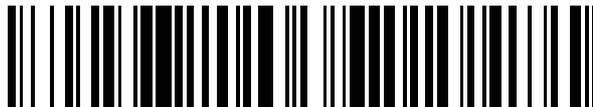


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 789**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2008 E 08785392 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 2173910**

54 Título: **Supresión de la amplificación usando un oligonucleótido y una polimerasa que carece significativamente de actividad exonucleasa 5'-3'**

30 Prioridad:

08.08.2007 US 964089 P

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

08.03.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

NEWTON, NICOLAS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 562 789 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

Supresión de la amplificación usando un oligonucleótido y una polimerasa que carece significativamente de actividad exonucleasa 5'-3'

5 Antecedentes de la invención

10 Existen numerosos ejemplos de la necesidad de una clasificación/identificación rápida y fiable de ácidos nucleicos, especialmente en campos como la medicina. Por ejemplo, muchas enfermedades incluyendo el cáncer son el resultado de mutaciones raras. La detección de estas mutaciones puede ayudar en las determinaciones de diagnóstico y pronóstico.

15 Además, pueden ser útiles métodos rápidos y fiables de genotipado en la determinación de la composición de alelos dentro y entre individuos. Por ejemplo, la clasificación fiable de los alelos específicos en un individuo puede ayudar en el consejo genético en seres humanos y puede incluso ayudar en la planificación de un tratamiento profiláctico en casos en los que se detectan alelos específicos. La identificación de alelos particulares también es extremadamente útil en la realización de la selección asistida por marcadores, por ejemplo, programas de cría en cultivos o animales, la identificación o la genotipificación de patógenos y otros organismos.

20 Breve resumen de la invención

25 Esta invención proporciona métodos para detectar una secuencia diana en un polinucleótido en una muestra biológica, en el que la muestra puede, o alternativamente, contiene también un segundo polinucleótido que comprende una segunda secuencia, en la que la segunda secuencia difiere de la secuencia diana por uno a cuatro nucleótidos(s). Los métodos comprenden,

30 i. Poner en contacto la muestra con un oligonucleótido bloqueador bajo condiciones de la reacción de extensión del cebador para permitir la hibridación del oligonucleótido bloqueador a la segunda secuencia y la secuencia diana, si está presente

30 ii., Poner en contacto la muestra en presencia del oligonucleótido bloqueador hibridado con al menos un cebador y una polimerasa que carece significativamente de actividad exonucleasa 5'-3' en condiciones tales que se produce la extensión del cebador dependiente del molde, en el que el cebador se hibrida con los polinucleótidos, si está presente, corriente arriba de la secuencia que hibrida con el oligonucleótido bloqueador;

35 en el que el oligonucleótido bloqueador hibrida con la segunda secuencia lo suficiente como para impedir la amplificación de la segunda secuencia por la polimerasa, en el que el oligonucleótido bloqueador no comprende un nucleótido intercalante, en el que la hibridación del oligonucleótido bloqueador a la secuencia diana no afecta significativamente la amplificación de la secuencia diana por la polimerasa que carece de manera significativa de actividad nucleasa 5'-3' y además en la que el oligonucleótido bloqueador es totalmente complementario a la secuencia diana excepto para la posición de uno a 4 nucleótido(s).

40 También se describe en el presente documento las mezclas de reacción. En algunas realizaciones, las mezclas de reacción comprenden: una polimerasa que carece significativamente de actividad exonucleasa 5'-3'; un polinucleótido que comprende una secuencia diana; un polinucleótido que comprende una segunda secuencia, en donde la segunda secuencia difiere de la secuencia diana por al menos un nucleótido; y un oligonucleótido bloqueador que se hibrida a la segunda secuencia y la secuencia diana; en el que el oligonucleótido bloqueador hibrida con la segunda secuencia lo suficiente como para impedir la amplificación de la segunda secuencia por la polimerasa bajo condiciones adecuadas para la amplificación en ausencia del oligonucleótido bloqueador, pero la hibridación del oligonucleótido a la secuencia diana no impide significativamente la amplificación de la secuencia diana por la polimerasa que carece significativamente de actividad nucleasa 5'-3'.

45 También se describen en este documento los equipos. En algunas realizaciones, los equipos comprenden una polimerasa que carece significativamente de actividad exonucleasa 5'-3'; un polinucleótido que comprende una secuencia diana; un polinucleótido que comprende una segunda secuencia, en donde la segunda secuencia difiere de la secuencia diana por al menos un nucleótido; y un oligonucleótido bloqueador que hibrida con la segunda secuencia y la secuencia diana, en el que el oligonucleótido bloqueador hibrida con la segunda secuencia lo suficiente como para impedir la amplificación de la segunda secuencia por la polimerasa bajo condiciones adecuadas para la amplificación en ausencia del oligonucleótido bloqueador, pero la hibridación del oligonucleótido a la secuencia diana no impide significativamente la amplificación de la secuencia diana por la polimerasa que carece significativamente de actividad nucleasa 5'-3'.

50 De acuerdo con los métodos de la invención, el oligonucleótido bloqueador no comprende un nucleótido de intercalación.

65 En los métodos de la invención, así como en los equipos o mezclas descritas en el presente documento, el oligonucleótido bloqueador hibrida con la segunda secuencia lo suficiente como para impedir la amplificación de la

segunda secuencia por la polimerasa que carece significativamente de actividad nucleasa 5'-3' pero no hibrida lo suficiente como para impedir la amplificación de una polimerasa que posee actividad nucleasa 5'-3'.

En realizaciones preferidas de la invención, la secuencia diana está entre 5 -100 nucleótidos de largo.

En los métodos de la invención, así como en los equipos o mezclas descritas en el presente documento, la muestra comprende la secuencia diana y la segunda secuencia. Preferiblemente, la segunda secuencia está presente en la muestra a una concentración de por lo menos diez veces mayor que la concentración de la secuencia diana. La concentración de la secuencia diana y la segunda secuencia de los métodos, equipos o mezclas descritos en este documento está preferiblemente en una relación de aproximadamente 1:1.

Los polinucleótidos de acuerdo con la invención son, en particular, DNA genómico. Preferiblemente, los polinucleótidos son RNA.

El oligonucleótido bloqueador que se usa en los métodos de la invención, así como en los equipos o mezclas descritas en este documento está por lo general marcado de forma detectable. Preferiblemente, se detecta el oligonucleótido bloqueador marcado de forma detectable en tiempo real de acuerdo con la invención, detectando de este modo la amplificación de la secuencia diana.

En los métodos de la invención, así como en los equipos o mezclas descritas en este documento, puede haber una sola diferencia de nucleótidos entre la segunda secuencia y la secuencia diana y el oligonucleótido bloqueador es totalmente complementario a la secuencia diana excepto en la posición de un solo nucleótido. Según la invención, puede haber 2-4 diferencias de nucleótidos entre la segunda secuencia y la secuencia diana y el oligonucleótido bloqueador es totalmente complementario a la secuencia diana excepto en las posiciones de los nucleótidos 2-4.

En los métodos de la invención, así como en los equipos o mezclas descritas en el presente documento, la diferencia entre (1) la temperatura de fusión del oligonucleótido bloqueador y la segunda secuencia; y (2) la temperatura de fusión del oligonucleótido bloqueador y la secuencia diana, es de al menos 5 °C según se mide en glicerol 2,5%, Tricina 50 mM pH 8,3, acetato de potasio 45 mM. En realizaciones preferidas de los métodos, equipos o mezclas descritas en el presente documento, la Tm del oligonucleótido bloqueador para la segunda secuencia es no más de 20 °C más alta que la Tm del oligonucleótido bloqueador para la secuencia diana como se mide en glicerol 2,5%, Tricina 50 mM pH 8,3, acetato de potasio 45 mM.

En los métodos de la invención, así como en los equipos o mezclas descritas en el presente documento, el oligonucleótido bloqueador comprende al menos un nucleótido no natural no intercalante, en el que el nucleótido no natural aumenta la temperatura de fusión del oligonucleótido bloqueador en comparación a un oligonucleótido de control que es por lo demás idéntico al oligonucleótido bloqueador excepto que tiene un nucleótido natural en el lugar del nucleótido no natural.

Los oligonucleótidos bloqueadores de acuerdo con la invención pueden comprender al menos una porción no nucleotídica, en donde la porción no nucleotídica aumenta la temperatura de fusión del oligonucleótido bloqueador en comparación con un oligonucleótido de control que es por lo demás idéntico al oligonucleótido bloqueador excepto que carece de la fracción no nucleotídica. Se prefiere que los métodos de la invención, así como en los equipos o mezclas descritas en el presente documento, que la porción no nucleotídica se una a un surco menor del DNA.

En realizaciones preferidas, el oligonucleótido bloqueador hibrida con la segunda secuencia con una temperatura de fusión de al menos 70 °C según se mide en glicerol 2,5%, Tricina 50 mM pH 8,3, acetato de potasio 45 mM.

Los métodos conocidos en la técnica para detectar mutaciones en un polinucleótido, en el que se utilizan bloqueadores de oligonucleótido no extensibles y polimerasas de DNA que carecen de exonucleasa 5'. Los oligonucleótidos bloqueadores solicitados no son, sin embargo, totalmente complementarios a la secuencia diana excepto por la formación nucleótido(s) no coincidentes para inhibir la amplificación de una secuencia (Pat. EE.UU. N° 5.849.497; WO 02/086155) o el nucleótido bloqueador no hibrida con la secuencia diana bajo condiciones de la reacción de extensión del cebador (Domínguez et al., Oncogene 24: 6830 6834 (2005))

Definiciones

Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un oligonucleótido" incluye una pluralidad de oligonucleótidos; la referencia a "una sonda" incluye mezclas de tales sondas, y similares.

Tal como se utiliza aquí, una "muestra biológica" se refiere a cualquier sustancia que contenga o presunta de contener ácido nucleico (por ejemplo, a partir de una bacteria, virus, biopsia de tejido, etc.). La muestra se puede obtener por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Tal muestra puede ser una cantidad de tejido o

fluido, o una fracción purificada de la misma, aislado de un individuo o individuos, incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, la piel, plasma, suero, sangre completa, fluido espinal, saliva, fluido peritoneal, líquido linfático, el humor acuoso o vítreo, el líquido sinovial, la orina, las lágrimas, las células de sangre, productos sanguíneos, el semen, el líquido seminal, fluidos vaginales, derrame pulmonar, líquido seroso, órganos, lavado bronco-alveolar, tumores, tejidos embebidos en parafina, etc. Las muestras también pueden incluir constituyentes y componentes de cultivos celulares in vitro, incluyendo, pero sin limitarse a, medio acondicionado resultante del crecimiento de células en el medio de cultivo celular, células recombinantes, componentes celulares, etc. Un ácido nucleico puede obtenerse a partir de una muestra biológica mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

Un "oligonucleótido bloqueador" tal como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido que:

(1) forma un dúplex con una secuencia diana a una temperatura de fusión suficientemente baja para permitir que una polimerasa que carece significativamente de actividad exonucleasa 5'-3' para desplazar el oligonucleótido bloqueador y replicar la secuencia diana; y

(2) forma un dúplex con una segunda secuencia que es una variante de la secuencia diana a una temperatura suficientemente alta de fusión para impedir a una polimerasa que carece significativamente de actividad exonucleasa 5'-3' de la replicación de la secuencia diana.

El oligonucleótido bloqueador puede, pero no necesita, incluir una modificación en el extremo 3' para prevenir la extensión 3' del oligonucleótido bloqueador por una polimerasa.

Una "secuencia diana" se refiere a una secuencia de polinucleótido a ser detectado en una muestra biológica y es la región (una subsecuencia o secuencia) de un ácido nucleico que es total o parcialmente complementaria a la región de hibridación de un oligonucleótido bloqueador. La "secuencia diana" puede ser de cualquier longitud de al menos 5 nucleótidos de longitud. La secuencia diana puede ser una porción de una secuencia génica más grande u otra secuencia a detectar.

La frase "impedir la amplificación" se refiere a la eliminación, la inhibición o reducción medible de la amplificación de una secuencia. Como se describe aquí, mediante la selección de un oligonucleótido bloqueador que tiene una temperatura de fusión más alta para una variante de la diana que para la diana, es posible impedir la amplificación de la variante de la diana, permitiendo de este modo mejorar la amplificación y detección de la secuencia diana.

Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan indistintamente, y se refieren a un polímero de monómeros de ácidos nucleicos de ribosa (RNA) o polímeros de ácidos nucleicos de desoxirribosa (DNA) o análogos de los mismos. Esto incluye polímeros de nucleótidos, tales como RNA y DNA, así como formas modificadas de los mismos, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), y similares. En ciertas solicitudes, el ácido nucleico puede ser un polímero que incluye múltiples tipos de monómeros, por ejemplo, ambas subunidades de RNA y DNA. Un ácido nucleico puede ser o incluir, por ejemplo, un cromosoma o segmento de cromosoma, un vector (por ejemplo, un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero de DNA o RNA desnudo, un amplicón, un oligonucleótido, un cebador, una sonda, etc. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, de cadena sencilla o de doble hebra, o híbridos DNA: RNA, DNA y RNA estructuras químicas. No hay distinción prevista en longitud entre el término "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido", y los términos se pueden utilizar indistintamente en el presente documento a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Tales términos se refieren sólo a la estructura primaria de la molécula.

La "extensión de un cebador" se refiere a la capacidad de un biocatalizador de incorporar nucleótidos, tal como una polimerasa, para añadir nucleótidos al extremo 3' terminal de un cebador de una manera específica de molde. La extensión no sólo se refiere al primer nucleótido añadido al extremo 3' de un cebador, sino también incluye cualquier extensión adicional de un polinucleótido formado por el cebador extendido.

Un ácido nucleico es típicamente monocatenario o bicatenario y generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, como se indica en el presente documento, se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener cadenas principales alternativas, incluyendo, por ejemplo y sin limitación, fosforamida (Beaucage et al. (1993) *Tetrahedron* 49 (10): 1925 y las referencias en él; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35: 3800; Sprinzl et al. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81: 579; Letsinger et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 3487; Sawai et al. (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470; y Pauwels et al. (1986) *Chemica Scripta* 26: 1419), fosforotioato (Mag et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 1437 y la patente de EE.UU. N° 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111: 2321), los enlaces O-metilfosforoamidita (Eckstein, *Oligonucleotides and analogues: A practical Approach*, Oxford University Press (1992)), y esqueletos peptídicos de ácidos nucleicos y enlaces (Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114: 1.895; Meier et al. (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31: 1008; Nielsen (1993) *Nature* 365: 566; y Carlsson et al. (1996) *Nature* 380: 207). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con cadenas principales cargadas positivamente; (Denpcy et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097); esqueletos no iónicos (patentes estadounidenses números 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Angew (1991) *Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470; Letsinger et al. (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13: 1597; capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in

Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghvi y P. Dan Cook; Mesmaeker et al. (1994) *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 395; Jeffs et al. (1994) *J. Biomolecular NMR* 34:17; *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) y esqueletos no-ribosa, incluyendo los descritos en las patentes de EE.UU. N° 5.235.033 y 5.034.506, y los capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Ed. Y. S. Sanghvi y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se incluyen dentro de la definición de los ácidos nucleicos (Jenkins et al. (1995) *Chem. Soc. Rev.* pp 169-176). Varios análogos de ácidos nucleicos también se describen en, por ejemplo, Rawls, C & E News 2 de junio 1997 página 35. Estas modificaciones del esqueleto de fosforibosa se pueden hacer para facilitar la adición de porciones adicionales tales como porciones de marcaje, o para alterar la estabilidad y vida media de tales moléculas en entornos fisiológicos.

Además de las bases heterocíclicas de origen natural que se encuentran típicamente en los ácidos nucleicos (por ejemplo, adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), los análogos de ácidos nucleicos también incluyen aquellos que poseen bases heterocíclicas no natural u otras bases modificadas, muchos de los cuales se describen, o se hace referencia de otro modo, en el presente documento. En particular, muchas bases no naturales se describen adicionalmente en, por ejemplo, Seela et al. (1991) *Helv. Chim. Acta* 74: 1790, Grein et al. (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4: 971-976, y Seela et al. (1999) *Helv. Chim. Acta* 82: 1640. Para ilustrar adicionalmente, se incluyen opcionalmente ciertas bases usadas en nucleótidos que actúan como modificadores de la temperatura de fusión (T_m). Por ejemplo, algunos de estos incluyen 7-deazapurinas (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, la Patente de EE.UU. N° 5.990.303, titulada "Síntesis de nucleótidos 7-deaza-2'-desoxiguanosina", que se depositó el 23 de noviembre 1999 por Seela. 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 de 7-deaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitosina; 5-fluorocitosina; 5-clorocitosina; 5-yodocitosina; 5-bromocitosina; 5- metilcitosina; 5-propinilcitosina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluorouracilo; 5-clorouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracilo, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 7-desazaadenina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 7-desazaguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-6-N-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, uracil-5-oxiacetato de metilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina, y 5-propinil pirimidina, y similares.

Ejemplos adicionales de bases y nucleótidos modificados también se describen en, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.484.908, titulada "oligonucleótidos que contienen 5-propinil pirimidinas," depositada el 16 de enero de 1996 por Froehler et al., Pat. EE.UU. N° 5.645.985, titulada "formación mejorada de la triple hélice y doble hélice con oligómeros que contienen pirimidinas modificadas," depositada el 8 de julio de 1997 por Froehler et al., Patente de EE.UU. N° 5.830.653, titulada "Métodos de utilización de oligómeros que contienen pirimidinas modificadas", depositada el 3 de noviembre 1998 por Froehler et al., Patente de EE.UU. N° 6.639.059, titulado "Síntesis de [2.2.1] biciclo nucleósidos" depositada el 28 de octubre de 2003 por Kochkine et al., Patente de EE.UU. N° 6.303.315, titulada "Preparación de muestras en un paso y detección de ácidos nucleicos en muestras biológicas complejas", depositada el 16 de octubre de 2001 por Skouv, y Sol. de Publicación de Pat. de EE.UU. N° 2003/0092905, titulada "Síntesis de [2.2.1] biciclo nucleósidos," por Kochkine et al. que se publicó el 15 de mayo 2003.

No se pretende que la presente invención esté limitada por la fuente de un ácido nucleico, polinucleótido o oligonucleótido. Tal ácido nucleico puede ser de una línea celular humana o mamífero no humano, o cualquier otro organismo (por ejemplo, planta, anfibio, bacteria, virus, micoplasmas, etc.), tejido, o derivar de cualquier fuente recombinante, sintetizada in vitro o mediante síntesis química. Una vez más, el ácido nucleico puede ser DNA, RNA, DNAc, DNA-RNA, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico peptídico (PNA), un híbrido o cualquier mezcla de los anteriores. El ácido nucleico puede existir en una forma de doble cadena, de cadena simple o parcialmente bicatenario. Los ácidos nucleicos de la invención incluyen tanto ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, en formas purificadas o no purificadas, incluyendo genes, cromosomas, plásmidos, los genomas de material biológico tal como microorganismos, por ejemplo, bacterias, levaduras, virus, viroides, mohos, hongos, plantas, animales, seres humanos, micoplasmas, y similares.

Las "condiciones de extensión de la reacción en cadena de la polimerasa" se refieren a condiciones bajo las cuales los cebadores que hibridan con un molde de ácido nucleico se prolonga por una polimerasa durante un paso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los expertos en la técnica apreciarán que tales condiciones pueden variar, y generalmente están influenciadas por la fuerza iónica y la temperatura. Varias condiciones de hibridación de la PCR se describen en, por ejemplo, *PCR Strategies* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y eds, 1,995, Academic Press, San Diego, CA). En el capítulo 14; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White eds., Academic Press, Nueva York, 1990).

Un ácido nucleico es "complementario" en relación con otro ácido nucleico cuando al menos un segmento de ácido nucleico (es decir, al menos dos bases contiguas) puede combinar en una asociación antiparalela o hibridar con al menos una subsecuencia de otro ácido nucleico para formar un dúplex. La asociación antiparalela puede ser intramolecular, por ejemplo, en la forma de un bucle de horquilla dentro de un ácido nucleico, o intermolecular, como por ejemplo cuando dos o más ácidos nucleicos de cadena sencilla se hibridan entre sí. En el contexto de la presente invención, para un oligonucleótido que es "totalmente complementario" a la secuencia en particular, cada base del oligonucleótido es complementario a las bases correspondientes en la secuencia particular de una manera anti-paralela. Ciertas bases que no se encuentran comúnmente en ácidos nucleicos naturales pueden ser incluidas en los ácidos nucleicos de la presente invención e incluyen, por ejemplo, inosina, 7-desazaguanina y los discutidos anteriormente. En algunas realizaciones, la complementariedad no es perfecta (es decir, los ácidos nucleicos pueden ser "parcialmente complementarios" en lugar de "totalmente complementarios"). Los dúplex estables, por ejemplo, pueden contener pares de bases no coincidentes o desemparejadas.

Un "cebador de ácido nucleico" o "cebador" es un ácido nucleico que puede hibridar con un ácido nucleico diana o molde y permite la extensión de la cadena o elongación usando, por ejemplo, un biocatalizador que incorpora nucleótidos, tal como una polimerasa en condiciones de reacción apropiadas. Tales condiciones incluyen normalmente la presencia de uno o más desoxirribonucleósidos trifosfato y el biocatalizador que incorpora nucleótidos, en un tampón adecuado ("tampón" incluye sustituyentes que son cofactores, o que afectan el pH, la fuerza iónica, etc.), y a una temperatura adecuada. Un cebador de ácido nucleico es típicamente un oligonucleótido natural o sintético (por ejemplo, un oligodesoxirribonucleótido de cadena sencilla, etc.). Aunque otras longitudes de cebadores de ácidos nucleicos se utilizan opcionalmente, que típicamente comprenden regiones de hibridación que van desde aproximadamente 6 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Los cebadores de ácidos nucleicos cortos generalmente requieren temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con los ácidos nucleicos molde. Un cebador de ácido nucleico que es al menos parcialmente complementario a una subsecuencia de un ácido nucleico molde es normalmente suficiente para hibridar con el molde para que se produzca la extensión. El diseño de cebadores adecuados para, por ejemplo, la amplificación de una secuencia diana dada es muy conocido en la técnica y está descrito en la literatura citada en este documento. Un cebador de ácido nucleico puede marcarse, si se desea, mediante la incorporación de un marcador detectable mediante, por ejemplo, métodos espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos, u otras técnicas. Para ilustrar, los marcajes útiles incluyen radioisótopos, colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (como las comúnmente utilizadas en ELISA), biotina, o haptenos y proteínas para los que están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales. Muchas de estos y otros marcajes se describen adicionalmente en el presente documento conocido y / o de otra manera en la técnica. Un experto en la técnica reconocerá que, en ciertas realizaciones, los cebadores de ácidos nucleicos también se pueden utilizar como sondas de ácidos nucleicos.

Tal como se utiliza aquí, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido (u otra secuencia de ácido nucleico) que puede formar una estructura dúplex con una región de un ácido nucleico diana (o amplicón derivado del ácido nucleico diana), debido a la complementariedad parcial o completa de al menos una secuencia en la sonda con una secuencia en el ácido nucleico diana en condiciones adecuadas. Como se discute aquí, la sonda puede estar marcada o no marcada. El extremo 3' de la sonda, opcionalmente, puede estar diseñado para evitar la incorporación de la sonda en un producto de extensión del cebador. Esto se puede lograr mediante el uso de bases no complementarias o mediante la adición de una porción química tal como biotina o un grupo fosfato al grupo 3'-hidroxilo del último nucleótido, que puede, dependiendo de la porción seleccionada, servir de un doble propósito también actuando como un marcador para la detección o captura del ácido nucleico unido al posterior marcaje. La prohibición de la extensión también se puede lograr mediante la eliminación del 3'-OH o mediante el uso de un nucleótido que carece de un 3'-OH tal como un didesoxinucleótido, o mediante la adición de un grupo voluminoso que bloquea la extensión por impedimento estérico. Como se discute adicionalmente en este documento, los oligonucleótidos bloqueadores de la invención pueden, pero no necesariamente, funcionar como sondas.

El término "región de hibridación" se refiere a esa región de un ácido nucleico que es exactamente o sustancialmente complementaria a, y por lo tanto se hibrida con, un polinucleótido y es al menos 5 nucleótidos contiguos de longitud. Aunque la región de hibridación generalmente se refiere a una región de un ácido nucleico que hibrida con la totalidad del oligonucleótido bloqueador, el nucleótido bloqueador puede en algunas realizaciones también incluir secuencias de nucleótidos adicionales que no se hibridan pero en su lugar funcionan, por ejemplo, como un enlazante, marcaje, aleta, o similar. En algunas realizaciones, la región de hibridación del oligonucleótido bloqueador es completamente complementaria a la secuencia diana. Sin embargo, como se describe en el presente documento, la complementariedad completa no es necesaria (por ejemplo, generalmente hay al menos un desemparejamiento que resulta en solo una complementariedad parcial entre un oligonucleótido bloqueador y la secuencia diana).

Tal como se define en el presente documento, "actividad nucleasa 5' a 3'" se refiere a la actividad de una polimerasa de ácido nucleico específica de molde que incluye una actividad exonucleasa 5' a 3' (tradicionalmente asociada con algunas polimerasas de DNA mediante las cuales se eliminan los nucleótidos desde el extremo 5' de un oligonucleótido de una manera secuencial, por ejemplo, la polimerasa I de DNA de E. coli tiene esta actividad mientras que el fragmento Klenow no la tiene (se discuten polimerasas adicionales en el párrafo siguiente).

Una polimerasa que "carece significativamente de actividad exonucleasa 5'-3'" se refiere a una polimerasa que posee el 50% o menos actividad (por ejemplo, <25%, <20, <15%, <10%) que la exonucleasa de la polimerasa de DNA Taq. Los métodos de medición de exonucleasa 5'-3' y las condiciones de medición son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.466.591. Ejemplos de polimerasas de DNA que carecen sustancialmente de actividad nucleasa 5'-3' incluyen, por ejemplo, cualquier polimerasa de DNA que tiene actividad nucleasa 5'-3' indetectable bajo condiciones típicas de extensión del cebador para esa polimerasa. Por ejemplo, las polimerasas que carecen o que tienen un dominio exonucleasa 5'-3' mutado; el fragmento Klenow de *E. coli* DNA polimerasa I; una polimerasa de DNA de *Thermus aquaticus* (Taq) que carecen de los 235 aminoácidos de N-terminal (por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N° 5.616.494 o como comúnmente se conoce en la técnica como el "fragmento Stoffel"). Otros ejemplos incluyen una DNA polimerasa termoestable que tiene delecciones suficientes (por ejemplo, delecciones en N-terminal), mutaciones o modificaciones a fin de eliminar o inactivar el dominio responsable de la actividad nucleasa 5' a 3'. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.795.762. Las polimerasas de DNA de ejemplo incluyen las de *Thermus thermophilus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus sp. Z05*, *Thermus aquaticus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, *Thermus sp. sps17*, *Deinococcus radiodurans*, Hot Spring familia B/clon 7, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldodenax*, *Escherchia coli*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosiphon africanus*. La secuencia de ácido nucleico y aminoácidos completa para numerosas polimerasas de DNA termoestables están disponibles. Las secuencias de cada una de las polimerasas de *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus* especies Z05, *Thermus* especies sps17, *Thermotoga maritima* (Tma), y *Thermosiphon africanus* (TAF) han sido publicadas en la publicación PCT de patente internacional N° WO 92 / 06200. La secuencia para la polimerasa de DNA de *Thermus flavus* ha sido publicada en Akhmetzjanov y Vakhitov (*Nucleic Acids Research* 20: 5839, 1992). La secuencia de la DNA polimerasa termoestable de *Thermus caldophilus* se encuentra en EMBL/GenBank n° de acceso U62584. La secuencia de la DNA polimerasa termoestable de *Thermus filiformis* se puede recuperar del depósito de la ATCC N° 42380 usando, por ejemplo, los métodos proporcionados en la Patente de EE.UU. N° 4.889.818, así como la información de secuencia proporcionada en la misma. La secuencia de la DNA polimerasa de *Thermotoga neapolitana* es de la base de datos de patentes de GeneSeq n° de acceso R98144 y PCT WO 97/09451. La secuencia de la DNA polimerasa termoestable de *Bacillus caldodenax* se describe en, por ejemplo, Uemori et al. (*J Biochem* (Tokyo) 113 (3): 401-410, 1993; véase también, la base de datos Swiss-Prot N° de acceso Q04957 y GenBank números de acceso D12982 y BAA02361). La secuencia para la DNA polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* ha sido publicada en la patente de EE.UU. N° 6.066.483. Ejemplos de formas no modificadas de DNA polimerasas que pueden ser modificadas para eliminar o mutar el "dominio de la exonucleasa 5'-3'" incluyen, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 6.228.628; 6.346.379; 7.030.220; 6.881.559; 6.794.177; 6.468.775; y las solicitudes de patente de EE.UU. N° 20040005599; 20020012970; 20060078928; y 20040115639. Como se explica en la patente US n° 5.795.762, una mutación dirigida al sitio de G en A en la segunda posición del codón para Gly en el residuo 46 en la secuencia de aminoácidos de la polimerasa de DNA Taq (es decir, la mutación de G (137) en A en la secuencia de DNA se ha encontrado que proporciona una reducción de aproximadamente 1000 veces en la actividad exonucleasa de 5' a 3' sin un cambio aparente en la actividad de la polimerasa, la tasa de procesividad o extensión. Esta mutación dirigida al sitio de la secuencia de nucleótidos de la polimerasa de DNA Taq da como resultado un cambio de aminoácido de la Gly (46) a Asp. La glicina 46 de la polimerasa de DNA Taq se conserva en la polimerasa de DNA de *Thermus* especie sps17, pero se encuentra en el residuo 43, y la misma mutación Gly a Asp tiene un efecto similar en la actividad exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa de DNA Tsp17. Tal mutación del Gly conservada de las polimerasas de DNA de Tth (Gly 46), TZ05 (Gly 46), Tma (Gly 37) y TAF (Gly 37) a Asp también tiene un efecto parecido atenuador en las actividades exonucleasa 5' a 3' de esas polimerasas.

Tal como se utiliza aquí, el término " T_m " se refiere a la "temperatura de fusión". La temperatura de fusión es la temperatura a la cual la mitad de una población de polinucleótidos de doble cadena u oligómeros nucleobásicos (por ejemplo, complejos de hibridación), en homodúplex o heterodúplex (es decir, dúplex que son completamente o parcialmente complementarios), se disocian en cadenas simples (bajo fuerza iónica definida, pH y concentración de ácido nucleico). La predicción de una T_m de un polinucleótido dúplex tiene en cuenta la secuencia de bases, así como otros factores que incluyen características estructurales y de secuencia y la naturaleza de los enlaces oligoméricos. Los métodos para predecir y determinar experimentalmente la T_m son conocidos en la técnica.

Por ejemplo, una T_m se determina tradicionalmente por una curva de fusión, en la que una molécula de ácido nucleico dúplex se calienta en un programa de temperatura controlada, y el estado de asociación / disociación de las dos hebras individuales en el dúplex se monitoriza y se representa hasta alcanzar una temperatura en donde las dos cadenas están completamente disociadas. La T_m se determina a partir de esta curva de fusión. Alternativamente, una T_m puede determinarse mediante una curva de hibridación, en la que una molécula de ácido nucleico dúplex se calienta a una temperatura en la que las dos hebras están completamente disociadas. La temperatura se baja entonces en un programa de temperatura controlada, y el estado de asociación / disociación de las dos hebras individuales en el dúplex se monitoriza y se representa hasta alcanzar una temperatura donde las dos cadenas están completamente hibridadas. La T_m se determina entonces a partir de esta curva de hibridación.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra un ejemplo de supresión de la amplificación de secuencias relacionadas a la vez que permite la amplificación de una secuencia diana. La muestra mostrada contiene una copia de una secuencia diana (en la parte

inferior) y dos copias de una secuencia relacionada (dos primeras líneas horizontales). La parte izquierda de la figura ilustra la hibridación del oligonucleótido bloqueador a las secuencias. En este ejemplo, existe un desemparejamiento en la región del oligonucleótido bloqueador y la secuencia diana, mientras que no hay desemparejamientos para las secuencias principales relacionadas, resultando así en una T_m mayor para las secuencias relacionadas en comparación con el T_m para la secuencia diana. La parte derecha de la figura ilustra cómo la T_m más alta para las secuencias relacionadas resulta en la alteración (en este caso bloqueo) de la amplificación de las secuencias relacionadas por la polimerasa, mientras que la amplificación no se ve afectada por la secuencia diana. Mientras que la figura muestra dos copias de la variante de diana y una copia de la diana, se apreciará que la invención también es útil cuando hay diferentes proporciones de la diana y de la variante, incluyendo, por ejemplo, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, etc.

La Figura 2 ilustra los datos de la fusión de la amplificación de la polimerasa de DNA de ZO5 de Factor 5 de tipo salvaje y el DNA mutante en presencia de una sonda de detección no estabilizada que es totalmente complementaria a la secuencia de tipo salvaje y tiene una falta de coincidencia con la secuencia mutante, como se detalla en los Ejemplos.

La Figura 3 ilustra los datos de fusión a partir de la amplificación de la polimerasa de DNA de ZO5 de Factor 5 de tipo salvaje y el DNA mutante en presencia de una sonda de detección estabilizada (bloqueador) que es totalmente complementaria a la secuencia de tipo salvaje y tiene una falta de coincidencia con la secuencia mutante, como se detalla en los ejemplos.

La Figura 4 ilustra los datos de fusión a partir de la amplificación de la polimerasa de DNA de ΔZO5 (una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 5'-3' - véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.466.591) del Factor 5 de tipo salvaje y el DNA mutante en presencia de una sonda de detección no estabilizada que es totalmente complementaria a la secuencia de tipo salvaje y tiene una falta de coincidencia con la secuencia mutante, como se detalla en los Ejemplos.

La Figura 5 ilustra los datos de fusión a partir de la amplificación de la polimerasa de DNA de ΔZO5 (que carece de actividad exonucleasa 5'-3') del Factor 5 de tipo salvaje y DNA mutante en presencia de una sonda de detección estabilizada (bloqueador) que es totalmente complementaria a la secuencia de tipo salvaje y tiene una falta de coincidencia con la secuencia mutante, como se detalla en los ejemplos.

La Figura 6 ilustra los datos de fusión a partir de la amplificación de la polimerasa de DNA de ΔZO5 (que carece de actividad exonucleasa 5'-3') del Factor 5 de tipo salvaje y DNA mutante en presencia o ausencia de una sonda de detección estabilizada (bloqueador) que es totalmente complementaria a la secuencia de tipo salvaje y tiene un emparejamiento erróneo con la secuencia mutante, como se detalla en los Ejemplos. En esta figura, el bloqueador estaba o bien presente en el tubo de PCR desde el principio, o se añadió tras la PCR. Cuando la sonda no estuvo presente durante la PCR, se produjo la amplificación normal de ambas dianas de tipo salvaje (azul) y mutante (rojo) - líneas de puntos. Cuando la sonda estaba presente durante la PCR, la diana mutante todavía se amplificaba y se fundía bien, pero la de tipo salvaje no lo hizo.

Descripción detallada

I. Introducción

La presente invención se basa en parte en el sorprendente hallazgo de que un oligonucleótido que forma un dúplex con un polinucleótido a una temperatura de fusión suficientemente alta puede perjudicar la replicación y amplificación del molde por una polimerasa que carece significativamente de la actividad 5'-3'. Se ha encontrado que este fenómeno se puede aplicar a la detección de secuencias diana en presencia de variantes de secuencias diana (también denominado a veces aquí como una "segunda secuencia") mediante el diseño del oligonucleótido (designado un "oligonucleótido bloqueador") de forma que el oligonucleótido bloqueador forma un dúplex con la variante a una temperatura de fusión suficientemente alta para impedir la amplificación de la variante mientras que la temperatura de fusión del dúplex formado por el oligonucleótido bloqueador y la diana es inferior, y por lo tanto el oligonucleótido bloqueador no afecta significativamente la amplificación de la diana. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los métodos de la invención son útiles para detectar una secuencia diana particular en una mezcla de secuencias altamente relacionadas.

En un ejemplo sencillo que no pretende limitar el alcance de la invención, un oligonucleótido está diseñado de tal manera que el oligonucleótido es totalmente complementario a una variante de secuencia diana, y por lo tanto forma un dúplex con una T_m que impide que la polimerasa que carece de actividad 'exonucleasa 5'-3' amplifique significativamente la variante diana. En este ejemplo, la diana tiene una única diferencia de nucleótidos de la variante y por lo tanto el oligonucleótido también forma un dúplex con la diana, pero con al menos un par de bases no coincidentes. Los pares de bases no coincidentes da como resultado una T_m reducida del dúplex formado por el oligonucleótido bloqueador con la diana en comparación con el dúplex formado con la secuencia variante, y la reducción en la T_m es suficiente para permitir que la polimerasa amplifique la secuencia diana y no perjudique significativamente la polimerasa a partir de la replicación del molde a la que se hibrida el oligonucleótido bloqueador.

La presente invención proporciona por lo tanto métodos de detección de secuencias diana incluso en presencia de otras secuencias diferentes pero muy relacionadas, e incluso si las secuencias relacionadas son en cantidad significativamente más alta que la secuencia diana. Por consiguiente, los métodos de la invención son útiles para numerosas aplicaciones incluyendo, por ejemplo, la detección de mutaciones indicativas de cáncer o de cualquier otra enfermedad.

II. Visión general de los métodos de la invención

La presente invención se aprovecha de las diferencias en la afinidad de la hibridación de un oligonucleótido bloqueador para una secuencia diana y una secuencia de variante de diana, en el que el oligonucleótido bloqueador forma un dúplex con una T_m superior (es decir, una mayor afinidad) para una o más secuencias variantes de diana en comparación con la T_m para la secuencia diana. En algunas realizaciones, por ejemplo, la T_m más baja entre el oligonucleótido bloqueador y la secuencia diana es el resultado de al menos una falta de coincidencia en la región de hibridación. Por ejemplo, el oligonucleótido bloqueador puede ser diseñado para ser totalmente complementario a la secuencia de variante de diana, pero sólo parcialmente complementaria a la secuencia diana. Los desemparejamientos pueden ser el resultado de, por ejemplo, inserciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos, dando como resultado diferencias entre las secuencias diana y las variantes de diana.

En los métodos de la invención, así como en los equipos o mezclas descritas en el presente documento, una muestra que puede tener un ácido nucleico con la secuencia diana y/o un ácido nucleico con una variante de diana se pone en contacto con un oligonucleótido bloqueador bajo condiciones de la reacción de extensión del cebador para permitir la hibridación del oligonucleótido bloqueador a la secuencia diana (si está presente) y la variante de secuencia diana (si está presente). Una reacción de extensión del cebador se lleva a cabo a continuación, donde un cebador se hibrida con los ácidos nucleicos en una región corriente arriba de la región del ácido nucleico en el que el oligonucleótido bloqueador se hibrida. Tal como se usa en el presente documento, una "reacción de extensión del cebador" se refiere a cualquier reacción que resulta en la extensión de uno o más cebadores, y por lo tanto el término abarca, por ejemplo, reacciones en cadena de la polimerasa. La posición en el ácido nucleico a la que el cebador se hibrida está determinado de tal manera que la extensión del cebador está bloqueada por el oligonucleótido bloqueador si el oligonucleótido bloqueador hibrida con el ácido nucleico con una afinidad suficiente (es decir, el oligonucleótido bloqueador tiene una T_m suficientemente alta). La reacción de extensión del cebador se realiza con una polimerasa que carece significativamente de actividad exonucleasa 5'-3'. Como se discute aquí, los inventores han encontrado que las polimerasas que carecen significativamente de actividad exonucleasa 5'-3' no pueden desplazar el oligonucleótido bloqueador si el oligonucleótido bloqueador hibrida con una afinidad suficientemente alta. Así, la reacción de extensión del cebador generalmente sólo se completa (es decir, se consigue una extensión completa del cebador) cuando el ácido nucleico contiene la secuencia diana (es decir, una secuencia a la que el oligonucleótido bloqueador no tiene suficiente afinidad) cuando se utiliza una polimerasa que carece de actividad nucleasa 5'-3'.

La Figura 1 ilustra el método anteriormente descrito. La parte izquierda de la Figura 1 representa una muestra en un tubo en el que hay dos copias de un ácido nucleico que comprende una variante de diana y una copia de un ácido nucleico que comprende la secuencia diana. El oligonucleótido bloqueador se pone en contacto con los ácidos nucleicos y se hibrida a la secuencia diana y a la variante de secuencia diana. Debido a que la secuencia diana comprende al menos una diferencia de nucleótidos de la variante de diana, el oligonucleótido bloqueador no es totalmente complementario con la secuencia diana (que se muestra en la Figura 1 con una "X"). Por lo tanto, mientras que el oligonucleótido bloqueador hibrida con la secuencia diana, lo hace con una T_m inferior a la T_m del oligonucleótido bloqueador y la variante de diana.

La parte derecha de la Figura 1 ilustra la reacción de extensión del cebador resultante. El cebador está representado por una pequeña flecha que hibrida hacia la izquierda de cada ácido nucleico. Cuando el cebador se extiende por una polimerasa que carece significativamente de actividad exonucleasa 5'-3' en los ácidos nucleicos que comprenden variantes de diana, la hibridación de los oligonucleótidos bloqueadores impide (es decir, inhibe al menos algunos, y normalmente toda, o casi toda) la extensión a través de las secuencias variantes de diana, y por lo tanto resulta en una extensión incompleta. En contraste, debido a que el oligonucleótido bloqueador hibrida con menor afinidad (es decir, una T_m inferior) para la secuencia diana, la polimerasa es capaz de extender el cebador a través de la secuencia diana (presumiblemente mediante el desplazamiento del oligonucleótido bloqueador).

La secuencia diana y la secuencia variante de la diana difieren en al menos un nucleótido (por ejemplo, una inserción, deleción o cambio de nucleótido) en la región de hibridación, es decir, la región en la que el oligonucleótido bloqueador hibrida con las secuencias. Generalmente, la variante de diana y la diana serán suficientemente iguales para que el oligonucleótido bloqueador pueda hibridar a la variante de diana y a la diana en las mismas condiciones, por ejemplo, las condiciones de una reacción de extensión del cebador, que incluye pero no se limita a una reacción de amplificación tales como una PCR u otra reacción de amplificación. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la variante de diana y la diana difieren en la región de hibridación por 1, 2, 3 o 4 nucleótidos, por ejemplo, de 1-4, 1-3, 1-2, 2-3, 2-4 nucleótidos. En algunas realizaciones, la secuencia diana es menos de un 100% idéntica a la secuencia variante de diana, pero es superior al, por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%,

o 99% de identidad. En numerosas realizaciones, la(s) diferencia(s) entre las secuencias diana y la variante de diana se producen en las partes internas de las secuencias más que en los nucleótidos terminales 5' o 3'.

La secuencia diana puede ser de cualquier longitud. En algunas realizaciones, el nucleótido diana tiene al menos 5 nucleótidos de longitud, por ejemplo, al menos 10, 15, 20 o más nucleótidos, por ejemplo, de 5-200, de 5-100, de 10-200, de 10-100, de 10-50, 15-50, de 20-80 nucleótidos, etc.

Mientras que esta descripción general, describe la invención, como si hubiera una diana y una variante de diana, se apreciará que en algunas realizaciones hay múltiples secuencias diana diferentes y/o variantes de secuencias diana dentro de una muestra. En algunas realizaciones, hay o posiblemente hay más de una variante de la secuencia diana diferente en la muestra con la secuencia diana. Así, por ejemplo, una muestra puede contener una secuencia diana, una variante de diana con una diferencia de nucleótidos de la secuencia diana y una segunda variante de la diana con una diferencia de nucleótidos diferente de la secuencia diana.

En realizaciones preferidas de los métodos, equipos o mezclas descritas en el presente documento, pueden realizarse reacciones "multiplex" en donde se detectan al menos dos secuencias diana diferentes. Estas formas de realización generalmente, pero no siempre, implican el uso de dos o más oligonucleótidos bloqueadores diferentes (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc., dependiendo del número de dianas a detectar), en el que cada oligonucleótido bloqueador impide la extensión de variantes de diferentes secuencias diana.

La distancia entre la región del ácido nucleico en el que el cebador se hibrida y el oligonucleótido bloqueador hibrida puede variar siempre y cuando la distancia no esté tan lejos para que la reacción de extensión se haya completado antes de llegar a la región donde el oligonucleótido bloqueador se hibrida. En algunas realizaciones, la distancia entre el nucleótido en la que la mayor parte de la porción 3' del cebador se hibrida y la mayor parte de la porción 5' del nucleótido bloqueador está entre aproximadamente 5-1000 nucleótidos, por ejemplo, 10-100 nucleótidos, pero puede ser tan pequeña como cero (adyacente).

Los cebadores usados para la extensión del cebador pueden ser idénticos entre aquellos que hibridan con ácidos nucleicos que tienen una variante de diana y los que tienen la secuencia diana, pero los cebadores también pueden ser diferentes. Por ejemplo, cuando se desea detectar una mutación somática rara en un organismo, el genoma del organismo será generalmente idéntico, excepto por el cambio en el sitio de la mutación. Por lo tanto, la secuencia diana comprenderá el sitio de la mutación, y se puede utilizar un cebador idéntico porque la región corriente arriba del sitio de mutación, sin importar si el el sitio de la mutación está mutado, tendrá la misma secuencia. No obstante, aunque posiblemente más raras, existen situaciones en las que puede preverse que los cebadores utilizados para las reacciones de extensión de los ácidos nucleicos diana y variantes de diana son diferentes y por lo tanto este tipo de realizaciones no están excluidas de la invención.

Los productos de extensión pueden ser detectados, y los productos de extensión de variante de diana abortados se pueden distinguir de los productos de extensión de diana, por numerosos métodos. En algunas realizaciones, se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otro tipo de amplificación de ácido nucleico. Para las reacciones de PCR, se utilizan típicamente dos cebadores. Tal como se utiliza en los métodos de la invención, un cebador de PCR es el cebador descrito en referencia a las reacciones de "extensión del cebador" anterior, y el segundo cebador (por ejemplo, un cebador inverso) está diseñado para hibridar con el complementario de una secuencia en el ácido nucleico que está corriente abajo del oligonucleótido bloqueador. Tal como se utiliza en los métodos de las invenciones, la PCR es útil porque se produce la amplificación exponencial sólo para aquellas reacciones en las que la polimerasa es capaz de desplazar el oligonucleótido bloqueador (es decir, los relacionados con la secuencia diana). Un número de polimerasas termoestables que carecen significativamente de actividad exonucleasa 5'-3' se conocen y se describen en el presente documento. Los métodos de la invención encuentran un uso particular en las reacciones de PCR asimétricas, es decir, las reacciones de PCR en las que un cebador está en una concentración limitante en comparación con otros cebadores en la reacción. Generalmente, el cebador (el cebador inverso en el ejemplo anterior) que genera la cadena a la que se hibrida el oligonucleótido bloqueador es el cebador en una concentración limitante.

Independientemente del tipo de reacción de extensión del cebador realizada, pueden ser utilizados numerosos tipos diferentes de métodos para detectar los productos de extensión. En algunas realizaciones, una sonda (por ejemplo, una sonda marcada de forma detectable) está diseñada para hibridarse con una región del producto de extensión que corresponde a la secuencia diana o una secuencia adicional corriente abajo de la secuencia diana en el ácido nucleico, o un complementario de tales secuencias. Dicha sonda solamente, o principalmente, detectaría productos de extensión que implican ácidos nucleicos que comprenden la secuencia diana como productos de extensión de ácidos nucleicos que comprenden variantes de diana impedidos y por lo tanto no incluiría generalmente, la secuencia diana, la secuencia variante diana, o secuencias corriente abajo.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, las sondas marcadas de forma detectable "en tiempo real" se utilizan y funcionan como un oligonucleótido bloqueador. Tales sondas pueden incluir, pero no se limitan a, sondas TaqMan® y balizas moleculares. En algunas realizaciones, las sondas marcadas de forma detectable "en tiempo real" (también funcionan como oligonucleótidos bloqueadores), se utilizan en reacciones de amplificación en tiempo real tales como

las reacciones de PCR en tiempo real. Los valores umbral de ciclo (Ct) se utilizan con frecuencia para monitorizar las cantidades de diana en amplificaciones en tiempo real. En algunas realizaciones, hay una diferencia de al menos 5, 10, 15 o más Ct entre una diana y una variante de diana como se determina en una reacción de amplificación en tiempo real en presencia de cantidades iguales de las secuencias diana y de la variante de diana.

En algunas realizaciones, los métodos de detección basados en masa se puede utilizar para detectar los productos de extensión. Como los productos de extensión de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia diana generalmente serán significativamente más largos que los generados a partir de ácidos nucleicos que comprenden variantes de secuencias diana, se puede utilizar cualquier método que detecta diferencias en la longitud de ácido nucleico o masa. Por ejemplo, pueden usarse varios métodos de espectrometría de masas para detectar, distinguir y cuantificar los productos de extensión.

Preferiblemente, el análisis de temperatura de fusión se utiliza para detectar los productos de extensión. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el oligonucleótido bloqueador se marca y se realiza un análisis de curva de fusión para cuantificar la cantidad de molde a la que el oligonucleótido marcado se hibrida.

III. Oligonucleótidos que bloquean la extensión de las polimerasas con actividad exonucleasa 5'-3' deteriorada

Los oligonucleótidos bloqueadores de la presente invención están diseñados para hibridarse a una variante de secuencia diana con una temperatura de fusión más alta (T_m) que la que el bloqueador hibrida con la secuencia diana en sí. El oligonucleótido bloqueador no necesita ser totalmente complementario a la variante de diana siempre que el oligonucleótido bloqueador hibride con la variante de diana con una T_m suficientemente alta que impida bajo condiciones designadas, que la polimerasa replique la porción de un molde en la que los oligonucleótidos bloqueadores hibriden. El oligonucleótido bloqueador es en algunas realizaciones totalmente complementario a una variante de diana, pero forma al menos un desemparejamiento (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 desemparejamientos) cuando se hibrida con la secuencia diana, lo que resulta en una T_m inferior para la diana en comparación con la variante de diana. El oligonucleótido bloqueador en algunas realizaciones no es totalmente complementario a cualquiera de las secuencias diana o variantes de diana. En algunas realizaciones, el oligonucleótido bloqueador forma al menos uno o más desemparejamientos con la variante de diana, pero sin embargo, se hibrida a una T_m suficientemente alta para impedir a una polimerasa replicar la secuencia variante en presencia del oligonucleótido bloqueador, aunque no perjudica significativamente la replicación de la secuencia diana. En algunas realizaciones, el oligonucleótido bloqueador o bien tiene un mayor número de desemparejamientos con la secuencia diana que con la variante de diana o tiene diferentes desemparejamientos con la secuencia diana en comparación con la variante diana de modo que la replicación de la secuencia variante de diana en presencia del oligonucleótido bloqueador está impedida mientras que la replicación de la secuencia diana en presencia del oligonucleótido bloqueador no se vea afectada de manera significativa. En algunas realizaciones, el desemparejamiento entre la secuencia diana y la variante no se produce en el extremo 5' o 3' de las secuencias. En algunas realizaciones, el oligonucleótido bloqueador está diseñado de tal manera que se forman uno o más desemparejamientos en el medio (no en los extremos) de la región de hibridación formados por el dúplex del oligonucleótido bloqueador y la variante de diana. En algunas realizaciones, el oligonucleótido bloqueador está diseñado de tal manera que se forman uno o más desemparejamientos en uno o ambos extremos de la región de hibridación formados por el duplex del oligonucleótido bloqueador y la variante de diana.

Como se discutió anteriormente, la T_m del oligonucleótido bloqueador y una variante de diana particular es suficientemente mayor que la T_m del oligonucleótido bloqueador para las secuencias diana de modo que la replicación de la variante de diana se impide mientras que la replicación de la diana en las mismas condiciones no se deteriora significativamente, permitiendo de este modo la detección de la secuencia diana en presencia de la variante de diana. Preferiblemente, la diferencia en T_m del oligonucleótido bloqueador para la variante de diana en comparación con la secuencia diana es al menos aproximadamente 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20°C, o más. Se apreciará que la T_m se puede medir de diferentes maneras. La T_m se puede determinar usando cualquier tampón de amplificación de otra mezcla que es, o emula, las condiciones en las que se analiza la replicación con la polimerasa. Un ejemplo de tales condiciones es, por ejemplo, 2,5% de glicerol, Tricina 50 mM pH 8,3, acetato de potasio 45 mM con nucleótidos apropiados para la extensión del cebador.

Los oligonucleótidos bloqueadores de la invención pueden ser de cualquier longitud. Preferiblemente, los oligonucleótidos bloqueadores son entre 5-200 nucleótidos, por ejemplo, de 5-100, de 10-100, de 5-40, de 5-25, de 10-50, de 15-50 nucleótidos de longitud.

Los oligonucleótidos bloqueadores de la invención pueden comprender, y a veces sólo incluir, nucleótidos naturales (es decir, A, C, T, G y U). Alternativamente, en algunas realizaciones, los oligonucleótidos bloqueadores comprenden al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc.) nucleótido artificial (es decir, distintos de los que se producen en el RNA o DNA de origen natural). Bases artificiales ejemplares que contribuyen al aumento de la T_m se describen en la técnica, e incluyen pero no se limitan a, por ejemplo, Lebedev et al., *Genetic Analysis - Biomolecular Engineering* 13: 15-21. (1996); Xodo, et al., *Nucleic Acids Res.* 19: 5625-5631 (1991); Froehler, et al., *Tetrahedron Lett.* 33:5307-5310 (1992); Kuttyavin, et al., *Biochemistry* 35: 11170-11176 (1996); Nguyen, et al., *Nucleic Acids Res.* 25:30599-65 (1997). Por ejemplo, 2-Amino A aumenta la T_m en aproximadamente 3 °C sobre A,

5-metil-C aumenta la T_m aproximadamente 1,3 °C sobre C, C-5 propinil-C mejora la T_m aproximadamente 2,8 °C sobre C y C-5 propinil-U aumenta la T_m aproximadamente 1,7 °C a lo sobre T. De acuerdo con la invención, el oligonucleótido bloqueador no comprende ningún nucleótido intercalante. Además, el oligonucleótido bloqueador de la invención no comprende un pseudonucleótido intercalante interno, tal como los descritos en el documento WO 2006/026828.

En otras realizaciones preferidas, los oligonucleótidos bloqueadores de la invención comprenden al menos una porción no nucleotídica (opcionalmente, distinta de un nucleótido intercalante) que aumenta la temperatura de fusión del oligonucleótido bloqueador. Ejemplos de tales porciones no nucleotídicas incluyen, por ejemplo, aglutinante de grupo menor, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.486.308).

De acuerdo con la invención, el oligonucleótido bloqueador está marcado de manera detectable y por lo tanto es de mayor uso en la detección de la secuencia diana en una mezcla. El oligonucleótido bloqueador marcado de forma detectable, por ejemplo, se utiliza para detectar y cuantificar la secuencia diana en una reacción de amplificación, que incluye, pero no se limita a una reacción de amplificación en tiempo real. Se conocen una amplia variedad de marcadores detectables. Los marcajes ejemplares incluyen marcadores fluorescentes (incluyendo, por ejemplo, desactivadores o absorbedores), marcadores no fluorescentes, marcadores colorimétricos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, marcadores radiactivos, grupos modificadores de la masa, anticuerpos, antígenos, biotina, haptenos, enzimas (incluyendo, por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa), y similares. Los marcadores pueden proporcionar señales detectables por fluorescencia, radiactividad, colorimetría, gravimetría, difracción de rayos X o absorción, magnetismo, actividad enzimática, y similares. Los marcadores pueden ser utilizados para proporcionar una señal detectable (y opcionalmente cuantificable), y que se pueden unir a un ácido nucleico o proteína.

En ciertas realizaciones preferidas de la invención, un marcador es un colorante fluorescente o fluoróforo. Normalmente, un fluoróforo particular puede emitir luz de una longitud de onda particular tras absorber luz de longitud de onda más corta. La longitud de onda de la luz emitida por un fluoróforo particular es característica de ese fluoróforo. Por lo tanto, un fluoróforo particular, se puede detectar mediante la detección de luz de una longitud de onda apropiada después de la excitación del fluoróforo con luz de longitud de onda más corta. Los marcadores fluorescentes pueden incluir colorantes que están cargados negativamente, tales como colorantes de la familia de la fluoresceína, o los colorantes que son de carga neutra, tales como los colorantes de la familia carboxirodamina, o colorantes que están cargados positivamente, tales como los colorantes de la familia de cianina o de la familia de la rodamina. Otras familias de colorantes que se pueden utilizar en la invención incluyen, por ejemplo, colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína, colorantes de la familia de la cumarina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiazina, colorantes de la familia de la escuaraina, colorantes de la familia de los lantánidos quelados, colorantes ALEXA FLUOR® y colorantes de la familia BODIPY®. Los colorantes de la familia de la fluoresceína incluyen, por ejemplo, FAM, HEX, TET, JOE, NAN y ZOE. Los colorantes de la familia de la carboxirodamina incluyen Texas Red, ROX, R110, R6G, y TAMRA. FAM, HEX, TET, JOE, NAN, ZOE, ROX, R110, R6G y TAMRA son comercializados por Perkin-Elmer (Foster City, Calif.), mientras que Texas Red es comercializado por Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregón). Los colorantes de la familia de la cianina incluyen Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 y Cy7 y son comercializados por Amersham GE Healthcare (Piscataway, N. J.).

IV. Polimerasas con actividad exonucleasa 5'-3' deteriorada

Un número de polimerasas que carecen significativamente de actividad exonucleasa 5'-3' son conocidas en la técnica. La región N-terminal de las polimerasas típicamente confieren actividad exonucleasa 5'-3'. Por lo tanto, se pueden utilizar la mutación o delección parcial o total del extremo N-terminal de una polimerasa para generar polimerasas que carecen significativamente de actividad exonucleasa 5'-3'. Los ejemplos de polimerasas que carecen significativamente de actividad exonucleasa 5'-3' incluyen el fragmento Klenow de la polimerasa de DNA I de *E. coli*; Taq de *Thermus aquaticus* que carece de los 235 aminoácidos N-terminales (por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.616.494.); y/o una polimerasa de DNA termoestable que tienen delecciones (por ejemplo, delecciones en N-terminal), mutaciones o modificaciones suficientes con el fin de eliminar o inactivar el dominio responsable de la actividad nucleasa 5' a 3'. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.795.762. Tales polimerasas son generalmente polimerasas aisladas o purificadas y pueden ser proteínas recombinantes.

Las polimerasas que funcionan en reacciones de amplificación, incluyendo reacciones de amplificación de termociclado son particularmente útiles en la invención. Las polimerasas útiles para los métodos de la invención carecen significativamente de actividad exonucleasa 5'-3' de forma que la polimerasa es incapaz de extender un cebador en una manera dependiente del molde a través de la región de un molde de variante de diana a la que se hibrida el oligonucleótido bloqueador, pero es capaz de extender un cebador a través de una región de un molde diana a la que se hibrida el oligonucleótido bloqueador, en el que la T_m del oligonucleótido bloqueador es mayor para el molde de la variante de diana que la T_m para el molde diana. Por lo tanto, los expertos en la técnica apreciarán que el nivel preciso, si lo hay, de actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa puede variar dependiendo de la T_m del oligonucleótido bloqueador para la diana y variante de diana.

De acuerdo con los métodos de la invención, la polimerasa que carece significativamente de actividad exonucleasa 5'-3' está suficientemente afectada por el oligonucleótido bloqueador para replicar la secuencia de la variante de diana en beneficio de la correspondiente amplificación de la diana. Sin pretender limitar el alcance de la presente invención, se cree que no puede haber una reacción de competición entre una secuencia diana y una variante de diana estrechamente relacionadas. En situaciones donde hay considerablemente más copias de la variante de diana en comparación con la diana, la amplificación en ausencia del bloqueador resulta en la amplificación de tal manera que la secuencia diana posee una detectabilidad reducida o no es detectable. Cuando es deseable detectar la diana en presencia de la variante de diana, la amplificación de la variante se impide por hibridación del oligonucleótido bloqueador, mientras que la amplificación de la diana no se ve afectada o se deteriora en un grado menor para permitir la detección de la diana en presencia de la variante de diana. La amplificación de la variante de diana se considera impedida significativamente cuando la presencia del oligonucleótido bloqueador reduce la cantidad de amplicón de la variante en al menos un 20%, y más típicamente al menos un 50%, 75%, 90%, 95% o más, en comparación con una reacción de control que carece del oligonucleótido bloqueador.

De acuerdo con la invención, una reacción de control se lleva a cabo también empleando una polimerasa que posee una actividad exonucleasa 5'-3' significativa en lugar de una polimerasa que carece significativamente de actividad exonucleasa 5'-3'. Tales reacciones de control pueden ser útiles para determinar la presencia o ausencia de variantes de diana si en tales reacciones de control se amplifican las variantes de diana. Tales reacciones de control también pueden ser útiles para confirmar que los reactivos de amplificación son funcionales. Se apreciará que también pueden ser utilizados otros controles diferentes.

V. Usos de los métodos

La presente invención es útil para la detección de secuencias diana y los ácidos nucleicos que comprenden estas secuencias diana. La invención es particularmente útil para detectar una secuencia diana en presencia de variantes de diana, especialmente cuando las variantes de diana están en una concentración en exceso en comparación con la secuencia diana a detectar. Sin pretender limitar el alcance de la invención, algunos ejemplos de tales situaciones son la detección de mutaciones somáticas o mutaciones relacionadas con el cáncer. Por ejemplo, la presente invención es útil para la detección de cáncer u otras mutaciones somáticas en una biopsia donde la mayoría de las células probablemente tienen una versión "normal" de una secuencia de genes (es decir, la variante de diana), pero por lo menos unas pocas células de pueden tener una mutación, (es decir, la secuencia diana).

La presente invención se puede utilizar para analizar y detectar ácidos nucleicos en cualquier muestra, incluyendo muestras biológicas como se define aquí. Las muestras utilizadas en los métodos de la invención pueden tener ambas secuencias diana y variante de diana, sólo la secuencia o la variante de diana o ninguna. En algunas realizaciones, se conoce la presencia de una variante de diana o de la diana, mientras que en otras realizaciones, no se sabe si está presente una diana o variante de diana.

VI. Mezclas de reacción

También se describen las mezclas de reacción implicadas en los métodos de la invención. Cualquier mezcla de reacción como las descritas anteriormente se pueden generar. Un ejemplo de mezcla de reacción comprende, por ejemplo, una polimerasa que carece significativamente de actividad exonucleasa 5'-3'; un polinucleótido que comprende una secuencia diana; un polinucleótido que comprende una segunda secuencia, en donde la segunda secuencia difiere de la secuencia diana en al menos un nucleótido; y un oligonucleótido bloqueador, en el que el oligonucleótido bloqueador hibrida con la segunda secuencia lo suficiente como para impedir la amplificación de la segunda secuencia por la polimerasa, pero la hibridación del oligonucleótido a la secuencia diana no perjudica significativamente la amplificación de la secuencia diana. Las mezclas de reacción pueden comprender además los nucleótidos (por ejemplo, dNTP tales como dATP, dCTP, dGTP, dTTP, y/o dUTP, o en cualquier combinación de los mismos) a concentraciones útiles para la extensión del cebador y/o reacciones de amplificación. Además, las mezclas de reacción comprenden uno o más cebadores diferentes que se hibridan a la secuencia diana y/o segunda secuencia, por ejemplo, al menos un cebador que hibrida corriente arriba de la región en la que el oligonucleótido bloqueador hibrida y/o un par de cebadores que comprende el cebador sentido 5' y el correspondiente cebador antisentido 3'. En otras variaciones, no mutuamente exclusivas, la mezcla de reacción incluye uno o más contenedores que proporcionan nucleótidos libres (convencionales y/o no convencionales). Por ejemplo, la mezcla de reacción puede incluir dNTP alfa-fosforotioato, dUTP, dITP, y/o dNTP marcados tales como, por ejemplo, dNTP de la familia de colorantes de la fluoresceína o de la cianina. El oligonucleótido bloqueador, polimerasa, cebadores, y otros reactivos específicos descritos en este documento también pueden incluirse en las mezclas de reacción como se detalla en los apartados anteriores. Las mezclas de reacción descritas también pueden estar acompañadas por o utilizadas con un recipiente que proporciona un cebador sentido 5' hibridable, en condiciones de extensión del cebador, a la secuencia diana y/o segunda secuencia.

VII. Equipos

También se describen los equipos para utilizar en los métodos de la invención. Típicamente, el equipo está compartimentado para facilitar su uso y contiene al menos un recipiente que proporciona una polimerasa que carece

significativamente de actividad exonucleasa 5'-3'. También pueden incluirse uno o más contenedores adicionales que proporcionan reactivo(s) adicional(es). Tales recipientes adicionales pueden incluir cualquier reactivo u otros elementos reconocidos por el experto en la técnica para su uso en procedimientos de extensión del cebador de acuerdo con los métodos descritos anteriormente, incluyendo reactivos para su uso en, por ejemplo, procedimientos de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, PCR, RT-PCR), procedimientos de secuenciación de DNA, o procedimientos de marcaje de DNA. El equipo puede comprender, por ejemplo, un polinucleótido que comprende una secuencia diana; un polinucleótido que comprende una segunda secuencia, en donde la segunda secuencia difiere de la secuencia diana en al menos un nucleótido; y un oligonucleótido bloqueador, tal como se describe en el presente documento. El equipo incluye además un recipiente que proporciona un cebador sentido 5' hibridable, bajo condiciones de extensión del cebador, a la secuencia diana y/o segunda secuencia, y/o un par de cebadores que comprende el cebador sentido 5' y el correspondiente cebador antisentido 3'. En otras variaciones, no mutuamente exclusivas, el equipo incluye uno o más contenedores que proporcionan nucleótidos libres (convencionales y/o no convencionales). En realizaciones específicas, el equipo incluye dNTP alfa-fosforotioato, dUTP, dITP, y/o dNTP marcados tales como, por ejemplo, dNTP de la familia de colorantes de la fluoresceína o de la cianina. En otras realizaciones adicionales, no mutuamente exclusivas, el equipo incluye uno o más recipientes que proporcionan un tampón adecuado para una reacción de extensión del cebador.

Ejemplos

20 Ejemplo 1:

Este ejemplo ilustra el uso de un oligonucleótido bloqueador para suprimir la amplificación de un alelo de tipo salvaje de factor 5 utilizando el análisis de curva de fusión para detectar el alelo mutante.

25 En el ejemplo actual, la mezcla maestra de muestras de PCR asimétrica consistió en: glicerol 2,5%; Tricina 50 mM, pH 8,3; acetato de potasio 45 mM; dATP 200 μ M, dGTP 200 μ M, dCTP 200 μ M, dUTP 400 μ M; cebador (exceso) corriente arriba 0,7 μ M; cebador (limitante) corriente abajo 0,1 μ M; sonda de detección 0,4 μ M; 4U uracilo-N-glicosilasa; polimerasa de DNA Δ ZO5 o polimerasa de DNA ZO5 40 U; y acetato de magnesio 4 mM.

30 La mezcla maestra se utilizó para amplificar dianas de DNA plasmídico de Factor 5 de tipo salvaje y mutante. El exceso de cebador estuvo presente en 7x la concentración del cebador limitante para asegurar un exceso de amplificación de cadena sencilla de la sonda de detección para unirse. La amplificación y la fusión se realizaron en el Roche LightCycler LC480.

35 El perfil de los ciclos térmicos utilizados para el ejemplo fue: 50 °C durante 5 minutos (paso UNG); 94 °C durante 15 segundos - 59 °C durante 40 segundos x 2 ciclos; 91 °C durante 15 segundos - 59 °C durante 40 segundos x 48 ciclos, 94 °C durante 30 segundos, con la recogida de datos durante el paso de hibridación de 59 °C; y un paso de fusión con recogida de datos constante entre 40 °C y 95 °C.

40 La secuencia del cebador corriente arriba fue TGAACCCACAGAAAATGATGCCCBz (Id. de Sec. N°: 1); la secuencia del cebador corriente abajo fue GGAAATGCCCATTTAGCCAGGBz (Id. de Sec. N°: 2); Bz = t-butilo bencil dA. La secuencia de la sonda de detección estabilizada (bloqueador) fue EFFLLFLGLLFGFLLAGGGQ (Id. de Sec. N°: 3), donde E = cx-FAM, Q = BHQ2, F = propinil dU y L = propinil dC. La secuencia de una sonda de detección no estabilizada (no bloqueador) fue ECTGTATTCCTCGCCTGTCCAGQP (Id. de Sec. N°: 4), donde E = cx-FAM, Q = BHQ2, F = propinil dU, L = propinil dC, y P = fosfato 3'. Estos oligonucleótidos se adaptan perfectamente a la diana de tipo salvaje, y tienen un desemparejamiento con la diana mutante (desemparejamiento CA), que está indicado en **negrita y subrayado**.

50 Los datos de fusión de este ejemplo mostraron que con la polimerasa de DNA ZO5, ambas sondas dieron curvas de fusión como se esperaba, el tipo salvaje proporciona la T_m más alta, la diana mutante proporciona la T_m más baja y el heterocigoto proporciona T_m tanto para el alelo de tipo salvaje como el mutante (Figura 2 y Figura 3). Debido a que ZO5 escinde la sonda, no se observó supresión de la amplificación. Se puede observar que la T_m de la sonda estabilizada a los 2 alelos fue de aproximadamente 12 °C más alta que la sonda no estabilizada. Además, también se observó un mayor pico de T_m no identificado, como un hombro en el lado derecho del pico principal de fusión.

55 Con Δ ZO5, la sonda no estabilizada proporcionó de nuevo las mismas curvas de fusión, pero con más señal si la sonda no se degrada durante la PCR (Figura 4).

60 Cuando se utilizó Δ ZO5 con la sonda estabilizada (Figura 5), el alelo de tipo salvaje en la muestra heterocigoto no dio como resultado una curva de fusión para el alelo de tipo salvaje; sin embargo dio como resultado una curva de fusión que era idéntica a la diana mutante, lo que indica que la amplificación del alelo de tipo salvaje había sido suprimida. La diana pura de tipo salvaje dio lugar a una curva de fusión que era mucho más baja y más ancha que la diana de tipo salvaje con ZO5 (Figura 3).

65 Ejemplo 2:

La evidencia adicional del efecto en la amplificación usando una sonda estable y una enzima no escisora se muestra en la Figura 6. Utilizando las mismas condiciones de amplificación descritas en el ejemplo 1 con $\Delta ZO5$, una sonda estabilizada estaba o bien presente en el tubo de PCR desde el principio, o se añadió después de la PCR. A continuación, se realizó una fusión, y los datos se muestran en la Figura 6. Cuando la sonda no estaba presente durante la PCR, apareció la amplificación normal de las dianas de tipo salvaje (azul) y mutante (rojo) - líneas de puntos. Cuando la sonda estaba presente durante la PCR, la diana mutante todavía amplifica y se funde bien, pero la de tipo salvaje no lo hizo.

Ejemplo 3:

La supresión también se observó en la PCR en tiempo real. Usando las mismas condiciones de PCR descritas en el Ejemplo 1, los datos de la curva de crecimiento desde el mismo experimento mostraron un retardo de ciclo umbral (Ct) de unos 12 ciclos entre las dianas de tipo salvaje y la mutante utilizando $\Delta ZO5$, en comparación con ningún retraso con $ZO5$. Además, para probar si el oligonucleótido de bloqueo funciona debido a las bases estabilizadoras presentes (propinil dU y propinil dC), se construyó y se utilizó una sonda larga no estabilizada (52-mero), que tenía la misma T_m que la sonda corta estabilizada. La secuencia de esta sonda era: ECAAGGACAAAATACCTGTQATT-CCTCGCCTGTCCAGGGATCTGCTCTTACAGP (Id. de Sec. N°: 5 y 6), donde E = cx-FAM, Q = BHQ2, y P = fosfato 3'.

Se observó un retraso de 11 ciclos entre las dianas de tipo salvaje y la mutante utilizando $\Delta ZO5$, en comparación con ningún retraso usando $ZO5$. Este resultado indicó que la T_m fue el factor más crítico en la determinación de si una sonda puede actuar como un bloqueador.

Ejemplo 4:

Se realizó un experimento para imitar un ensayo de detección de mutaciones raras. Usando las condiciones de reacción descritas en el ejemplo 1, se mezclaron DNA plasmídico de dianas de tipo salvaje y mutantes en diferentes proporciones para ver qué nivel de dianas mutantes puede ser detectado en un contexto de dianas de tipo salvaje. Se prepararon proporciones de 100:1 (correspondiente a 10.000 copias de tipo salvaje + 100 copias de mutante), 500:1 (50.000 copias de tipo salvaje + 100 copias de mutante), 1000:1 (100.000 copias de tipo salvaje + 100 copias de mutante), 5000:1 (500.000 copias de tipo salvaje + 100 copias del mutante) y 10.000:1 (1.000.000 copias de tipo salvaje + 100 copias de mutante). Se observaron curvas de fusión claramente interpretables para la diana mutante hasta una proporción de 1000:1. Por encima de esto, la curva de fusión de tipo salvaje comenzó a interferir con la curva de fusión mutante, lo que indica que el bloqueo eficaz de la amplificación de la diana de tipo salvaje ya no estaba ocurriendo.

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritas en este documento son sólo para fines ilustrativos y que varias modificaciones o cambios en los mismos serán sugeridos por los expertos en la técnica dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH, F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Supresión de la amplificación usando un oligonucleótido y una polimerasa que carece significativamente de actividad exonucleasa 5'-3'

<130> 24312 WO

<140> US sin asignación

<141> Todavía no asignada

<150> US 60/964.089

<151> 08/08/2007

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador corriente arriba de amplificación por PCR asimétrica del alelo de tipo salvaje del Factor 5

<220>

<221> base modificada

<222> (24)

<223> a = t butil-bencilo dA

<400> 1

tgaaccaca gaaatgatg ccca 24

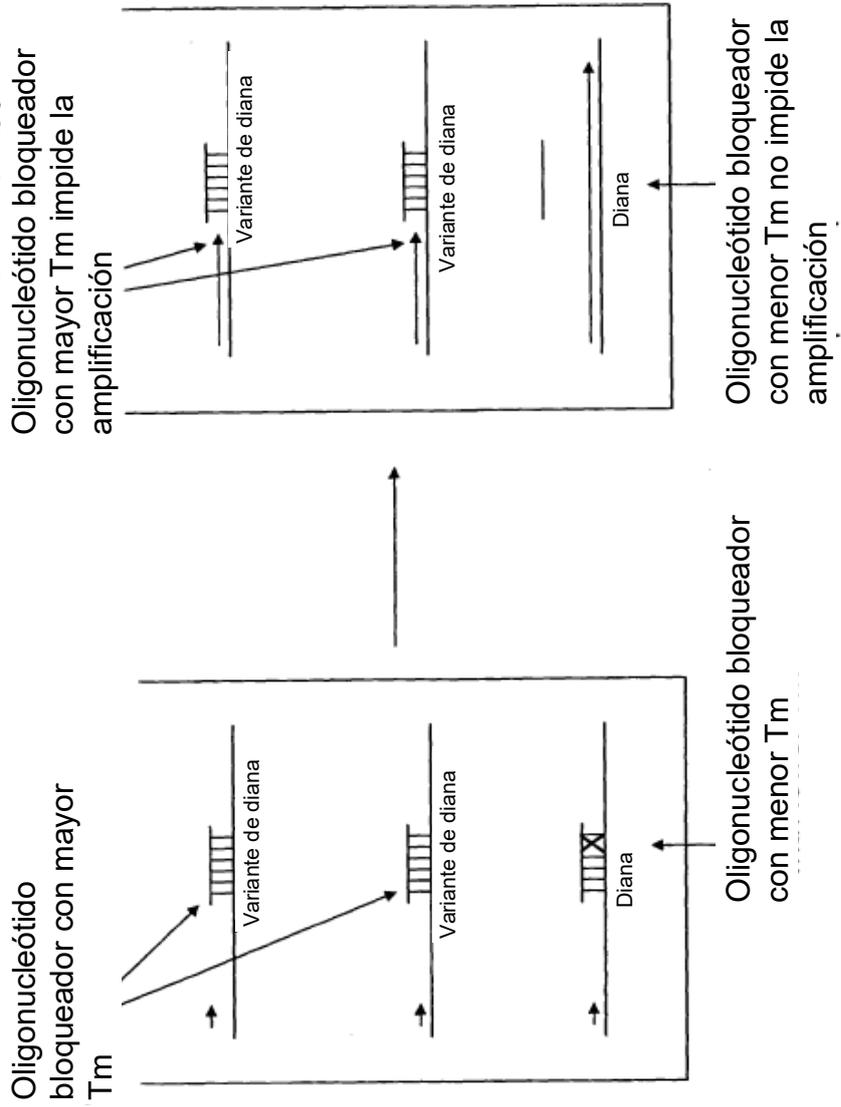
<210> 2
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador corriente abajo de amplificación por PCR asimétrica del alelo de tipo salvaje del Factor 5
 <220>
 <221> base modificada
 10 <222> (26)
 <223> a = t-butil bencil dA
 <400> 2
 ggaaatgccc cattatttag ccagga 26
 <210> 3
 15 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: sonda de detección estabilizada (bloqueador) de amplificación por PCR
 20 asimétrica del alelo de tipo salvaje del Factor 5
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)
 <223> n = propinilo modificado por fosforamidita cx-FAM abásica, donde cx-FAM = enlazador ciclohexano unido a 6-
 25 carboxifluoresceína (FAM)
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (2)
 <223> u = propinil dU
 30 <220>
 <221> base modificada
 <222> (3) .. (4)
 <223> c = propinil dC
 <220>
 35 <221> base modificada
 <222> (5)
 <223> u = propinil dU
 <220>
 <221> base modificada
 40 <222> (6)
 <223> c = propinil dC
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (8) .. (9)
 45 <223> c = propinil dC
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (10)
 <223> u = propinil dU
 50 <220>
 <221> base modificada
 <222> (12)
 <223> u = propinil dU
 <220>
 55 <221> base modificada
 <222> (13) .. (14)
 <223> c = propinil dC
 <220>
 <221> base modificada
 60 <222> (18)
 <223> g modificada por apantallador Black Hole BHQ2 (Q)
 <400> 3
 guccaggg nuccucgccu 18
 <210> 4
 65 <211> 21
 <212> DNA

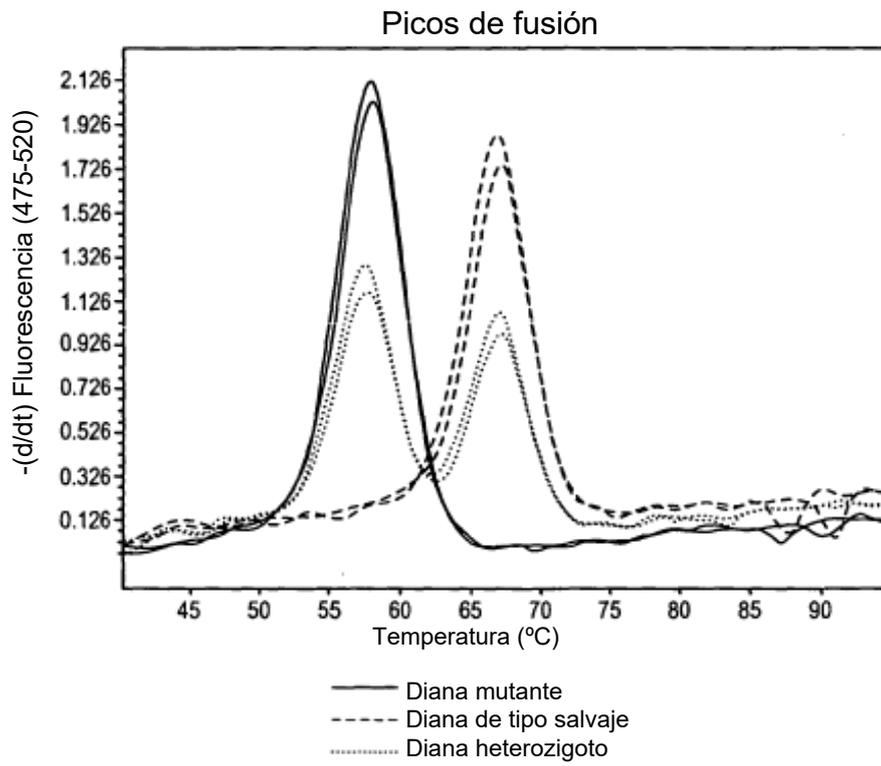
<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: sonda de detección no estabilizada (no bloqueador) de amplificación por PCR asimétrica del alelo de tipo salvaje del Factor 5
 5 <220>
 <221 > base modificada
 <222> (1)
 <223> c modificado por fosforamidita CX-FAM 5' abásica, donde cx-FAM = enlazador ciclohexano unido a 6-carboxifluoresceína (FAM)
 10 <220>
 <221> base modificada
 <222> (21)
 <223> g modificada por Apantallador Black Hole BHQ2 (Q) y fosfato 3' (P)
 <400> 4
 15 ctgtattcct cgcctgtcca g 21
 <210> 5
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: sonda larga no estabilizada para PCR en tiempo real de alelo de tipo salvaje de Factor 5
 <220>
 <221> base modificada
 25 <222> (1)
 <223> c modificado por fosforamidita abásica conjugada con CX-FAM, donde cx-FAM = enlazador ciclohexano unido a 6-carboxifluoresceína (FAM)
 <220>
 <221> base modificada
 30 <222> (18)
 <223> t modificado por fosforamidita abásica conjugada con apantallador Black Hole BHQ2 (Q) en el esqueleto de azúcar fosfato unido al extremo 5' de Id. de Sec. N°: 6
 <400> 5
 caaggacaaa atacctgt 18
 35 <210> 6
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de Secuencia Artificial: sonda larga no estabilizada para PCR en tiempo real de alelo de tipo salvaje de Factor 5
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)
 45 <223> a modificado por fosforamidita abásica conjugada con apantallador Black Hole de BHQ2 (Q) en el esqueleto de azúcar fosfato unido al extremo 3' de Id. de Sec. N°: 5
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (33)
 50 <223> g modificada por 3 'fosfato
 <400> 6
 attcctcgcc tgtccagga tctgctotta cag 33

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para detectar una secuencia diana en un polinucleótido en una muestra biológica, en el que la muestra puede contener también, o alternativamente, un segundo polinucleótido que comprende una segunda secuencia, en donde la segunda secuencia difiere de la secuencia diana por uno a 4 nucleótido(s), comprendiendo el método,
- 10 i. Poner en contacto la muestra con un oligonucleótido bloqueador bajo condiciones de la reacción de extensión del cebador para permitir la hibridación del oligonucleótido bloqueador a la segunda secuencia y la secuencia diana, si está presente
- 10 ii. Poner en contacto la muestra en presencia del oligonucleótido bloqueador hibridado con al menos un cebador y una polimerasa que carece significativamente de actividad exonucleasa 5'-3' en condiciones tales que se produce la extensión del cebador dependiente del molde, en el que el cebador se hibrida con los polinucleótidos, si está presente, corriente arriba de la secuencia que hibrida con el oligonucleótido bloqueador;
- 15 en el que el oligonucleótido bloqueador hibrida con la segunda secuencia lo suficiente como para impedir la amplificación de la segunda secuencia por la polimerasa, en el que el oligonucleótido bloqueador no comprende un nucleótido intercalante, en el que la hibridación del oligonucleótido bloqueador a la secuencia diana no afecta significativamente la amplificación de la secuencia diana por la polimerasa que carece de manera significativa de actividad nucleasa 5'-3' y además en la que el oligonucleótido bloqueador es totalmente complementario a la
- 20 secuencia diana excepto para la posición de uno a 4 nucleótido(s).
2. El método de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido bloqueador está marcado de forma detectable.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, en el que hay una sola diferencia de nucleótidos entre la secuencia diana y la segunda secuencia y el oligonucleótido bloqueador es totalmente complementario a la secuencia diana excepto para la posición del nucleótido único.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la diferencia entre:
- 30 - la temperatura de fusión del oligonucleótido bloqueador y la segunda secuencia; y
- la temperatura de fusión del oligonucleótido bloqueador y la secuencia diana
- es de al menos 5 °C según se mide en glicerol 2,5%, Tricina 50 mM pH 8,3, acetato de potasio 45 mM.
- 35 5. El método de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido bloqueador comprende al menos un nucleótido no natural, en el que el nucleótido no natural, no intercalante aumenta la temperatura de fusión del oligonucleótido bloqueador en comparación con un oligonucleótido de control que es por lo demás idéntico al oligonucleótido bloqueador excepto que tiene un nucleótido natural en el lugar del nucleótido no natural.
- 40 6. El método de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido bloqueador comprende al menos una porción no nucleotídica, en donde la porción no nucleotídica aumenta la temperatura de fusión del oligonucleótido bloqueador en comparación con un oligonucleótido de control que es por lo demás idéntico al oligonucleótido bloqueador excepto que carece de la porción no nucleotídica.
- 45 7. El método de la reivindicación 6, en donde la porción no nucleotídica se une a un surco menor del DNA.
8. El método de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido bloqueador hibrida con la segunda secuencia con una temperatura de fusión de al menos 70 °C según se mide en glicerol 2,5%, Tricina 50 mM pH 8,3, acetato de potasio 45 mM.
- 50

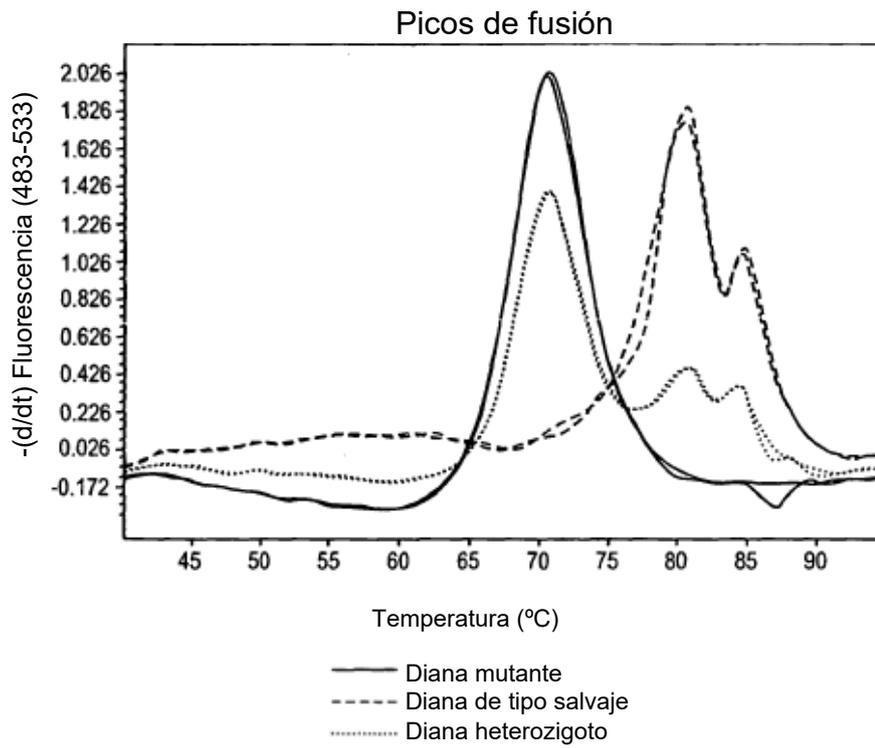
Figura 1





Sonda no estabilizada/ZO5

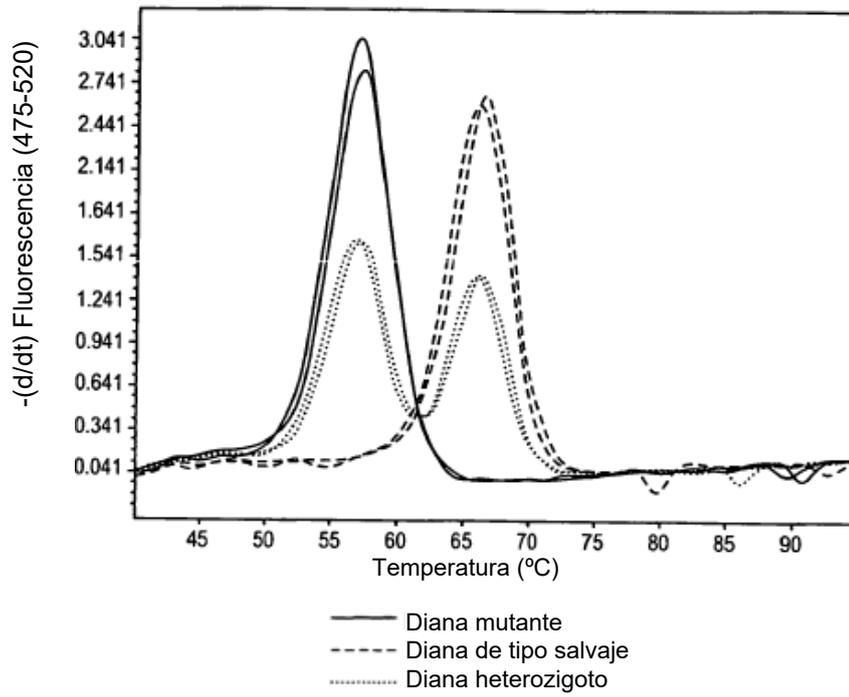
Fig.2



Sonda estabilizada/ZO5

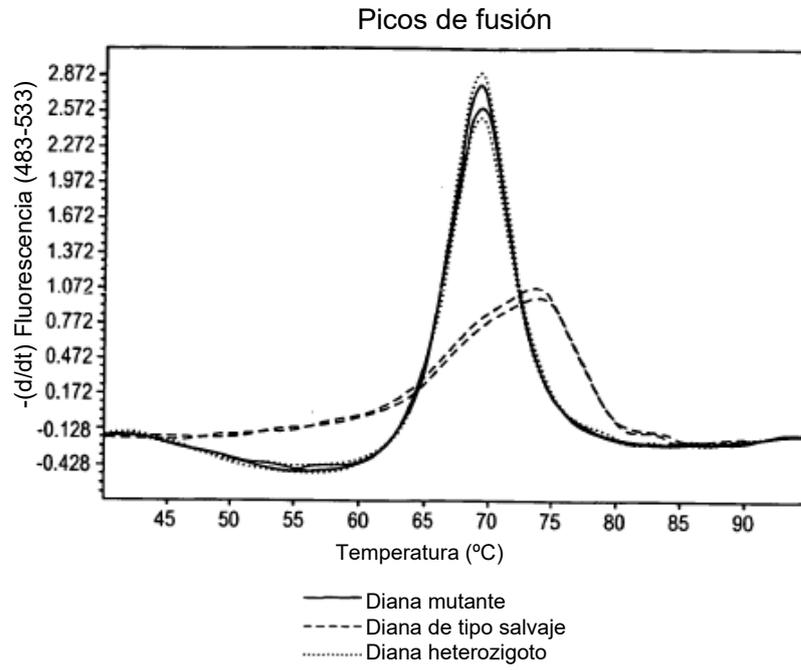
Fig.3

Picos de fusión



Sonda no estabilizada/ZO5

Fig.4



Sonda estabilizada/ZO5

Fig.5

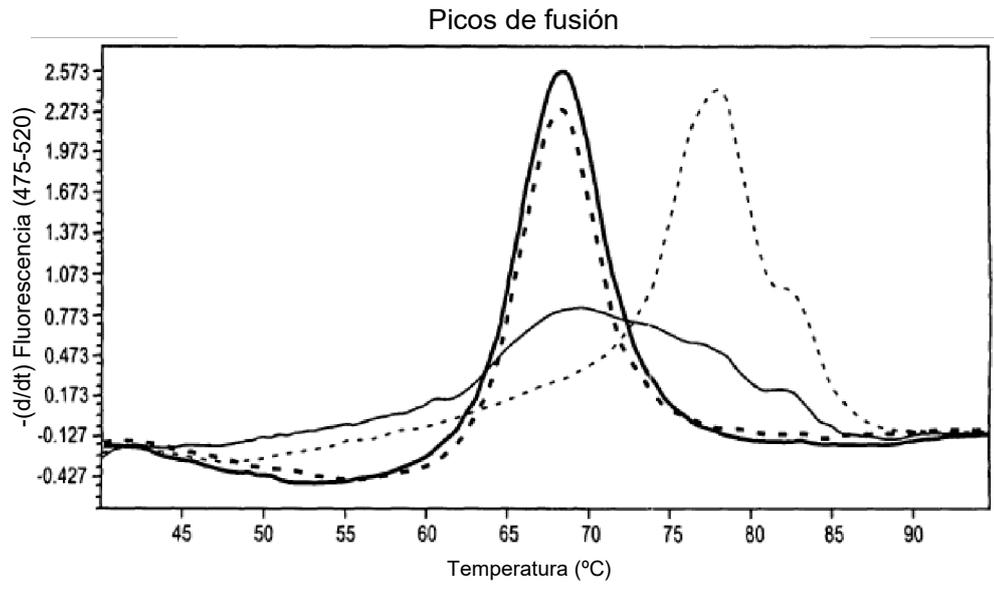


Fig.6