

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 273**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010 E 10795240 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2510117**

54 Título: **Amplificación de ácidos nucleicos específica de alelo**

30 Prioridad:

11.12.2009 US 285690 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TSAN, ALISON;
NEWTON, NICOLAS y
WILL, STEPHEN G.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 530 273 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 de ácidos nucleicos específica de alelo.

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La invención se refiere al campo de la amplificación de ácidos nucleicos y, específicamente, al campo de la amplificación específica de alelo.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

La amplificación de ácidos nucleicos específica de alelo permite la amplificación y análisis de la secuencia diana de forma simultánea. La amplificación específica de alelo se utiliza normalmente cuando el ácido nucleico diana tiene una o más variaciones (polimorfismos) en su secuencia. Los polimorfismos de ácido nucleico que se utilizan en el análisis del perfil de DNA (medicina forense, pruebas de paternidad, tipificación de tejidos para trasplantes de órganos), cartografía genética, distinguiendo entre las cepas patógenas de microorganismos, así como la detección de mutaciones raras, tales como las que ocurren en las células cancerosas, existente células con DNA normal.

US200707717118 A1 describe el uso de un cebador específico de alelo que tiene en su extremo 3' una base que es complementaria a la base variante predicha en la secuencia diana. WO03072814 A2 describe el uso de cebadores discriminatorios que tienen uno o más nucleótidos sustituidos, en la posición 4' de la (desoxi)ribosa, para llevar a cabo una PCR específica de alelo.

En una amplificación específica de alelo con éxito, la variante deseada del ácido nucleico diana se amplifica, mientras que las otras variantes no se amplifican, al menos no a un nivel detectable. Un ensayo típico de amplificación específica de alelo implica una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con al menos un cebador específico de alelo diseñado de tal manera que la extensión del cebador sólo se produce cuando el cebador forma un híbrido con la variante deseada de la secuencia diana. Cuando el cebador hibrida con una variante no deseada de la secuencia diana, la extensión del cebador se inhibe.

Se han propuesto muchas formas de aumentar la especificidad de alelo de los cebadores. Sin embargo, para muchas dianas de ácido nucleico clínicamente relevantes, la falta de especificidad de la PCR sigue siendo un problema. Por lo tanto son necesarios enfoques radicalmente nuevos para el diseño de cebadores específicos de alelo.

35 **RESUMEN DE LA INVENCIÓN**

La invención se refiere a un método de amplificación específica de alelo de una variante de una secuencia diana, la diana existe en forma de varias secuencias variantes, oligonucleótidos, equipos y mezclas de reacción para los mismos como se define por las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra los resultados de la amplificación específica de alelo utilizando diversas polimerasas de ácidos nucleicos y cebadores con nucleótidos selectivos internos de acuerdo con la presente invención.

La Figura 2 muestra los resultados de la amplificación específica de alelo utilizando diversas polimerasas de ácidos nucleicos y con diversos cebadores con nucleótidos selectivos 3' como control.

La Figura 3 muestra los resultados de la amplificación específica de alelo utilizando diversas polimerasas de ácidos nucleicos y diversos cebadores con nucleótidos selectivos internos de acuerdo con la presente invención, incluyendo cebadores que tienen un formato ARMS escorpión.

La figura 4 muestra una representación esquemática de la estructura de un formato de ARMS escorpión que se puede utilizar de acuerdo con la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**Definiciones**

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Al describir y reivindicar la presente invención, se utilizarán las siguientes definiciones.

65 El término "ácido nucleico" se refiere a polímeros de nucleótidos (por ejemplo, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de nucleótidos, etc.) y comprenden ácidos desoxirribonucleicos (DNA), ácidos

ribonucleicos (RNA), híbridos DNA-RNA, oligonucleótidos, polinucleótidos, aptámeros, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), conjugados de PNA-DNA, conjugados de PNA-RNA, etc., que comprenden los nucleótidos covalentemente unidos entre sí, ya sea en forma lineal o ramificada. Un ácido nucleico normalmente es de cadena sencilla o de doble cadena y generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, se incluyen análogos de ácidos nucleicos 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 la Patente US No. 5.644.048.), fosforoditioato (Briu et al (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321), uniones O-metilfosforoamidita (ver Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: a Practical Approach*, Oxford University Press (1992)), y el esqueleto peptídico de ácidos nucleicos y enlaces (véase, Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895). Estas modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato pueden realizarse para facilitar la adición de porciones adicionales, tales como marcajes, o para alterar la estabilidad y la vida media de este tipo de moléculas en entornos fisiológicos.

Además de las bases heterocíclicas naturales que se encuentran típicamente en los ácidos nucleicos (por ejemplo, adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), los análogos de nucleótidos pueden incluir también bases heterocíclicas no naturales, tales como las descritas en, por ejemplo, Seela et al. (1999) *Helv. Chim. Acta* 82: 1640. Ciertas bases utilizadas en análogos de nucleótidos actúan como modificadores de la temperatura de fusión (T_m). Por ejemplo, algunos de estos incluyen 7-deazapurinas (por ejemplo, 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, etc.), pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinilo-dN (por ejemplo, propinilo-dU, propinilo-dC, etc.), y similares. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 5.990.303. Otras bases heterocíclicas representativas incluyen, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina; derivados de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; derivados 7-deaza-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-etiluracilo; 5-propiniluracilo, y similares.

Un "molde de ácido nucleico", "molde" o "diana" se refiere a un ácido nucleico de interés al que un cebador puede hibridarse y extender en condiciones adecuadas. En el contexto de la amplificación del ácido nucleico, la "diana" es preferiblemente una región de ácido nucleico, que consiste de las secuencias al menos parcialmente complementarias con al menos dos secuencias de cebador y una secuencia de intervención. (Si la diana es un ácido nucleico de cadena sencilla, consiste en una secuencia al menos parcialmente complementaria a un cebador y una secuencia al menos parcialmente idéntica al segundo cebador). Los moldes de ácidos nucleico pueden existir como fragmentos de ácido nucleico aislados o ser una parte de un fragmento de ácido nucleico más grande. Los ácidos nucleicos diana pueden derivar o aislarse desde prácticamente cualquier fuente, como microorganismos cultivados, microorganismos no cultivados, mezclas biológicas complejas, tejidos, sueros, tejidos o muestras antiguas o preservadas, aislados del medio ambiente o similares. Además, los moldes de ácidos nucleicos opcionalmente incluyen o derivan a partir de DNAc, RNA, DNA genómico, DNA genómico clonado, bibliotecas de DNA genómico, DNA fragmentado enzimáticamente o RNA, DNA fragmentado químicamente o RNA, DNA o RNA físicamente fragmentado, o similares. Los moldes de ácidos nucleicos también pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la materia.

Un "oligonucleótido" se refiere a un polímero de ácido nucleico que incluye al menos dos, pero normalmente 5-50 nucleótidos y más normalmente, entre 15 y 35 nucleótidos. Los oligonucleótidos pueden prepararse por cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la clonación y digestión de restricción de secuencias apropiadas, o síntesis química directa por un método tal como el método del fosfotriéster de Narang et al. (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 90-99; el método del fosfodiéster de Brown et al. (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 109-151; el método de dietilfosforamidita de Beaucage et al. (1981) *Tetrahedron Lett.* 22: 1859-1862; el método del triéster de Matteucci et al. (1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103: 3185-3191; métodos de síntesis automatizados; el método de soporte sólido de la Patente de EE.UU. No. 4.458.066 o cualquier otro método químico conocido en la técnica.

Un "cebador" es un oligonucleótido que puede hibridarse a un molde de ácido nucleico y permite la extensión o elongación de la cadena usando una polimerasa de nucleótidos. Aunque se utilizan a veces otras longitudes de cebadores, los cebadores normalmente oscilan entre 15 y 35 nucleótidos. Los cebadores cortos generalmente forman híbridos suficientemente estables con moldes de ácidos nucleicos a temperaturas más frías. Un cebador no necesita ser perfectamente complementario a los moldes de ácidos nucleicos para que se produzca la extensión. Un cebador que es al menos parcialmente complementario al molde de ácido nucleico es capaz de hibridarse normalmente con el molde de ácido nucleico para que se produzca la extensión. Un cebador de ácido nucleico puede marcarse, si se desea, mediante la incorporación de un marcador detectable por técnicas radiológicas, espectroscópicas, fotoquímicas, bioquímicas, inmuoquímicas o químicas.

Un "cebador específico de alelo" es un cebador que puede hibridar con varias variantes del molde de ácido nucleico, pero permite la elongación mediante la polimerasa cuando se hibrida con sólo algunas de las variantes de molde de ácido nucleico. Con otras variantes del molde de ácido nucleico el híbrido cebador-molde no puede extenderse o se extiende menos eficientemente por la polimerasa.

Los ácidos nucleicos son "extendidos" o "elongados" cuando se incorporan nucleótidos adicionales a los ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante la incorporación de un biocatalizador de nucleótidos, en el extremo 3' de un ácido nucleico.

5 Un ensayo de amplificación es "selectivo" o "selectivo de alelo" si produce predominio (es decir, una mayoría, pero menos de 100%) de un producto sobre otros productos posibles. Un ensayo se describe como "selectivo de alelo" siempre y cuando la amplificación de la variante no deseada (mal emparejada) de la secuencia diana es detectable. Se utiliza el término "específico" o "específico de alelo" con respecto al ensayo de amplificación si uno de los posibles productos se forma exclusivamente. Un ensayo en el que la amplificación de la diana no deseada es indetectable se denomina "específica de alelo". Sin embargo, se entiende que a medida que los métodos de detección se vuelven más sensibles, algunos ensayos conocidos previamente por ser específicos de alelo, se vuelven selectivos de alelo, es decir, cierta amplificación de variantes no deseadas de la diana son detectables. Por lo tanto, en el contexto de esta invención, el término "específico de alelo" se entiende que abarca tanto estrictamente específico de alelo, así como la amplificación selectiva de alelo.

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

20 Una polimerasa de "ácido nucleico" se refiere a una enzima que cataliza la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico. Ejemplos de polimerasas de ácidos nucleicos incluyen polimerasas de DNA, polimerasas de RNA, transferasas terminales, transcriptasas inversas, telomerasas y similares.

25 Una "enzima termoestable" se refiere a una enzima que es estable (es decir, resiste la descomposición o desnaturalización) y retiene suficiente actividad catalítica cuando se somete a temperaturas elevadas durante períodos de tiempo seleccionados. Por ejemplo, una polimerasa termoestable retiene la actividad suficiente para efectuar reacciones de extensión de cebador posteriores, cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para desnaturalizar los ácidos nucleicos de doble cadena. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica y se ejemplifican en las patentes US. N° 4.683.202 y 4.683.195. Como se utiliza aquí, una polimerasa termoestable es adecuada normalmente para su uso en una reacción de ciclos de temperatura tales como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). Los ejemplos de polimerasas termoestables de ácido nucleico incluyen la DNA polimerasa de Taq de *Thermus aquaticus*, polimerasa Z05 de *Thermus sp.*, polimerasa de *Thermus flavus*, polimerasas de *Thermotoga maritima*, tales como polimerasas TMA-25 y TMA-30, DNA polimerasa de Tth, y similares.

35 Una enzima "modificada" se refiere a una enzima que comprende un polímero de aminoácidos en la que al menos un monómero difiere de la secuencia de referencia, tal como una forma de tipo salvaje o nativa de la enzima. Modificaciones ejemplares incluyen inserciones de monómero, eliminaciones y sustituciones. Las enzimas modificadas también incluyen enzimas quiméricas que tienen secuencias componentes identificables (por ejemplo, dominios estructurales o funcionales, etc.) derivados de dos o más enzimas parentales. También se incluye dentro de la definición de enzimas modificadas aquellas que comprenden modificaciones químicas de la secuencia de referencia. Los ejemplos de polimerasas modificadas incluyen DNA polimerasa de CS5 G46E E678G, DNA polimerasa de CS5 G46E L329A E678G, DNA polimerasa de CS5 G46E L329A D640G S671F, DNA polimerasa de CS5 G46E L329A D640G S671F E678G, una DNA polimerasa de CS6 G46E E678G, polimerasa $\Delta Z05$, polimerasa $\Delta Z05$ -Gold, polimerasa $\Delta Z05R$, DNA polimerasa de Taq E615G, polimerasa TMA-25E678G, polimerasa TMA-30 E678G, y similares.

40 El término "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 cadenas de ácido nucleico, por lo cual los nucleótidos se eliminan del extremo 5' de una cadena de ácido nucleico, por ejemplo, la DNA polimerasa I de *E. coli* tiene esta actividad, mientras que el fragmento Klenow no la tiene.

45 El término "actividad nucleasa 3' a 5'" o "actividad nucleasa 3'-5'" o "actividad de corrección de galeradas" se refiere a una actividad de una polimerasa de ácido nucleico, mediante la cual los nucleótidos se eliminan del extremo 3' de la cadena de ácido nucleico. Por ejemplo, la DNA polimerasa III *E. coli* tiene esta actividad, mientras que la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) no la tiene.

50 Un "marcaje" se refiere a una porción unida (covalentemente o no covalentemente), a una molécula y es capaz de proporcionar información acerca de la molécula. Los marcajes 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.).

55 La "fidelidad" o "fidelidad de replicación" es la capacidad de una polimerasa de ácido nucleico para incorporar un nucleótido correcto durante la polimerización dependiente de molde. En el contexto de la fidelidad de replicación,

"nucleótido correcto" en la cadena de nucleótidos naciente es el nucleótido emparejado con el nucleótido del molde a través del estándar de emparejamiento de bases de Watson-Crick. Fidelidad de replicación de una determinada polimerasa resulta en una combinación en la incorporación de nucleótidos correctos y la eliminación de nucleótidos incorrectos desde el extremo 3' de la hebra de nucleótidos naciente a través de la actividad nucleasa 3'-5' de la polimerasa. Varios métodos de medición de la fidelidad de una polimerasa de nucleótido se revisan en Tindall et al. (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry*, 27: 6.008-6.013. Normalmente, las polimerasas con capacidad nucleasa 3'-5' (corrección de galeras) tienen una mayor fidelidad que las polimerasas sin la actividad de corrección de galeras.

Un "arranque 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 retiene 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 cebadores. Una "enzima de arranque en caliente" es una enzima, normalmente una polimerasa de ácido nucleico, capaz de actuar como el reactivo o inactivo "retenido" en un protocolo de arranque en caliente.

Un "nucleótido selectivo" es un nucleótido en un cebador específico de alelo que confiere selectividad de alelo al cebador. El nucleótido selectivo es complementario a un nucleótido correspondiente en la variante deseada del ácido nucleico diana pero no es complementario al nucleótido correspondiente en las variantes no deseadas del ácido nucleico diana. En un cebador, más de un nucleótido puede ser complementario a un nucleótido en las variantes deseadas de los ácidos nucleicos diana pero no complementario al nucleótido correspondiente en las variantes no deseadas del ácido nucleico diana. Sin embargo, el nucleótido selectivo se encuentra en una posición dentro del cebador que afecta a la especificidad del cebador. El nucleótido selectivo permite la amplificación eficiente o ineficiente del ácido nucleico diana, dependiendo de si encuentra o no una pareja complementaria en el ácido nucleico diana. Un cebador puede contener más de un nucleótido selectivo.

Un "emparejamiento de bases Watson-Crick" o simplemente "el emparejamiento de bases" se refiere al enlace de hidrógeno "convencional" dentro de una molécula de ácido nucleico de doble cadena. El emparejamiento de bases Watson-Crick es el enlace de hidrógeno entre bases complementarias, tales como la unión entre la adenina y la timina, entre guanina y citosina, entre adenina y uracilo, y entre los análogos de estas bases.

Los términos "escorpión", "similar a escorpión" o "similar a escorpión ARMS" como se usa aquí denota la combinación unimolecular cebador-sonda como se describe en Whitcombe et al., (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence, *Nature Biotech.* 17: 804-807. Los cebadores escorpión o similar a escorpión con el significado de la presente invención incorporan los elementos típicos del escorpión, a saber, una parte de la sonda, una parte del bucle y una porción del cebador. Un ejemplo de formato unimolecular cebador-sonda "escorpión" o "similar a escorpión" se ilustra en la Fig. 4.

El término "interno", como se usa en el presente documento, por ejemplo, en la expresión "un segundo oligonucleótido, al menos parcialmente complementario a una o más variantes de la secuencia diana, pero que tiene al menos un nucleótido selectivo interno complementario a una sola variante de la secuencia diana" se refiere a cualquier nucleótido distinto del extremo 3', por ejemplo de 1 a 5 nucleótidos internamente del extremo 3'.

La expresión "en el que dicha polimerasa es capaz de extender preferentemente dicha segundo oligonucleótido cuando dicho nucleótido selectivo forma un par de bases con la diana, y sustancialmente menos cuando dicho nucleótido selectivo no forma un par de bases con la diana" significa que la extensión del segundo oligonucleótido por la polimerasa es más eficiente cuando el nucleótido selectivo forma un par de bases con la diana, que cuando dicho nucleótido selectivo no forma un par de bases con la diana. Esto puede por ejemplo medirse o cuantificarse con el material y métodos descrito en el Ejemplo 1, cuyos resultados se muestran en la Figura 1.

La presente invención muestra un nuevo cebador de amplificación específico de alelo, un método de diseño de tales cebadores, un método para usar el cebador en la amplificación específica de alelo, una mezcla de reacción y un equipo que incluye el cebador. El método para diseñar el cebador puede utilizarse solo o en combinación con los métodos existentes de diseño de cebadores específicos de alelo. Un cebador específico de alelo típico está diseñado para hibridar con una región polimórfica de la secuencia diana y contiene al menos un nucleótido selectivo, es decir, un nucleótido complementario a la variante deseada del nucleótido polimórfico en la diana y no complementario a las variantes no deseadas de la diana. Tradicionalmente se ha considerado necesario colocar el nucleótido selectivo en el extremo 3' del cebador, ya que la falta de coincidencia terminal se cree que es un requisito previo necesario para la amplificación específica de alelo. Véase Newton et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucl. Acids Res.* 17: 2503-2516.

Los presentes inventores han descubierto que la colocación interna del nucleótido selectivo es suficiente para asegurar la especificidad de alelo del cebador. El desemparejamiento terminal no se requiere para conferir especificidad al cebador. Un solo desemparejamiento interno es suficiente para inhibir la extensión del cebador desemparejado mediante una polimerasa de nucleótidos. De acuerdo con la presente invención, el nucleótido selectivo se coloca internamente del extremo 3' del cebador, entre 1 y 5 nucleótidos internamente del extremo 3'.

Cuando el nucleótido interno está desemparejado, el molde desemparejado no deseado no se amplifica o se amplifica menos eficientemente, mientras que el molde emparejado deseado es amplificado de manera eficiente.

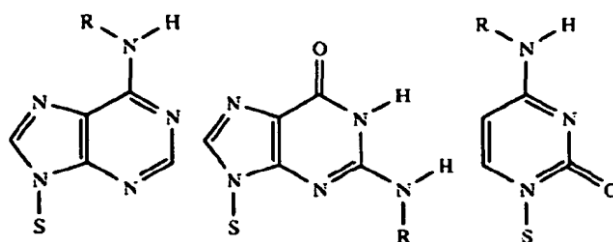
5 En una realización, la invención es un oligonucleótido (cebador) para su uso en PCR específica de alelo. El cebador de la invención comprende 10-50, más preferiblemente 15-35 nucleótidos, la mayoría de ellos complementario a una secuencia en más de una variante de la secuencia diana. El cebador contiene también al menos un nucleótido selectivo interno de complementario a sólo una variante de la secuencia diana.

10 En algunas realizaciones, el cebador específico de alelo contiene además uno o más nucleótidos con modificaciones químicas que aumentan aún más su especificidad. Por ejemplo, las modificaciones en la amina exocíclica de una nucleobase se han descrito en la Patente de Estados Unidos N° 6.001.611. El cebador específico de alelo de acuerdo con la presente invención puede tener una modificación en la amina exocíclica de una o más bases de nucleótido. En algunas realizaciones, la base de nucleótido modificada se produce entre 1 y 5, pero preferiblemente 3 nucleótidos corriente arriba del nucleótido 3' terminal. En otras realizaciones, la base de nucleótido modificada es el nucleótido 3' terminal. En algunas realizaciones, la base de nucleótido modificada se produce tanto en el extremo 3', así como en otros lugares dentro del cebador de oligonucleótidos. En aún otras realizaciones, la modificación puede tener lugar en el nucleótido selectivo dentro del cebador específico de alelo.

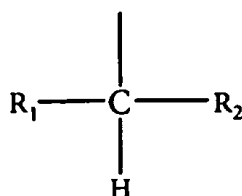
20 De acuerdo con la presente invención, una modificación adecuada del grupo amino exocíclico puede seleccionarse basándose en la presencia de las siguientes propiedades: (1) la modificación interfiere, pero no impide, el emparejamiento Watson-Crick de la base modificada con la base complementaria en el ácido nucleico de doble cadena; (2) la modificación interfiere, pero no impide la extensión del cebador que contiene la base modificada mediante la polimerasa de ácido nucleico; (3) la modificación permite la síntesis de la cadena complementaria a la hebra que incorpora la base modificada; y (4) la modificación aumenta la selectividad de un cebador que incorpora la modificación.

30 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 participan en el emparejamiento de bases con la cadena de ácido nucleico complementaria también pueden ocurrir en diversas bases nitrogenadas no convencionales de nucleótidos. Ejemplos de nucleósidos con bases no convencionales incluyen, sin limitación, 3-metiladenosina, 7-metilguanosa, 3-metilguanosa, 5-metilcitidina, y 5-hidroximetilcitidina. Las modificaciones adecuadas de grupos amino exocíclicos de tales bases no convencionales también pueden seleccionarse de acuerdo con el método empírico de la presente invención.

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



40 donde S representa la porción de azúcar, y R representa el grupo modificador. Una variedad de grupos modificadores se cree que poseen las cuatro propiedades descritas anteriormente. En ciertas realizaciones, los grupos modificadores poseen la estructura:



45 en la que R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consistente en hidrógeno, alquilo, alcoxi, arilo sustituido o no sustituido y fenoxi.

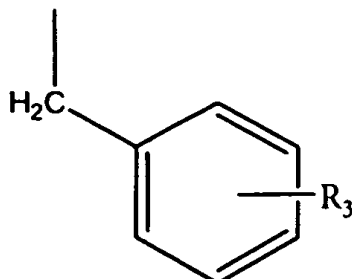
Los grupos alquilo pueden estar ramificados o no ramificados.

50 Los grupos alquilo pueden ser alquilos C₁-C₂₀, en particular, alquilos C₁-C₁₀.

Los grupos alcoxi pueden ser alcoxi C₁-C₂₀, en particular, alcoxi C₁-C₁₀.

Arilo puede ser fenilo o naftilo sustituido o no sustituido.

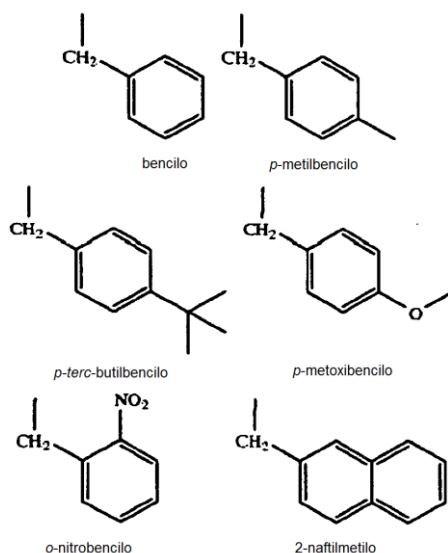
- 5 En una realización, R es un grupo bencilo o un grupo bencilo sustituido. En ciertas realizaciones, los grupos bencilo sustituidos pueden tener la siguiente estructura:



- 10 en la que R₃ representa un grupo alquilo C₁-C₆ ramificado o no ramificado, más preferiblemente un grupo alquilo C₁-C₄ ramificado o no ramificado, un grupo alcoxi, o un grupo nitro. Preferiblemente, R₃ está unido en la posición para.

En algunas realizaciones, los grupos modificadores están representados por las estructuras que se muestran a continuación:

15



- 20 En general, la selección empírica de un grupo modificador adecuado en particular de la clase de compuestos descritos en el presente documento puede llevarse a cabo de forma rutinaria por un experto en la técnica, basándose en la presencia de las cuatro propiedades mencionadas anteriormente. Preferiblemente, la idoneidad de un grupo particular se determina empíricamente mediante el uso de los cebadores con los nucleótidos modificados en una reacción de amplificación específica de alelo. La idoneidad de la modificación se indica por el aumento de la selectividad de la reacción utilizando un cebador con la base modificada, en comparación con una reacción idéntica con un cebador no modificado.

- 25 Los desemparejamientos adicionales entre el cebador y el molde desestabilizan además el híbrido entre el cebador y la variante no deseada de la secuencia diana. El método para optimizar el diseño de los cebadores específicos de alelo se puede encontrar en Newton et al. (1989) supra.

- 30 El cebador específico de alelo de la presente invención puede incorporar diversos aspectos de diseño del cebador conocidos en la técnica. Por ejemplo, el cebador puede tomar la forma de una combinación de cebador-sonda unimolecular denominado "escorpión" y descrito en Whitcombe et al., (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence, Nature Biotech. 17: 804-807. El cebador de escorpión diseñado de acuerdo con la presente invención incorpora los elementos típicos del escorpión, a saber, una porción de la sonda, una porción del bucle y una porción del cebador. Además, en un escorpión diseñado de acuerdo con la presente invención, la porción de cebador contiene el nucleótido selectivo colocado internamente. Opcionalmente, la porción de cebador en un escorpión diseñado de acuerdo con la presente invención puede contener uno o más nucleótidos modificados químicamente.

En resumen, el cebador específico de alelo de la presente invención posee, como mínimo, las siguientes cuatro características: 1) una porción 5', al menos parcialmente complementaria a ambas variantes deseadas y no deseadas de la secuencia diana; 2) un nucleótido selectivo interno, complementario solamente a la variante deseada de la secuencia diana y situado dentro de la porción 3'; 3) una porción 3', al menos parcialmente complementaria a ambas variantes deseadas y no deseadas de la secuencia diana; y 4) el nucleótido 3' terminal complementario a ambas versiones deseada y no deseadas de la secuencia diana. La porción 5' y la porción 3' pueden contener nucleótidos selectivos adicionales que son complementarios únicamente a la versión deseada de la secuencia diana, siempre y cuando el nucleótido 3' terminal del cebador es complementario a tanto la versión deseada como la no deseada de la secuencia diana.

La selección empírica de una porción 5' y adecuada del cebador específico de alelo puede llevarse a cabo de forma rutinaria por un experto en la técnica. Específicamente, la longitud, el grado de complementariedad de la porción 5' y 3' y las modificaciones químicas de los nucleótidos en la porción 5' y la porción 3' del cebador se puede variar, siempre y cuando el cebador posea las cuatro características establecidas anteriormente. Preferiblemente, la idoneidad de un cebador específico de alelo particular se determina empíricamente mediante el uso del cebador en una amplificación específica de alelo. La idoneidad del cebador se indica mediante la selectividad de la amplificación utilizando el cebador.

En otro aspecto, la presente invención es un método de amplificación específica de alelo de un ácido nucleico diana. La amplificación implica el uso de un cebador específico de alelo que tiene un nucleótido selectivo, colocado internamente de el extremo 3' del cebador, por ejemplo, entre 1 y 5 nucleótidos internamente del extremo 3'.

En una realización, la presente invención es un método de amplificación específica de alelo de una variante de una secuencia diana, que existe en forma de varias secuencias variantes, el método comprende: proporcionar una muestra, que contiene posiblemente al menos una variante de una secuencia diana; proporcionar un primer oligonucleótido, por lo menos parcialmente complementario a una o más variantes de la secuencia diana; proporcionar un segundo oligonucleótido, al menos parcialmente complementario a una o más variantes de la secuencia diana, pero que tiene al menos un nucleótido selectivo interno complementario a solo una variante de la secuencia diana; proporcionar condiciones adecuadas para la hibridación de dicho primer y segundo oligonucleótido al menos a una variante de la secuencia diana; proporcionar las condiciones adecuadas para la extensión del oligonucleótido por una polimerasa de ácido nucleico; en el que dicha polimerasa es capaz de extender dicho segundo oligonucleótido cuando se hibrida a la variante de la secuencia diana para la que dicho nucleótido selectivo interno complementario, y sustancialmente menor cuando dicho segundo oligonucleótido se hibrida con la variante de la secuencia diana para la que tiene un nucleótido selectivo interno no complementario; y repetir múltiples veces los pasos de la secuencia de hibridación y extensión.

En algunas realizaciones de la invención, la amplificación implica la reacción en cadena de la polimerasa, es decir, los ciclos repetidos de desnaturalización del molde, anillamiento (hibridación) del cebador de oligonucleótidos al molde, y la extensión del cebador mediante la polimerasa de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la hibridación y la extensión se producen en el mismo paso de temperatura.

En algunas realizaciones, la reacción de amplificación implica un protocolo de arranque en caliente. En el contexto de la amplificación específica de alelo, la selectividad de los cebadores específicos de alelo con respecto a la diana desemparejada se puede mejorar mediante el uso de un protocolo de arranque en caliente. Muchos protocolos de arranque en caliente son conocidos en la técnica, por ejemplo, el uso de cera, la separación de los reactivos críticos del resto de la mezcla de reacción (patente de EE.UU. nº 5.411.876), el uso de una polimerasa de ácido nucleico, reversiblemente inactivada por un anticuerpo (Patente de EE.UU. nº 5.338.671), una polimerasa de ácido nucleico reversiblemente inactivada por un oligonucleótido que está diseñado para unirse específicamente a su sitio activo (patente de EE.UU. nº 5.840.867) o el uso de una polimerasa de ácido nucleico con modificaciones químicas reversibles, como se describe por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 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 medición de la amplificación es el "ciclo umbral" o valor Ct. En el contexto del ensayo de PCR específico de alelo en tiempo real, la diferencia en los valores de Ct entre los moldes emparejados y no emparejados es una medida de discriminación entre los alelos o la selectividad del ensayo. Una diferencia mayor indica un mayor retraso en la amplificación del molde desemparejado y por lo tanto una mayor discriminación entre alelos. A menudo, el molde desemparejado está presente en cantidades mucho mayores que el molde emparejado. Por ejemplo, en muestras de tejido, sólo una pequeña fracción de células puede ser maligna y llevar la mutación buscada por el ensayo de amplificación específico de alelo ("molde emparejado"). El molde desemparejado presente en células normales puede amplificarse con menos eficiencia, pero la cantidad abrumadora de células normales superará cualquier retraso en la amplificación y elimina cualquier ventaja del molde mutante. Para detectar mutaciones raras en la presencia de un molde de tipo salvaje, la especificidad del ensayo de amplificación específica de alelo es crítica.

El ensayo de amplificación específica de alelo de la presente invención puede emplear cualquier polimerasa de ácido nucleico adecuada conocida en la técnica. Para un ensayo de PCR específica de alelo de la presente invención, cualquier polimerasa de ácido nucleico termoestable puede utilizarse. También se puede utilizar una polimerasa modificada, diseñada o quimérica. Es deseable a veces utilizar una enzima sin la actividad corrección de galeradas (exonucleasa 3'-5'), tales como por ejemplo, la polimerasa de DNA Taq. También puede ser deseable utilizar enzimas, sustancialmente o totalmente carentes de la actividad nucleasa 5'-3', tal como se describe en la Patente de Estados Unidos nº 5.795.762. Un ejemplo de dicha enzima es la polimerasa $\Delta Z05$. A veces puede ser deseable tener una enzima con una capacidad de "arranque en caliente", tales como las enzimas reversiblemente modificadas descritas en la Patente de Estados Unidos nº 5.677.152 y 5.773.528. Un ejemplo de una enzima de arranque en caliente es la polimerasa $\Delta Z05$ -Gold. Generalmente se sabe que la especificidad de un cebador específico de alelo puede variar algo entre las diferentes enzimas. Ver Newton et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucl. Acids Res. 17: 2503-2516. Sobre la base de los protocolos descritos en Newton (supra) una persona con experiencia básica sería capaz de optimizar los parámetros de reacción, por ejemplo, cambiando la concentración de sal y el perfil de temperatura a fin de lograr la máxima especificidad con cada enzima y seleccionar la mejor enzima para un ensayo particular.

Una ventaja especial de la PCR específica de alelo de la presente invención es la capacidad de utilizar polimerasas con corrección de galeradas de la actividad nucleasa 3'-5'. Ejemplos de tales enzimas se pueden encontrar en el documento US 7.148.049. Tales enzimas comprenden, por ejemplo *Thermatoga Maritima*. Estas enzimas tienen normalmente una mayor fidelidad (es decir, menos nucleótidos –incorporados por error en el producto final) que las enzimas sin actividad de corrección de galeradas. Por ejemplo, la tasa de error para la polimerasa de DNA Taq (que no tiene una función de corrección de galeradas) es de aproximadamente 10^{-4} . Tindall et al. (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Biochemistry, 27: 6.008-6.013. En comparación, la tasa de error de una polimerasa de DNA Pfu termoestable con corrección de galeradas es de aproximadamente 10^{-6} . Andre et al. (1997) Fidelity and mutational spectrum of Pfu DNA polymerase on a human mitochondrial DNA sequence, Genome Res. 7: 843-852. Antes de la presente invención, una polimerasa con corrección de alta fidelidad no podía utilizarse con una PCR específica de alelo. Véase la Patente de EE.UU. No. 5.639.611. La actividad nucleasa de la enzima eliminaría el nucleótido selectivo desemparejado del extremo 3' del cebador eliminando así la especificidad de alelo del cebador. En la presente invención, el cebador específico de alelo no tiene un nucleótido selectivo en el extremo 3' sino internamente. El desemparejamiento interno es un sustrato ineficiente para la actividad exonucleasa de una enzima de corrección de galeradas. Se ha observado que la capacidad de la exonucleasa para eliminar los nucleótidos desemparejada cae dramáticamente cuando el desemparejamiento se encuentra lejos del extremo 3'. Fidalgo-Da Silva et al. (2007) DNA polymerase proofreading: active site switching catalyzed by the bacteriophage T4 DNA polymerase, Nucl. Acids Res. 35: 5452-5463. La velocidad de eliminación de tres nucleótidos es mucho menor que dos nucleótidos. Reddy et al. (1992) El proceso de corrección es intrínseco a la polimerasa de DNA de T4. J. Biol. Chem. 267: 14.157-14.166. Por lo tanto el cebador con un nucleótido selectivo interno de la presente invención puede utilizarse con una polimerasa de nucleótidos con corrección de galeradas. El experto en la técnica reconocerá cómo optimizar las condiciones de reacción, por ejemplo cambiando la composición del tampón de reacción y la concentración de los precursores de ácidos nucleicos con el fin de minimizar la actividad exonucleasa de la enzima sin comprometer la amplificación específica de alelo. Véase, por ejemplo Goodman et al. (1993) Biochemical basis of DNA replication fidelity, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 28: 83-126 para las condiciones que favorecen la polimerización y las condiciones que favorecen las actividades de digestión de nucleasa de diversas polimerasas de ácidos nucleicos.

En algunas realizaciones del método, los productos de amplificación se pueden detectar mediante cualquier técnica conocida en la técnica, incluyendo pero sin limitarse al uso de cebadores y sondas marcadas, así como varias tinciones de unión a ácidos nucleicos. Los medios de detección pueden ser específicos para una variante de la secuencia diana, o pueden ser genéricos para todas las variantes de la secuencia diana o incluso a todo el DNA de doble cadena.

Los productos de amplificación se pueden detectar después de haberse completado la amplificación, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de los productos no marcados y tinción del gel con un colorante de unión a ácido nucleico. Alternativamente, los productos de amplificación pueden llevar un marcador radiactivo o químico, ya sea 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 se pueden detectar con herramientas radiológicas o químicos adecuadas conocidas en la técnica. Después de la electroforesis, los productos también se pueden detectar con una sonda específica de la diana marcada con cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. La sonda marcada se puede aplicar también a la diana sin electroforesis, es decir, en un ensayo de "dot blot" o similar.

En otras realizaciones, la presencia del producto de amplificación se puede detectar 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 después de la amplificación en la que se requiere manipulación. Un ensayo de amplificación homogéneo se ha descrito por ejemplo, en la patente de Estados Unidos nº 5.210.015. El ensayo de amplificación homogéneo utilizando colorantes que se intercalan entre los ácidos nucleicos se ha descrito por ejemplo, en la patente de Estados Unidos nº 5.871.908 y 6.569.627. El ensayo homogéneo también puede emplear

sondas fluorescentes marcadas con dos fluoróforos que interaccionan, tales como las 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). Los productos de amplificación también se pueden detectar usando una combinación unimolecular de cebadores-sonda denominado "escorpión". Whitcombe et al., (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence, Nature Biotech. 17: 804-807. La porción del cebador del oligonucleótido escorpión puede ser un cebador específico de alelo diseñado de acuerdo con la presente invención.

En ciertas variaciones del método de la presente invención, el producto de amplificación también puede ser identificado en virtud de su temperatura de fusión distintiva, véase las patentes U.S. nº 5.871.908 y 6.569.627.

En otra realización, la invención proporciona una mezcla de reacción para amplificar selectivamente la variante deseada de la secuencia diana, la secuencia diana existente en forma de varias secuencias variantes, la mezcla que comprende un primer oligonucleótido, por lo menos parcialmente complementario a una o más variantes de la secuencia diana; y un segundo oligonucleótido, al menos parcialmente complementario a una o más variantes de la secuencia diana, pero que tiene al menos un nucleótido selectivo interno complementario a solo una variante de la secuencia diana. La mezcla de reacción también puede contener una polimerasa de ácido nucleico que es capaz de extender dicho segundo oligonucleótido cuando se hibrida a la variante de la secuencia diana para la que tiene dicho nucleótido selectivo interno complementario, y sustancialmente menor cuando dicho segundo oligonucleótido se hibrida a la variante de la secuencia diana para la que tiene un nucleótido selectivo interno no complementario. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además los reactivos y soluciones generalmente necesarios para la amplificación de los ácidos nucleicos, incluyendo los precursores de los ácidos nucleicos, es decir, nucleósidos trifosfato, e iones orgánicos e inorgánicos, adecuados para el apoyo de la actividad de la polimerasa de nucleótidos.

En otra realización, la invención proporciona equipos para llevar a cabo la amplificación específica de alelo de acuerdo con la invención. El equipo generalmente incluye componentes específicos de ensayo, así como los componentes que generalmente se requieren para llevar a cabo la amplificación de ácido nucleico. Como los componentes de ensayo específico, el equipo de amplificación específico de alelo de la presente invención contiene un primer oligonucleótido, por lo menos parcialmente complementario a una o más variantes de la secuencia diana; un segundo oligonucleótido, al menos parcialmente complementario a una o más variantes de la secuencia diana, pero que tiene al menos un nucleótido selectivo interno complementario a solo 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, por lo menos parcialmente complementaria a los oligonucleótidos abarcados por el equipo. En algunas realizaciones, más de una variante de la secuencia de ácido nucleico de control puede estar presente. Como los componentes generalmente necesitan la amplificación de ácido nucleico, el equipo de la presente invención puede incluir una o más polimerasas de ácido nucleico, precursores de ácidos nucleicos, tales como nucleósidos trifosfatos, desoxirribonucleósidos trifosfatos o ribonucleósidos trifosfato, una pirofosfatasa, para minimizar la pirofosforólisis de ácidos nucleicos, un uracilo N-glicosilasa (UNG) para la protección contra la contaminación cruzada de las reacciones de amplificación, reactivos prehechos y tampones necesarios para la reacción de amplificación y detección, y un conjunto de instrucciones para llevar a cabo la amplificación específica de alelo de acuerdo con la presente invención.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos, se utilizaron dos variantes de la secuencia molde: una variante emparejada, con una secuencia complementaria al nucleótido selectivo en el cebador específico de alelo y una variante no emparejada, con una secuencia no complementaria al nucleótido selectivo en el cebador específico de alelo.

Como una diana emparejada, los ejemplos utilizan la mutación V600E del gen BRAF humano (referencia GeneBank). La variante emparejada era un DNA de plásmido con el inserto que incorpora la secuencia mutante BRAF V600E (Id. de Sec. nº: 19), mientras que la variante desemparejada era el mismo plásmido con la secuencia BRAF de tipo salvaje (Id. de Sec. nº: 20).

Id. de Sec. nº: 19 (fragmento secuencia mutante BRAF V600E)

**5'-AGTAAAATAGGTTGATTTTGGTCTAGCTACAGAGAAATCTCGATGGAGTGGG
TCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGG
CTA-3'**

Id. de Sec. nº: 20 (fragmento de la secuencia BRAF de tipo salvaje)

**5'-AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGAAATCTCGATGGAGTGGG
TCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGA
GGCTA-3'**

Esta mutación es un cambio del aminoácido 600 de valina a glutamato, que resultados de una transición de timina (T) en adenina (A) en el nucleótido 1799 del gen BRAF. La mutación se encuentra en muchos tipos de cáncer y se cree que contribuyen a la progresión del cáncer, tal como resulta en la activación constitutiva de la ruta MAPK. La detección de este cambio de nucleótido único en una población de células tumorales tiene utilidad en el diagnóstico y tratamiento del cáncer humano.

La diana mutante está "emparejada", es decir, forma una pareja AT de Watson-Crick con el nucleótido selectivo de cada uno de los cebadores específicos de alelo (Tabla A). La diana desemparejada es la secuencia de BRAF de tipo salvaje. Las dianas desemparejadas forman un desemparejamiento con el nucleótido selectivo de cada uno de los cebadores específicos de alelo.

Tabla A

Cebadores		
Id. de Sec.	Función	Secuencia
1	Cebador directo	5'-TAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAGA-3*
2	Cebador directo	5'-TAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACYGAGA-3'
3	Cebador directo	5'-TAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGYGA-3'
4	Cebador directo	5'-TAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAGX-3'
5	Cebador directo	5'-TAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACYGAGY-3'
6	Cebador directo	5'-GTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAG-3'
7	Cebador directo	5'-GTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGYG-3'
8	Cebador directo	5'-GTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACYGAG-3'
9	Cebador directo	5'-GTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACYGYG-3'
10	Cebador directo	5'-GTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTAZAGYG-3'
11	Cebador inverso	5'-TAGCCTCAATTCTTACCATCCACAX-3'
* el nucleótido selectivo está subrayado		
X - N ⁶ -bencil-dA		
Y - N ⁶ -para-terc-butyl-bencil-dA		
Z - N ⁶ -para-terc-butyl-bencil-dC		

Ejemplo 1

Amplificación específica de alelo usando un cebador con un nucleótido selectivo interno

En este ejemplo, se usaron dos variantes de la secuencia molde: una variante emparejada, con una secuencia complementaria al nucleótido selectivo en el cebador específico de alelo y una variante desemparejada, con una secuencia no complementaria al nucleótido selectivo en el cebador específico de alelo. La variante emparejada era un plásmido de DNA con el inserto que representa la secuencia BRAF con una mutación V600E. La variante desemparejada era el mismo plásmido con la secuencia BRAF de tipo salvaje. Los cebadores directos (Id. de Sec. nº: 1-4) y cebador inverso (Id. de Sec. nº: 11) se muestran en la Tabla A. Los cebadores específicos de alelo directos fueron diseñados con el nucleótido selectivo interno del extremo 3', en la posición N-2. Algunos cebadores contenían las modificaciones químicas donde se indica.

Cada reacción de 50 µl contenía 10⁵ copias de cualquier diana, 8% de glicerol, tricina 50 mM (pH 7,7), acetato de potasio 45 mM (pH 7,5), dATP, dCTP y dGTP 200 µM, dUTP 400 µM, cebador directo 0,1 mM, cebador inverso 0,7 µM, colorante intercalante Syto-13 2 µM, DMSO 1%, 2 unidades de uracil-N-glicosilasa (UNG), 50 unidades de DNA polimerasa ΔZ05-Gold, y acetato de magnesio 3 mM. La amplificación y análisis se realizaron utilizando el instrumento Roche LightCycler 480. Las reacciones se sometieron al siguiente perfil de temperatura: 50 °C durante 5 minutos (paso UNG), 95 °C durante 10 minutos, seguido de 60-70 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 59 °C durante 40 segundos. Los datos de fluorescencia se recogieron a 495-525nm al final de cada paso de 59 °C.

Los resultados se muestran en la Figura 1 y en la Tabla 1. La selectividad de la amplificación se mide por la diferencia en el valor Ct (Ct) entre las dianas emparejadas y las desemparejadas. El ΔCt para cada experimento se indica en cada diagrama. Los datos muestran que la variante emparejada (mutante) de la diana se amplificó selectivamente sobre la variante desemparejada (de tipo salvaje). La selectividad se mejoró mediante modificación química de los nucleótidos en los cebadores. En esta tabla, la posición N indica la posición de nucleótido en relación con el extremo 3'.

Tabla 1

Cebador directo	Posición del nucleótido selectivo	modificación química	C _t media de la diana de tipo salvaje	C _t media de la diana mutante	ΔC _t
Id. de Sec. n.º: 1	N-2	ninguno	33,7	29,4	4,3
Id. de Sec. n.º: 2	N-2	Y* en N-4	44,0	31,9	12,1
Id. de Sec. n.º: 3	N-2	Y en N-2	42,1	32,1	10,0
Id. de Sec. n.º: 4	N-2	X en el extremo 3'	49,0	33,3	15,7

*Y - N6-para-terc-butyl-bencil-dA
X - N6-bencil-dA

Ejemplo 2:

- 5 Amplificación específica de alelo utilizando cebadores con un nucleótido selectivo interno y diferentes polimerasas de ácido nucleico

10 En este ejemplo, las mismas dianas emparejada (mutante) y desemparejada (de tipo salvaje) como en el Ejemplo 1 se amplificaron utilizando los cebadores mostrados en la Tabla A. La amplificación se llevó a cabo en presencia de la polimerasa Z05, ΔZ05, o ΔZ05-Gold.

15 Todas las reacciones se realizaron por triplicado, en volúmenes de 15 μl que contenían 10⁵ copias de la diana, 200 μM de cada dATP, dCTP y dGTP, 400 μM de dUTP, cebador directo 0,1 μM, de cebador inverso 0,7 μM, tinción intercalante Syto-13 2 μM, DMSO 1%, uracilo-N-glicosilasa (UNG) 0,04U / μl, y acetato de magnesio 3 mM. Las reacciones Z05 contenían 3U de polimerasa, acetato de potasio 130 mM (pH 7,5), glicerol 5%, y Tricina 50 mM (pH 8,3). Las reacciones ΔZ05 contenían 3U de polimerasa, acetato de potasio 25 mM (pH 7,5), glicerol 5%, y Tricina 50 mM (pH 8,3). Las reacciones ΔZ05-Gold contenían 15U de la polimerasa, acetato de potasio 45 mM (pH 7,5), glicerol 8%, y Tricina 50 mM (pH 7,7).

20 La amplificación y el análisis se realizaron utilizando el instrumento Roche LightCycler 480. Las reacciones se sometieron al siguiente perfil de temperatura: 50 °C durante 5 minutos (paso UNG), 95 °C durante 10 minutos, seguido por 99 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 59 °C durante 40 segundos. Los datos de fluorescencia se recogieron a 465-510nm al final de cada paso 59 °C.

25 Los resultados se muestran en la Tabla 2. La selectividad de la amplificación se mide por la diferencia en los valores Ct (ΔCt) entre la diana emparejada y la desemparejada. El ΔCt para cada experimento se indica en la Tabla 2. Los datos muestran que la variante de la diana emparejada (mutante) se amplificó selectivamente sobre la variante desemparejada (de tipo salvaje). La selectividad fue potenciada por la modificación alquilo de los nucleótidos en los cebadores. En esta tabla, la posición N indica la posición de nucleótido en relación con el extremo 3'.

30

Tabla 2

Id. de Sec.	Posición del nucleótido selectivo	Z05			ΔZ05			ΔZ05-GOLD		
		Mut C _t media	peso C _t media	ΔCt (peso-mut)	Mut C _t media	peso C _t media	ΔCt (peso-mut)	Mut C _t media	peso C _t media	ΔCt (peso-mut)
1	N-2	24,1	24,9	0,8	25,9	27,3	1,4	29,8	34,0	4,2
3	N-2	25,1	29,6	4,5	27,2	38,4	11,2	35,1	51,5	16,4
5	N-2	29,0	47,0	18,0	N / A	N / A	N / A	94,0	100,0	6,0
6	N-1	25,0	27,0	2,0	25,2	32,1	6,9	28,9	42,0	13,2
7	N-1	24,2	30,5	6,3	26,3	38,8	12,5	31,7	60,0	28,2
8	N-1	24,3	31,0	6,8	26,4	39,0	12,6	31,3	55,7	24,4
9	N-1	25,3	39,9	14,5	48,4	100,0	51,6	56,2	92,6	36,4
10	N-1	24,3	36,8	12,6	38,5	77,3	38,7	56,7	89,3	32,6

N / A - no hay datos

Ejemplo 3:

- 35 Amplificación específica de alelo utilizando cebadores similares a escorpión ARMS con modificaciones de bases internas y / o nucleótido selectivo interno

Tabla 3

Id. de Sec.	Función	Secuencia de cebador
12	Cebador directo	AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTGTAGGTACAGA
13	Cebador directo sonda,	FCCCGCGCGGACCCACTCCATCGAGAGCGCGGGQJAGTAAAAATA GGTGATTTTGGTCTAGCTACAGA
14	Cebador directo	AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACYGA
15	Cebador directo sonda	FCCCGCGCGGACCCACTCCATCGAGAGCGCGGGQJAGTAAAAATA GGTGATTTTGGTCTAGCTACYGA
6	Cebador directo	GTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAG
16	Cebador directo sonda	FCCCGCGCGGACCCACTCCATCGAGAGCGCGGGQJGTAAAAATAG GTGATTTTGGTCTAGCTACAGAG
9	Cebador directo	GTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACYGYG
17	Cebador directo sonda	FCCCGCGCGGACCCACTCCATCGAGAGCGCGGGQJGTAAAAATAG GTGATTTTGGTCTAGCTACYGYG
11	cebador inverso	TAGCCTCAATTCITACCATCCACAX
18	sonda	FTCTCGATGGAGTGGGTCCQp
X - N ⁶ -bencil-dA Y - N ⁶ -para-terc-butil-bencil-dA F - fluoróforo donante cx-FAM Q - desactivador BHQ-2 "Black Hole" J-HEG p - 3'-fosfato * se subraya el nucleótido selectivo de alelo (posición N o N-1 a partir del extremo 3')		

En este ejemplo, dos variantes de la secuencia molde estaban presentes en cantidades iguales, una variante emparejada, complementaria a la secuencia del cebador y una variante desemparejada. La variante emparejada era un DNA de plásmido con el inserto que representa la secuencia mutante BRAF V600E (Id. de Sec. n°: 1), mientras que la variante desemparejada era el mismo plásmido con la secuencia de tipo salvaje BRAF (Id. de Sec. n°: 2). Los cebadores directos (Id. de Sec. n°: 6, 9, 12 y 17) y el cebador inverso (Id. de Sec. n°: 11) son como se describen en la Tabla 3. Los cebadores directos ASPCR, fueron diseñados con el SNP en, o cerca de la posición 3' terminal, ya sea con o sin la modificación N⁶-terc-butil-bencil-dA. El cebador ASPCR está emparejado con una sonda de detección corriente abajo (Id. de Sec. n°: 18) o unido con el complemento de la sonda en un formato similar a Escorpión ARMS.

Cada reacción de 50 µL contenía 10⁵ copias de cualquiera de las dianas, glicerol 5 %, tricina 50 mM (pH 8,3), acetato de potasio 150 mM (pH 7,5), 200 µM de cada uno de dATP, dCTP y dGTP, 400 µM de dUTP, cebador directo 0,4 µM, cebador inverso 0,4 µM, DMSO 1%, 2 unidades de uracil-N-glicosilasa (UNG), 10 unidades de polimerasa Z05, y acetato magnésico 3 mM. Se añadió sonda de detección 0,2µm a las reacciones que contienen los cebadores 6, 9, 12 y 14, donde el complemento de la sonda no está relacionado con el cebador directo.

La amplificación y análisis se realizaron utilizando el instrumento Roche LightCycler 480. Las reacciones se sometieron al siguiente perfil de temperatura: 50 °C durante 5 minutos (paso UNG) seguido por 95 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 59 °C durante 40 segundos. Los datos de fluorescencia se recogieron en el rango de 495-525nm al final de cada paso de emparejamiento / extensión a 59 °C.

Los resultados se muestran en la Figura 2 y la Tabla 4. La selectividad de la amplificación se mide por la diferencia en el valor Ct (Δ Ct) entre la diana emparejada y la desemparejada. El Δ Ct para cada experimento se indica en cada diagrama y se resume en la Tabla 4. Los datos muestran que la variante emparejada (mutante) de la diana se amplificó selectivamente sobre la variante desemparejada (de tipo salvaje) utilizando el cebador y sonda individual o el cebador y la sonda ligada en un formato similar a escorpión ARMS. La discriminación se logró cuando el nucleótido selectivo estaba en el extremo 3' o interno. Además, la selectividad de la amplificación se mejoró mediante la adición de una o más modificaciones de alquilo.

Tabla 4

Id. de Sec.	Secuencia de cebador	Posición del nucleótido selectivo	Formato del cebador	del modificación del segmento cebador	WT CR _{media}	MUT CT _{media}	OCT
12	AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCT AGCTACAGA	extremo 3'	Tradicional	ninguno	31,6	30,2	1,4
13	FCCGGCGGGGACCCACTCCATCGA GAGCCGGGGQJAGTAAAAATAGGT	extremo 3'	Escorpión ARMS	Ninguno	34,7	29,2	5,5
14	GATTTTGGTCTAGCTACAGA AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCT	extremo 3'	Tradicional	Y en N-2	38,1	29,5	8,6
15	AGCTACYGA FCCGGCGGGGACCCACTCCATCGA GAGCCGGGGQJAGTAAAAATAGGT	extremo 3'	Escorpión ARMS	Y en N-2	51,4	32,6	18,8
6	GATTTTGGTCTAGCTACYGA GAAAAATAGGTGATTTTGGTCTA GCTACAGAG	penúltima 3'	Tradicional	ninguno	30,8	29,9	0,9
16	FCCGGCGGGGACCCACTCCATCGA GAGCCGGGGQJGAAAAATAGGTG	penúltima 3'	Escorpión ARMS	Ninguno	31,4	29,3	2,1
9	AITTTGGTCTAGCTACAGAG GAAAAATAGGTGATTTTGGTCTA GCTACYGYG	penúltima 3'	Tradicional	Y en N-1 y N-3	50,1	31,7	18,4
17	FCCGGCGGGGACCCACTCCATCGA GAGCCGGGGQJGAAAAATAGGTG AITTTGGTCTAGCTACYGYG	penúltima 3'	Escorpión ARMS	Y en N-1 y N-3	Sin amplificar	34,7	> 60,3

5 Aunque la invención ha sido descrita en detalle con referencia a ejemplos específicos, será evidente para un experto en la técnica que pueden hacerse diversas modificaciones dentro del alcance de esta invención. Así, el alcance de la invención no debe limitarse por cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento, sino por las reivindicaciones presentadas a continuación.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> F. Hoffmann-La Roche AG Roche Diagnostics GmbH
 <120> Amplificación mejorada de ácidos nucleicos específicos de alelo
 <130> 26248 WO-KOE
 <150> US 61/285,690
 <151> 2009-12-11

15 <160> 20
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 33
 <212> DNA

20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 1

25 taaaaatagg tgatttggctagctacag aga 33
 <210> 2
 <211> 33
 <212> DNA

30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 <220>
 <221> base_modificada

35 <222> (29)..(29)
 <223> N6-para-terc-butyl-bencil-dA
 <400> 2

40 taaaaatagg tgatttggctagctacag aga 33
 <210> 3
 <211> 33
 <212> DNA

45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <220>
 <221> base_modificada

50 <222> (31) .. (31)
 <223> N6-para-terc-butyl-bencil-dA
 <400> 3

55 taaaaatagg tgatttggctagctacag aga 33
 <210> 4
 <211> 33
 <212> DNA

60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <220>
 <221> base_modificada

65 <222> (33)..(33)
 <223> N6-bencil-dA
 <400> 4

taaaaatagg tgatttgg ctactacag aga 33

5 <210> 5
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 <220>
 10 <221> base_modificada
 <222> (29)..(29)
 <223> N6-para-terc-butil-bencil-dA
 <220>
 15 <221> base_modificada
 <222> (33)..(33)
 <223> N6-para-terc-butil-bencil-dA
 <400> 5

taaaaatagg tgatttgg ctactacag aga 33

20 <210> 6
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 6

gtaaaaatag gtgatttgg tctagctaca gag 33

30 <210> 7
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (32)..(32)
 40 <223> N6-para-terc-butil-bencil-dA
 <400> 7

gtaaaaatag gtgatttgg tctagctaca gag 33

45 <210> 8
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (30)..(30)
 <223> N6-para-terc-butil-bencil-dA
 55 <400> 8

gtaaaaatag gtgatttgg tctagctaca gag 33

60 <210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <220>
 65 <221> base_modificada

<222> (30)..(30)
 <223> N6-para-terc-butyl-bencil-dA
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (32)..(32)
 <223> N6-para-terc-butyl-bencil-dA
 <400> 9

 gtaaaaatag gtgatttgg tctagctaca gag 33
 10
 <210> 10
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <220>
 <221> base_modificada
 20 <222> (29)..(29)
 <223> N6-para-terc-butyl-bencil-dC
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (32)..(32)
 <223> N6-para-terc-butyl-bencil-dA
 25 <400> 10

 gtaaaaatag gtgatttgg tctagctaca gag 33

 <210> 11
 30 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (25)..(25)
 <223> N6-bencil-dA
 <400> 11
 40
 tagcctcaat tctaccatc cacia 25

 <210> 12
 <211> 33
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 <400> 12
 50
 agtaaaaata ggtgatttg gtctagctac aga 33

 <210> 13
 <211> 65
 55 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador-sonda sintético
 <400> 13
 60
cccgcgcgga cccactccat cgagagcgcg ggagtaaaaa tagtgattt tggcttagct 60
acaga 65

 <210> 14
 <211> 33

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (31)..(31)
 <223> N6-para-terc-butyl-bencil-dA
 <400> 14
 10 agtaaaaata ggtgatttg gtctagctac aga 33
 <210> 15
 <211> 65
 15 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador-sonda sintético
 <220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (63)..(63)
 <223> N6-para-terc-butyl-bencil-dA
 <400> 15

cccgcgcgga cccactccat cgagagcgcg ggagtaaaa tagtgattt tggctagct **60**
 25 **acaga** **65**
 <210> 16
 <211> 65
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador-sonda sintético
 <400> 16

cccgcgcgga cccactccat cgagagcgcg gggtaaaaat agtgatttt ggtctagcta **60**
 35 **cagag** **65**
 <210> 17
 <211> 65
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador-sonda sintético
 <220>
 <221> base_modificada
 45 <222> (62)..(62)
 <223> N6-para-terc-butyl-bencil-dA
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (64)..(64)
 50 <223> N6-para-terc-butyl-bencil-dA
 <400> 17

cccgcgcgga cccactccat cgagagcgcg gggtaaaaat agtgatttt ggtctagcta **60**
cagag **65**
 55 <210> 18
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 530 273 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Synthetic probe
<400> 18

tctcgatgga gtgggtcc 18

5

<210> 19
<211> 110
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 19

10

agtaaaaata ggtgattttg gtctagctac agagaaatct cgatggagtg ggtcccatca 60
gtttgaacag ttgtctggat ccattttgtg gatggtaaga attgaggcta 110

15

<210> 20
<211> 110
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 20

20

agtaaaaata ggtgattttg gtctagctac agtgaaatct cgatggagtg ggtcccatca 60
gtttgaacag ttgtctggat ccattttgtg gatggtaaga attgaggcta 110

REIVINDICACIONES

1. Un método de amplificación específica de alelo de una variante de una secuencia diana, en el que la amplificación implica la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la secuencia diana puede existir en forma de varias secuencias variantes, comprendiendo el método
- (a) hibridación de un primer y un segundo oligonucleótidos a la secuencia diana; en el que el primer oligonucleótido es al menos parcialmente complementario a la secuencia diana, y el segundo oligonucleótido es al menos parcialmente complementario sobre su porción 3' y 5' de la secuencia diana, y tiene al menos un nucleótido selectivo complementario a solo una variante de la secuencia diana, en el que dicho nucleótido selectivo se coloca internamente del extremo 3', y en donde dicho segundo oligonucleótido comprende al menos un nucleótido con una base covalentemente modificada en el grupo amino exocíclico, en el que el grupo amino exocíclico es el grupo amino en la posición 6 de la adenosina, en la posición 2 de la guanosina o en la posición 4 de la citidina;
- (b) proporcionar condiciones para la hibridación de dicho primer y segundo oligonucleótidos al menos a una variante de la secuencia diana, adecuada para la extensión del oligonucleótido por una polimerasa de ácido nucleico, en el que dicha polimerasa es capaz de extender dicho segundo oligonucleótido preferentemente cuando dicho segundo oligonucleótido se hibrida con dicha variante de la secuencia diana que es complementaria a dicho nucleótido selectivo, y sustancialmente menor cuando dicho segundo oligonucleótido se hibrida con dicha variante de la secuencia diana que no es complementaria a dicho nucleótido selectivo; y
- (c) repetir la secuencia de pasos de hibridación y extensión múltiples veces.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha polimerasa de ácido nucleico en el paso (b) es capaz de extender dicho segundo oligonucleótido exclusivamente cuando dicho nucleótido selectivo forma un par de bases con la diana.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho nucleótido selectivo está entre 1 y 5 nucleótidos cerca del extremo 3' del oligonucleótido.
4. El método de la reivindicación 1, que comprende además un paso (d) de detección del producto de extensión del cebador en el paso (c).
5. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha polimerasa de ácido nucleico se selecciona de un grupo que consiste de polimerasa de DNA Taq, polimerasa de DNA Z05, polimerasa de DNA Δ Z05 y polimerasa de DNA Δ Z05-Gold.
6. El método de la reivindicación 1, en el que dicha polimerasa de ácido nucleico posee actividad nucleasa 3'-5'.
7. El método de la reivindicación 6, en el que dicha polimerasa de ácido nucleico se selecciona de un grupo que consiste en polimerasa de DNA Pfu y Thermatoga Maritima.
8. El método de la reivindicación 1, en el que dicha variante de la secuencia en el paso (a) es una mutación V600E del gen BRAF, EGFR, PIK3CA o KRAS humano.
9. El método de la reivindicación 1, en el que dicho primer oligonucleótido es Id. de Sec. nº: 11.
10. El método de la reivindicación 1, en el que dicho segundo oligonucleótido se selecciona de un grupo que consiste en Id. de Sec. nº: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 y 17.
11. un método para detectar una variante de una secuencia diana, la secuencia diana existente en forma de varias secuencias variantes, comprendiendo el método:
- (a) hibridación de un primer y un segundo oligonucleótidos a la secuencia diana; en el que el primer oligonucleótido es al menos parcialmente complementario a la secuencia diana, y el segundo oligonucleótido es al menos parcialmente complementario sobre su porción 3' y 5' de la secuencia diana, y tiene al menos un nucleótido selectivo complementario a solo una variante de la secuencia diana, en el que dicho nucleótido selectivo se coloca internamente del extremo 3', y en donde dicho segundo oligonucleótido comprende al menos un nucleótido con una base covalentemente modificada en el grupo amino exocíclico, en el que el grupo amino exocíclico es el grupo amino en la posición 6 de la adenosina, en la posición 2 de la guanosina o en la posición 4 de la citidina;
- (b) proporcionar condiciones para la hibridación de dicho primer y segundo oligonucleótidos al menos a una variante de la secuencia diana, adecuada para la extensión del oligonucleótido por una polimerasa de ácido nucleico, en el que dicha polimerasa es capaz de extender dicho segundo oligonucleótido preferentemente cuando dicho segundo oligonucleótido se hibrida con dicha variante de la secuencia diana que es complementaria a dicho nucleótido selectivo, y sustancialmente menor cuando dicho segundo oligonucleótido se hibrida con dicha variante de la secuencia diana que no es complementaria a dicho nucleótido selectivo;
- (c) repetir la secuencia de pasos de hibridación y extensión múltiples veces; y

(d) detectar los productos de dicha extensión de oligonucleótido, en el que la extensión significa la presencia de la variante de una secuencia diana a la que dicho segundo oligonucleótido posee un nucleótido selectivo complementario.

5 12. Un equipo para la amplificación específica de alelo de una secuencia diana, en el que la amplificación implica la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), dicha secuencia diana existente en forma de varias variantes de secuencia, el equipo comprende:

(a) un primer oligonucleótido, en menos parcialmente complementario a la secuencia diana;

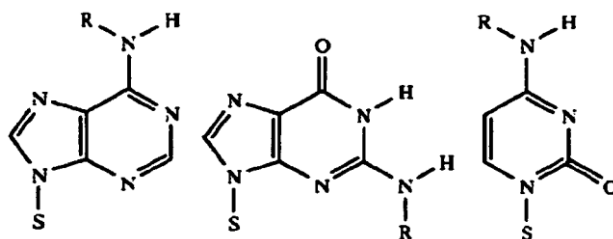
10 (b) un segundo oligonucleótido, al menos parcialmente complementario sobre su porción 3' y 5' a la secuencia diana que tiene al menos un nucleótido selectivo complementario a solo una variante de la secuencia diana, en el que dicho nucleótido selectivo se coloca internamente del extremo 3', y en donde dicho segundo oligonucleótido comprende al menos un nucleótido con una base covalentemente modificada en el grupo amino exocíclico, en el que el grupo amino exocíclico es el grupo amino en la posición 6 de la adenosina, en la posición 2 de la guanosina o en la posición 4 de la citidina; y

15 (c) una polimerasa de ácido nucleico, nucleósidos trifosfato, tampón adecuado para la extensión de los ácidos nucleicos por la polimerasa de ácido nucleico y un conjunto de instrucciones para realizar la amplificación específica de alelo.

20 13. Un oligonucleótido para realizar una amplificación específica de alelo de una secuencia diana, en el que la amplificación implica la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), dicha secuencia diana existe en forma de varias variantes de secuencias, el oligonucleótido comprende

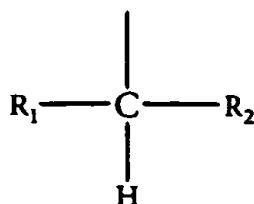
(a) una secuencia al menos parcialmente complementaria sobre su porción 3' y 5' a una porción de dicha secuencia diana;

25 (b) al menos un nucleótido selectivo complementario a sólo una variante de la secuencia diana, en el que dicho nucleótido selectivo se coloca internamente del extremo 3', y en el que dicho oligonucleótido comprende al menos un nucleótido con una base covalentemente modificada en el grupo amino exocíclico, en el que las estructuras de un nucleótido con una base covalentemente modificada en el grupo amino exocíclico se selecciona del grupo que consiste en:



35 en el que S representa una porción de azúcar, y R representa un grupo modificador, en el que dicho nucleótido modificado aparece en las posiciones -5, -4, -3, -2 o -1 en relación con el extremo 3'.

14. El oligonucleótido de la reivindicación 13, en el que dicha base covalentemente modificada en el grupo amino exocíclico comprende un modificador de la siguiente fórmula:



40 en el que R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alcoxi, arilo y fenoxi sustituidos o sin sustituir.

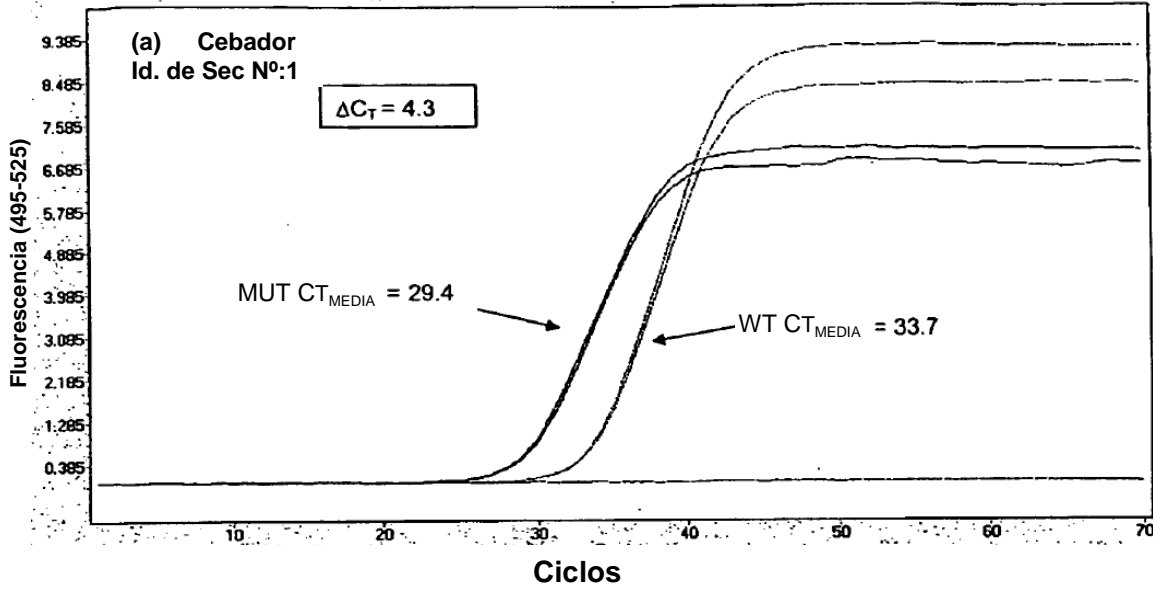
45 15. El oligonucleótido de la reivindicación 13, en donde dicha base, covalentemente modificada en el grupo amino exocíclico se selecciona de un grupo que consiste de N⁶-bencil-adenina, N⁶-para-terc-butyl-bencil adenina, N²-alquil-guanina y N⁴-bencilcitosina.

50 16. El oligonucleótido de la reivindicación 13, con una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en Id. de Sec. nº: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 y 17.

17. Una mezcla de reacción para la amplificación específica de alelo de una secuencia diana, en el que la amplificación implica la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), dicha secuencia diana existe en forma de varias variantes de secuencia, la mezcla comprende:

- 5 (a) un primer oligonucleótido al menos parcialmente complementario a la secuencia diana;
(b) un segundo oligonucleótido al menos parcialmente complementario sobre su porción 3' y 5' a la secuencia diana que tiene al menos un nucleótido complementario selectivo de a solo una variante de la secuencia diana, en el que dicho nucleótido selectivo se coloca internamente del extremo 3', y en donde dicho segundo oligonucleótido comprende al menos un nucleótido con una base covalentemente modificada en el grupo amino exocíclico, en el que
- 10 el grupo amino exocíclico es el grupo amino en la posición 6 de la adenosina, en la posición 2 de la guanosina o en la posición 4 de la citidina; y una polimerasa de ácido nucleico, nucleósidos trifosfato y un tampón adecuado para la extensión de los ácidos nucleicos por la polimerasa de ácido nucleico.

FIGURA 1-1
Curvas de amplificación



Curvas de amplificación

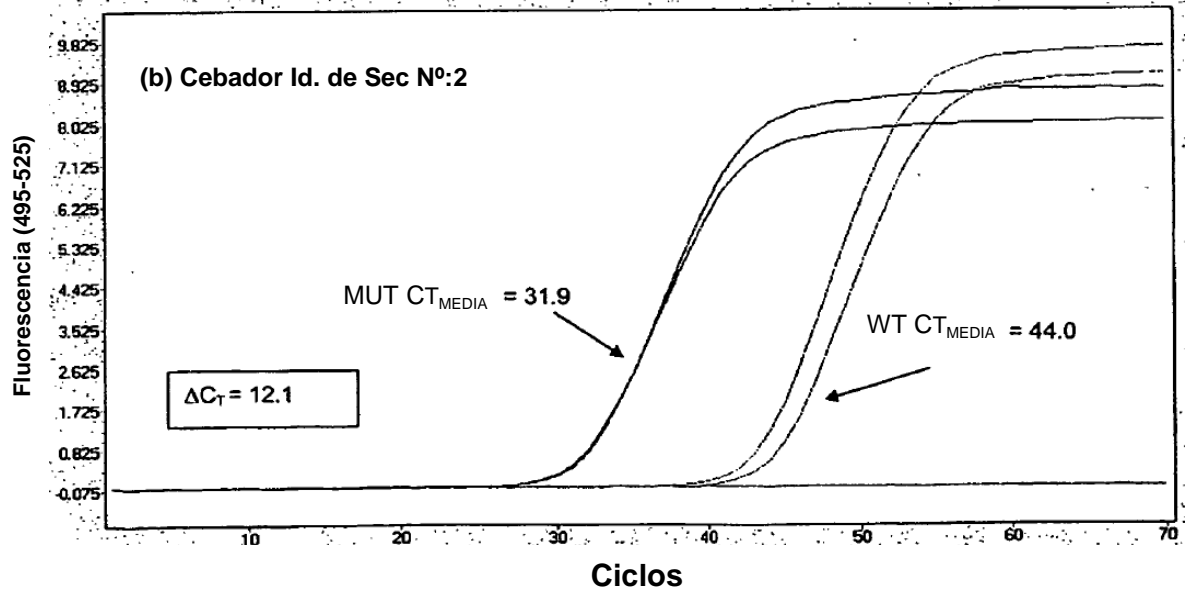
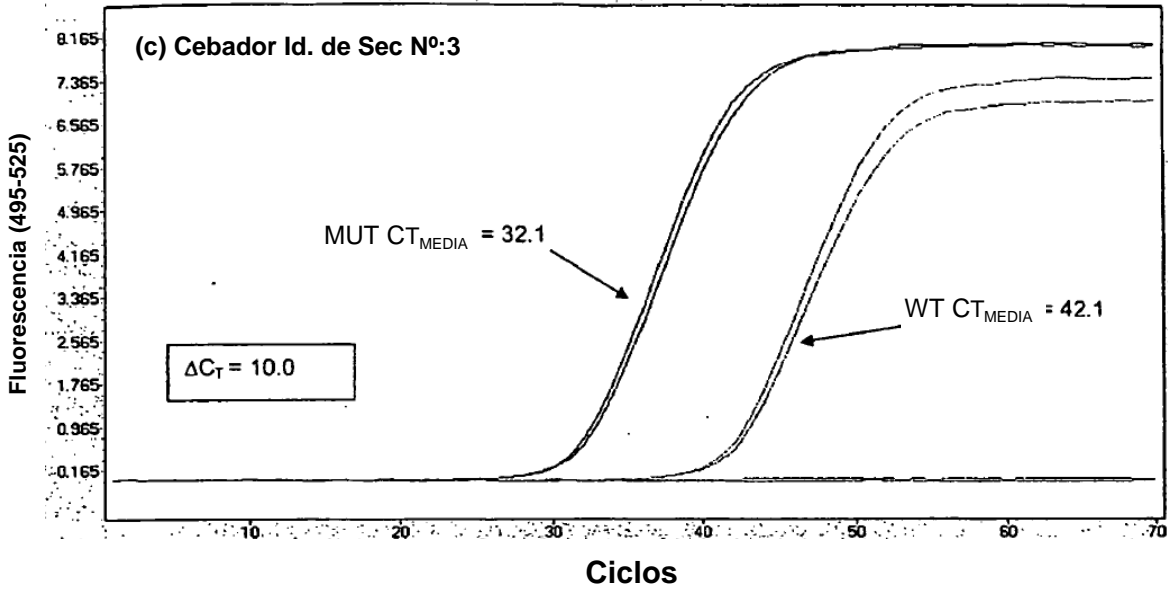


FIGURA 1-2

Curvas de amplificación



Curvas de amplificación

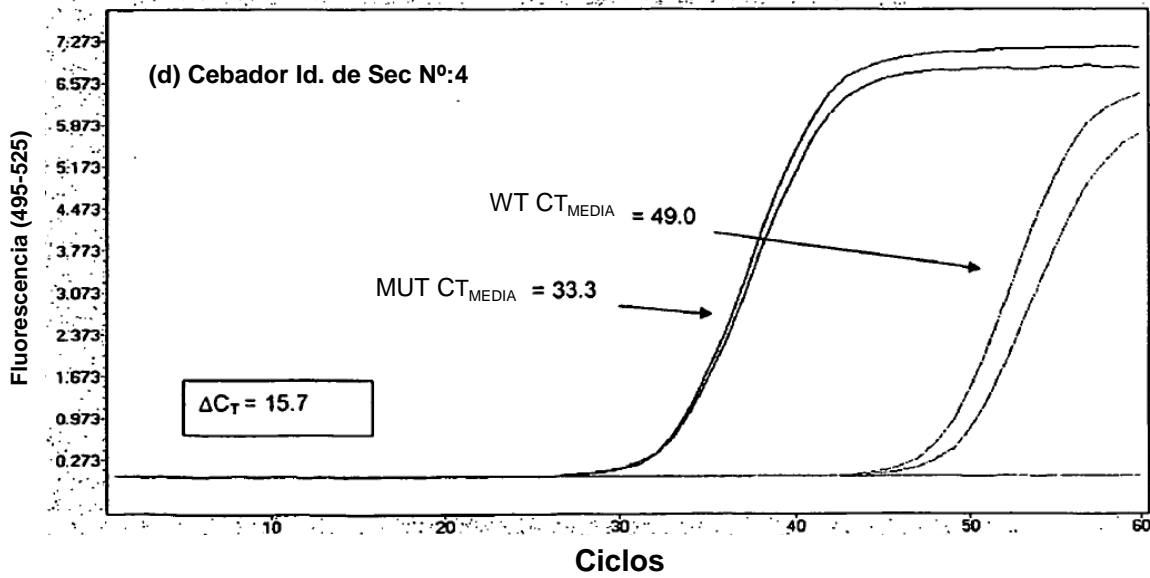
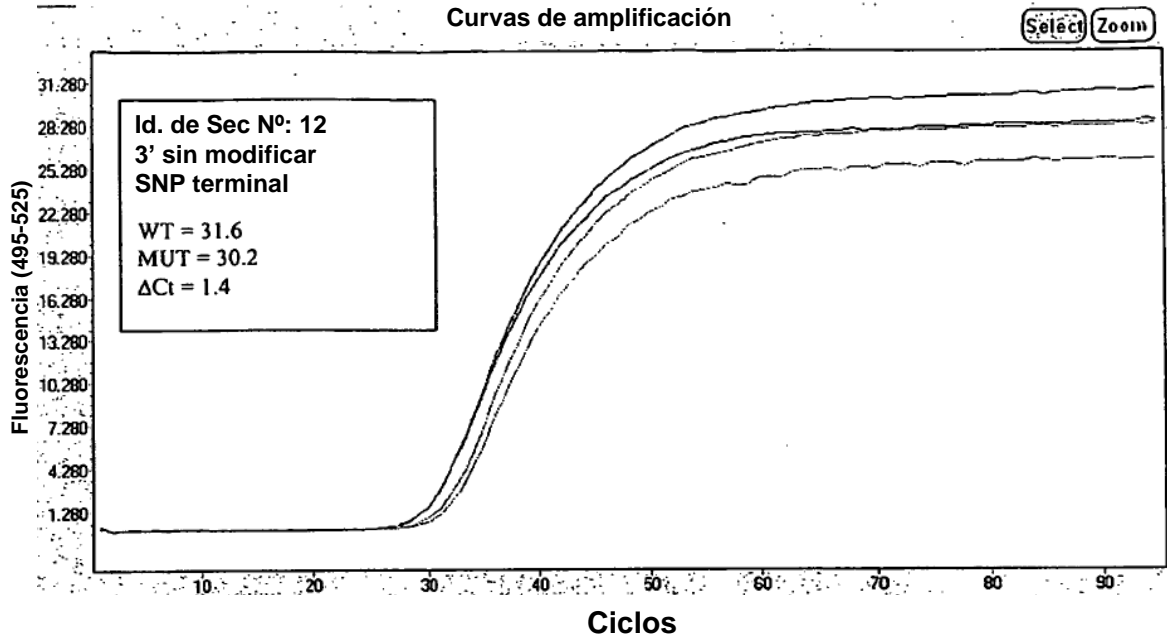


FIGURA 2-1

Curvas de amplificación



Curvas de amplificación

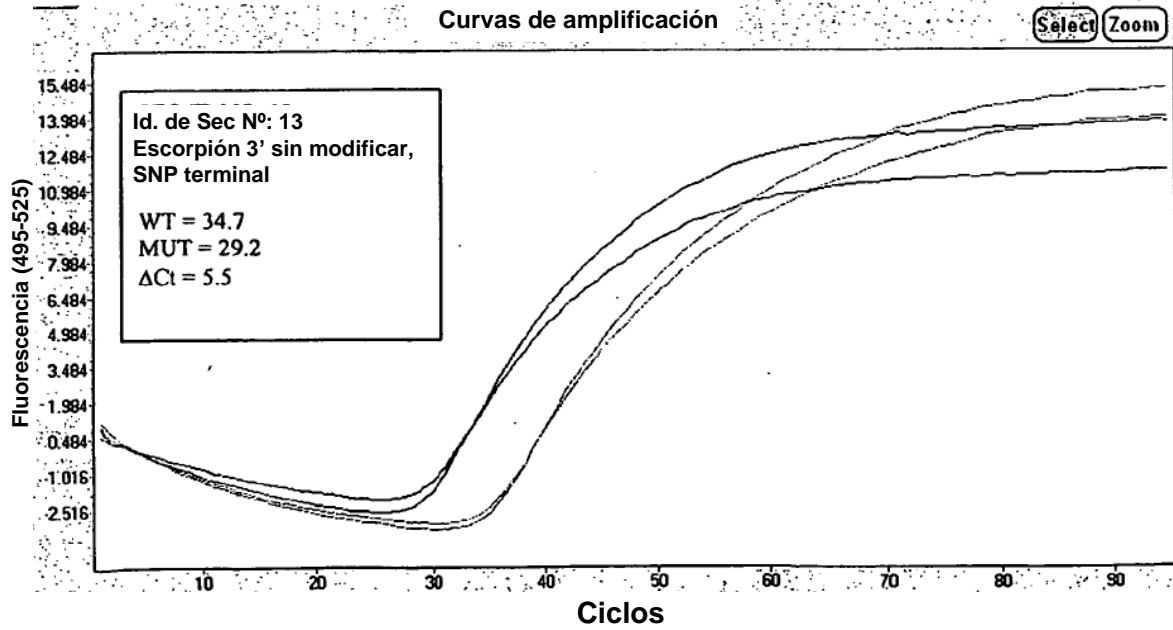


FIGURA 2-2

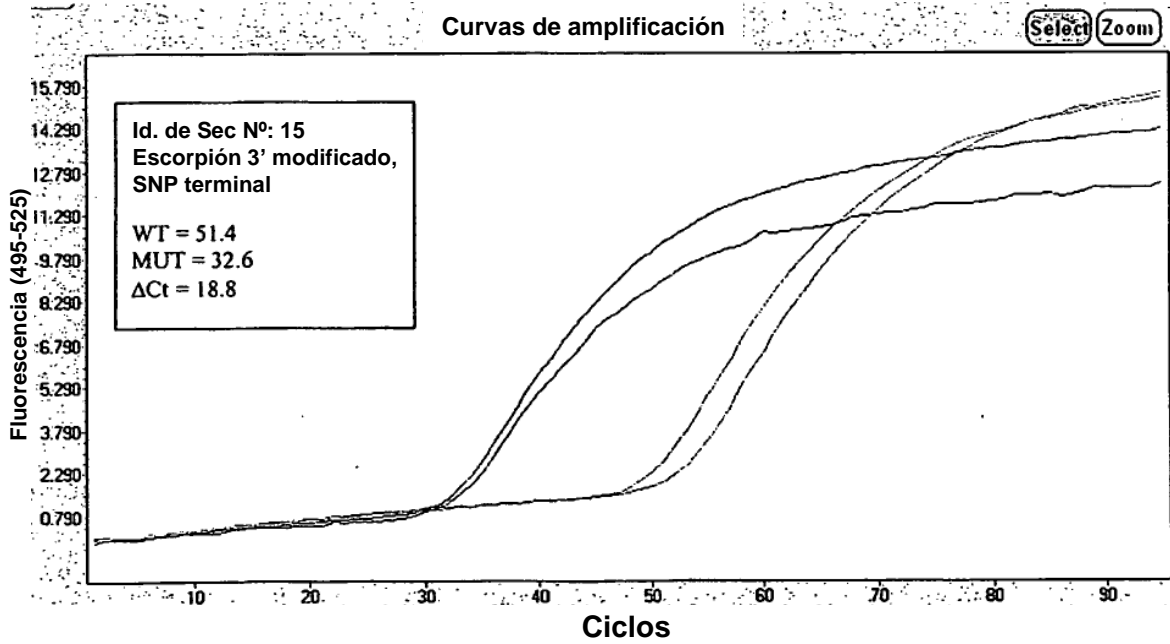
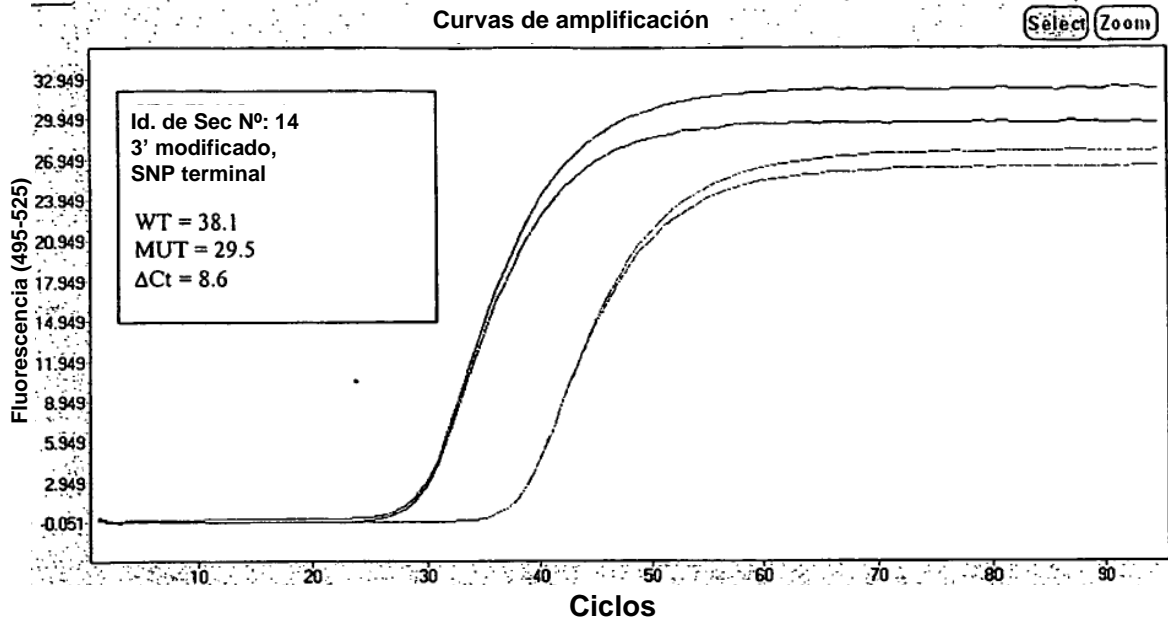


FIGURA 3-1

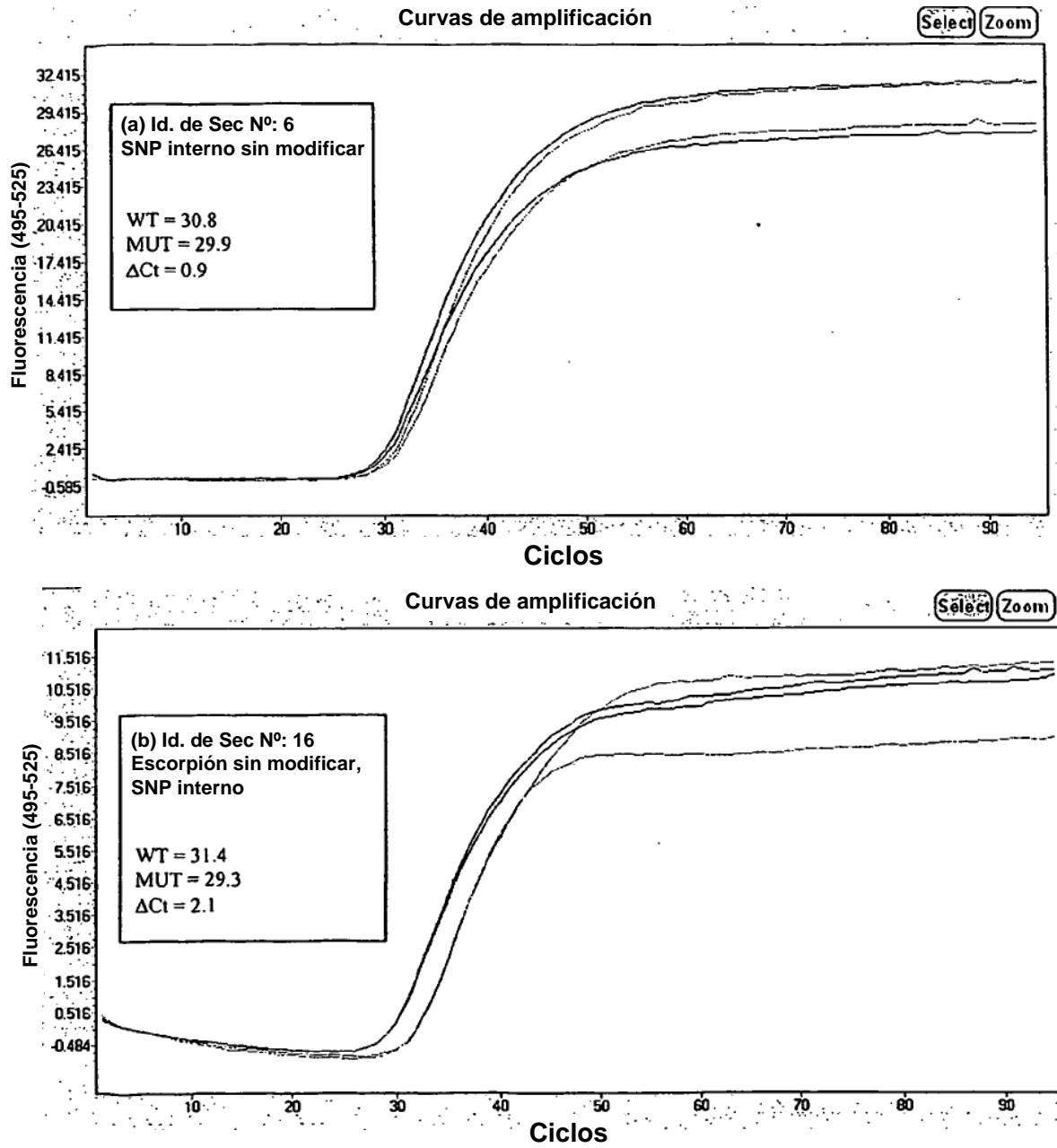


FIGURA 3-2

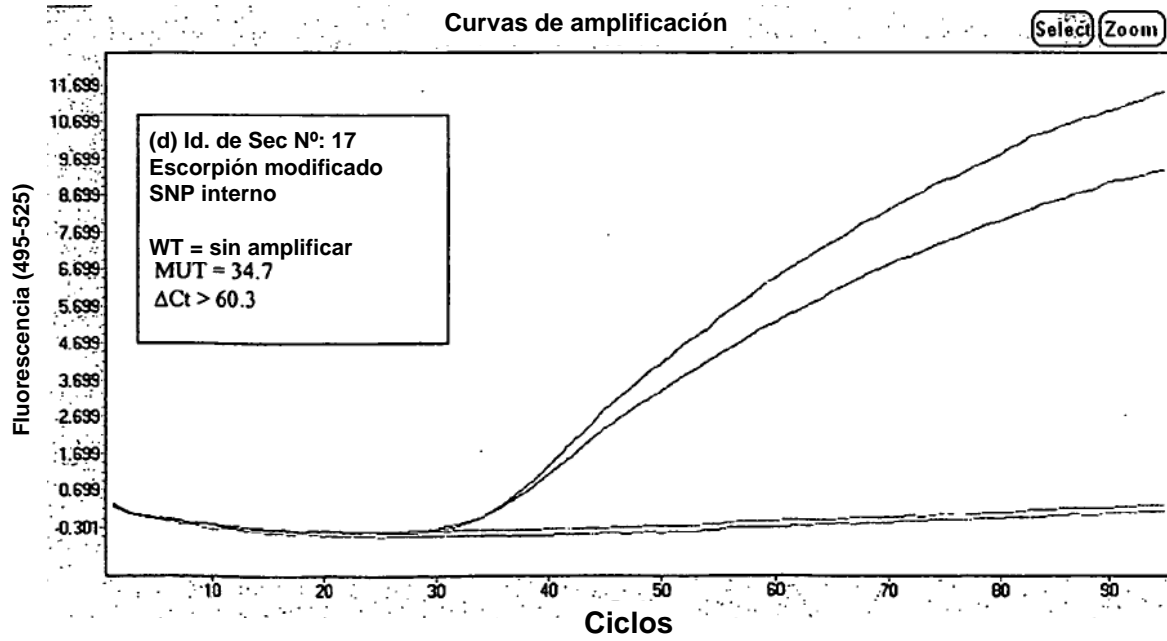
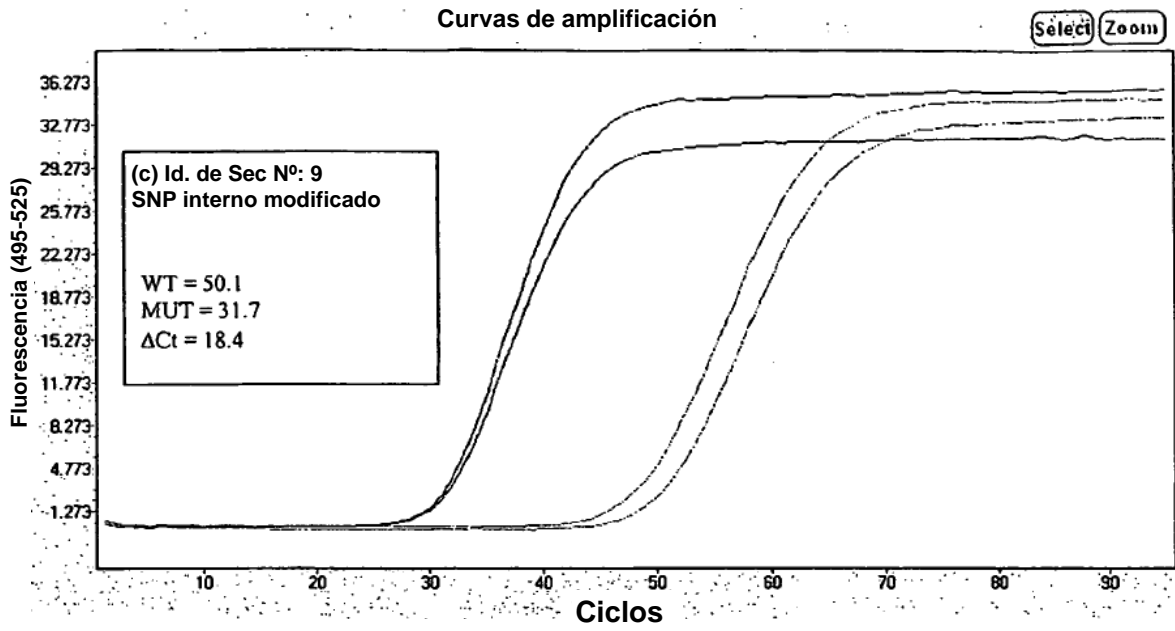
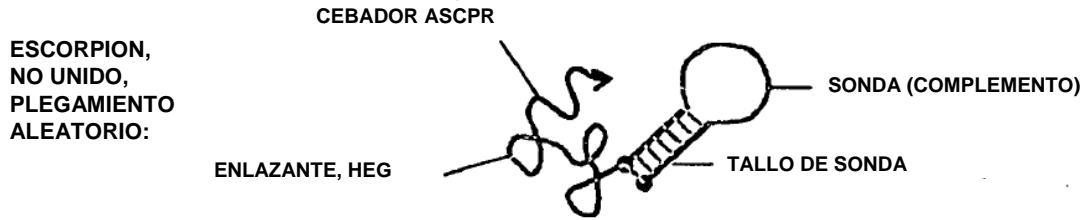


FIGURA 4

ESCORPION ARMS (UNIMOLECULAR, FORMATO CERRADO)



ESCORPION,
UNIDO:

