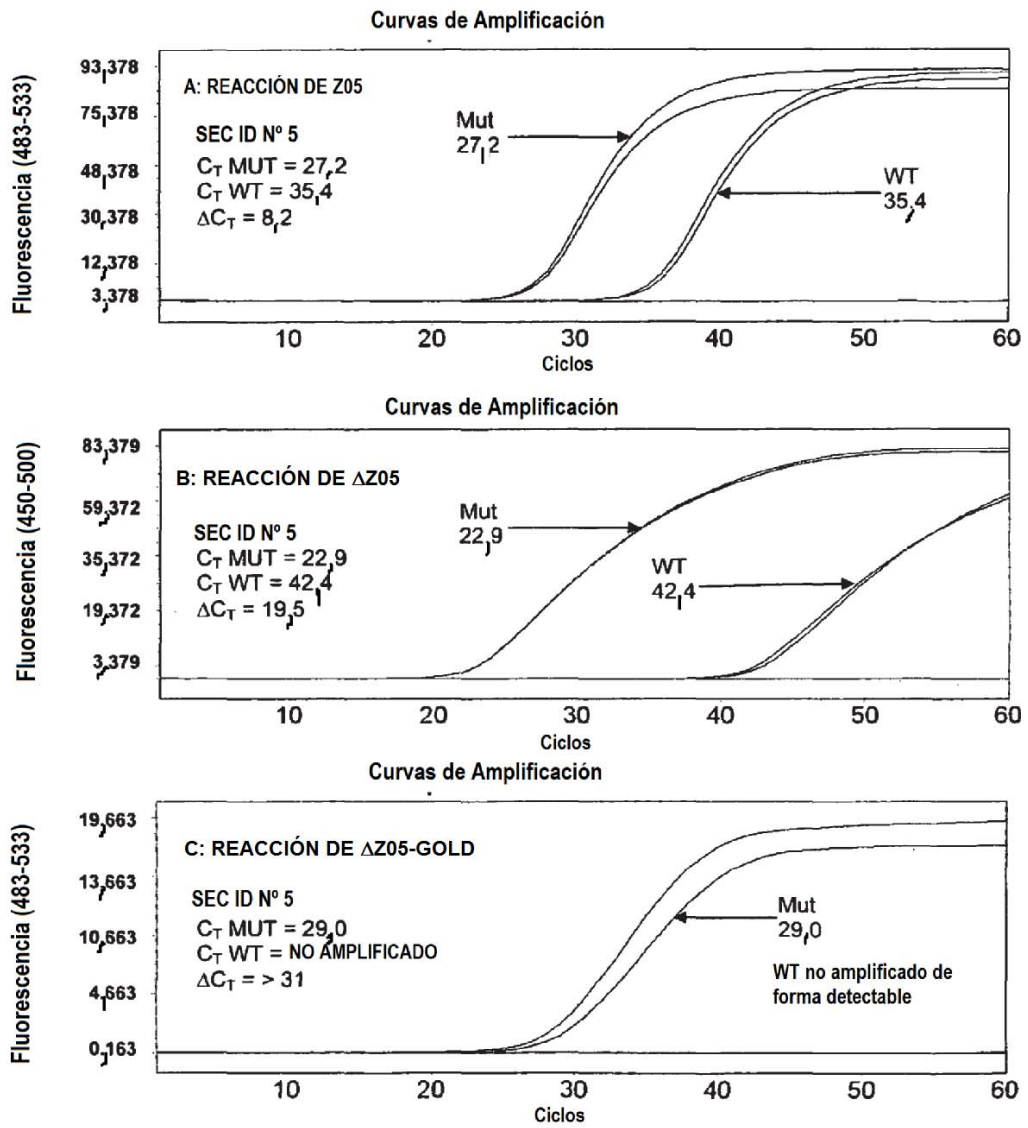


FIGURA 5

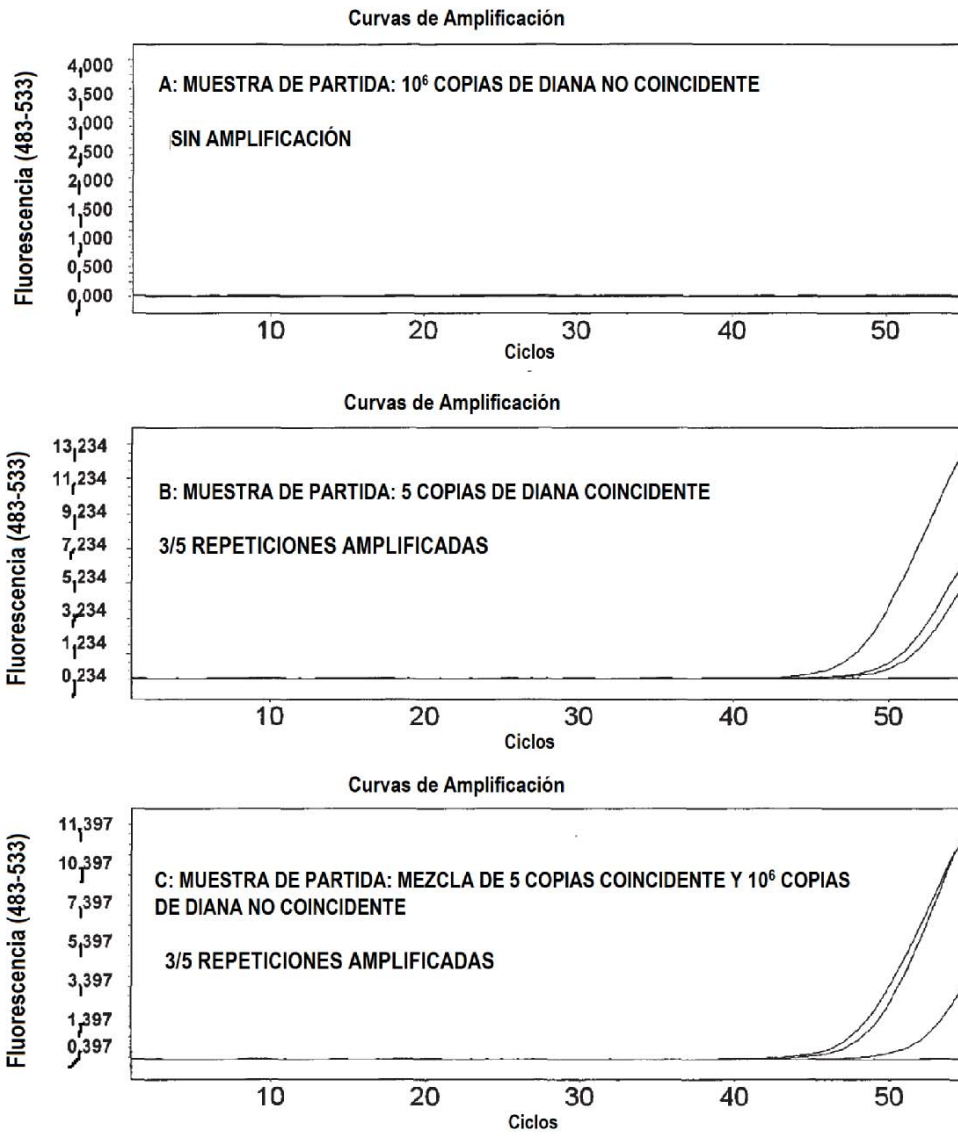


FIGURA 6

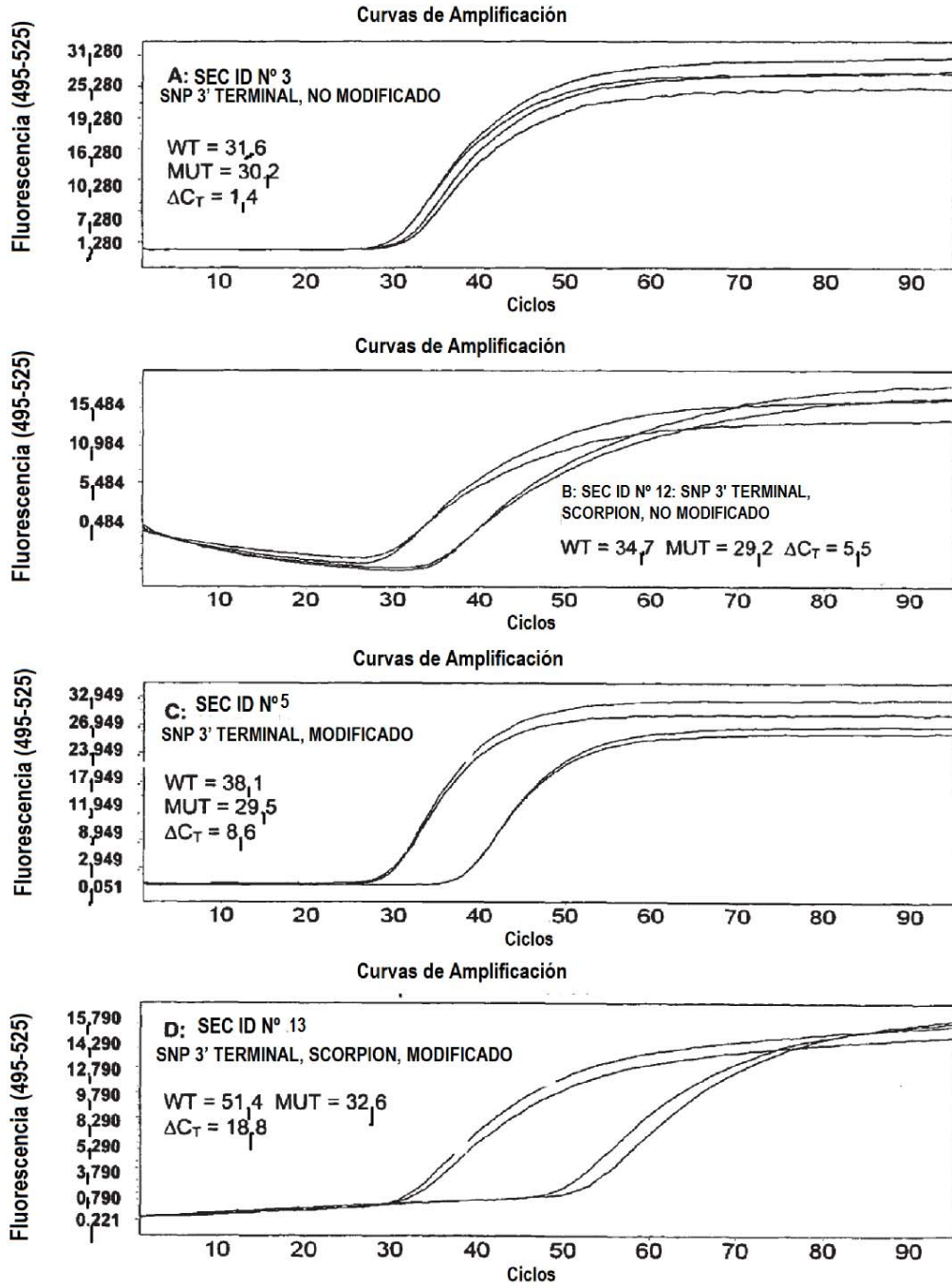


FIGURA 7

RAMAS DE SCORPION (FORMATO CERRADO, UNIMOLECULAR)

