

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 898**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2012 PCT/EP2012/004944**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13079212**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2012 E 12801454 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2785863**

54 Título: **Supresión de amplificación no específica**

30 Prioridad:

02.12.2011 US 201161566518 P

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

16.02.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CHEN, XIAOYING;
CHENG, SUZANNE;
MYERS, THOMAS W.;
PATTEN, NANCY;
SCHOENBRUNNER, NANCY y
TRUONG, SIM-JASMINE C.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 601 898 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 amplificación no específica

5 Antecedentes de la invención

La amplificación de ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene muchas aplicaciones en la investigación biomédica, el diagnóstico y la biotecnología. La especificidad única de PCR permite la amplificación selectiva de una secuencia de ácido nucleico particular en presencia de una cantidad excesiva de otras secuencias. Además, la PCR puede distinguir una secuencia diana de otra secuencia que es diferente en tan poco como un único par de bases. Por ejemplo, la PCR específica de alelo (AS-PCR) es capaz de detectar alteraciones pequeñas en ADN e incluso mutaciones de un único nucleótido en presencia de ADN no mutante, de tipo silvestre (patente de Estados Unidos N.º 6.627.402). En un ensayo de PCR específico de alelo, al menos un cebador es específico de alelo, es decir, se ha diseñado para coincidir preferentemente con la secuencia (una variante específica de la secuencia), pero contiene desapareamientos diferenciables con secuencias no diana (otras variantes de la secuencia). Idealmente, se produce extensión de cebadores solamente cuando el cebador específico de alelo se hibrida con la secuencia diana. En una PCR específica de alelo exitosa, la variante diana del ácido nucleico se amplifica, mientras que las otras variantes no diana no, al menos no a un nivel detectable. Desafortunadamente, con muchas dianas, no se puede conseguir este ideal. Es habitual que en ciclos posteriores de PCR, también se haga detectable la amplificación de las variantes no diana de la secuencia. Este fenómeno se denomina "amplificación de avance". Incluso aunque los cebadores de AS-PCR sean perfectamente complementarios (o al menos compartan el mayor grado de complementariedad) con la secuencia diana y estén desapareados (o tengan más desapareamientos) con secuencias no diana, con frecuencia no puede evitarse completamente la amplificación de secuencias no diana.

La amplificación de avance es especialmente preocupante en ensayos en los que la muestra contiene cantidades pequeñas de la secuencia diana y cantidades grandes de la secuencia no diana. Por ejemplo, en un ensayo que se dirige a una mutación somática en un tumor, solamente una fracción de las células de la muestra del paciente son células tumorales. Una fracción de células tumorales pueden contener mutaciones que indican susceptibilidad a un fármaco antitumoral particular (véase, por ejemplo, mutaciones descritas en la patente de Estados Unidos N.º 7.294.468 y 7.960.118). En dicha muestra, se mezcla un número pequeño de secuencias diana (mutantes) con un gran número de secuencias no diana (no mutantes). La amplificación de avance de la secuencia mutante produciría un resultado de falso positivo, lo que indica falsamente la presencia de una mutación y dirección errónea de la terapia de paciente. Si la especificidad del ensayo está limitada por la amplificación de avance, también lo está la utilidad clínica del ensayo.

Se han propuesto diversos medios para prevenir o reducir la amplificación no específica (por ejemplo, modificaciones químicas que afectan a la especificidad de cebadores de amplificación, véase patente de Estados Unidos N.º 6.011.611; uso de un oligonucleótido bloqueador, véase la publicación de solicitud de Estados Unidos N.º 200953720). Sin embargo, estos métodos no siempre tienen éxito en la eliminación completa de la amplificación de avance. En consecuencia, existe la necesidad de métodos alternativos para prevenir o minimizar la amplificación de avance en una reacción de amplificación de ácido nucleico.

45 Sumario de la invención

Se desvela un oligonucleótido supresor para su uso en una reacción de amplificación de ácido nucleico, que tiene una secuencia que comprende al menos una región de homología con al menos 75 % de identidad con múltiples sitios en el genoma de un organismo diana.

50 En una realización, la invención es un método para diseñar un oligonucleótido supresor para su uso en una región de amplificación de ácido nucleico, que comprende usar algoritmos de alineamiento de secuencias para seleccionar un oligonucleótido que tiene una secuencia que comprende al menos una región de homología con al menos 75 % de identidad con múltiples sitios en el genoma de un organismo diana de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

55 En otra realización, la invención es un método para reducir la amplificación de un molde de ácido nucleico no diana en una reacción de amplificación de ácido nucleico, que comprende realizar la reacción de amplificación en presencia de un oligonucleótido supresor que tiene una secuencia que comprende al menos una región de homología con al menos 75 % de identidad con múltiples sitios en el genoma de un organismo diana de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

60 En otra realización más, la invención es un kit para realizar una reacción de amplificación con amplificación reducida de las secuencias no diana, que comprende un oligonucleótido supresor que tiene una secuencia que comprende al menos una región de homología con al menos 75 % de identidad en múltiples sitios en el genoma de un organismo diana de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

65

En otra realización más, la invención es una mezcla de reacción para realizar una reacción de amplificación con amplificación reducida de las secuencias no diana, que comprende un oligonucleótido supresor que tiene una secuencia que comprende al menos una región de homología con al menos 75 % de identidad con múltiples sitios en el genoma de un organismo diana de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

5 También se desvela el uso de un oligonucleótido supresor que tiene una secuencia que comprende al menos una región de homología con al menos 75 % de identidad con múltiples sitios en el genoma de un organismo diana, en una región de amplificación de ácido nucleico para reducir la amplificación no específica.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra amplificación del exón 2 (incluyendo codón 12) del gen NRAS humano mediante PCR específica de alelo con supresión de avance mediante el oligonucleótido supresor, usado también como uno de los cebadores. La Figura 1A muestra amplificación de avance no suprimida (línea discontinua) y la Figura 1B muestra supresión de la amplificación de secuencia no diana.

La Figura 2 muestra amplificación del exón 3 (incluyendo codón 61) del gen NRAS humano mediante PCR específica de alelo con supresión de avance mediante el oligonucleótido supresor que no es complementario de la secuencia diana. La Figura 2A no muestra supresión de la amplificación de avance sin el oligonucleótido supresor, la Figura 2B no muestra supresión cuando el oligonucleótido supresor estaba presente a baja concentración y

La Figura 2C muestra supresión cuando el oligonucleótido supresor estaba presente a una concentración relativa mayor.

La Figura 3 muestra amplificación del gen de *PI3KCA* humano mediante PCR específica de alelo con supresión de avance mediante el oligonucleótido supresor que no es complementario de la secuencia diana. La Figura 3A muestra amplificación de avance en ausencia del oligonucleótido supresor y la Figura 3B muestra supresión de la amplificación de avance en presencia del oligonucleótido supresor.

La Figura 4 muestra amplificación del gen *BRAF* humano (incluyendo codones 469 y 600) mediante PCR específica de alelo con supresión de amplificación de avance mediante el oligonucleótido supresor que no es complementario de la secuencia diana. La Figura 4A muestra amplificación de avance en ausencia del oligonucleótido supresor y la Figura 4B muestra la supresión de la amplificación de avance en presencia del oligonucleótido supresor en la reacción de codón 469. La Figura 4C muestra amplificación de avance en ausencia del oligonucleótido supresor y la Figura 4D muestra supresión de la amplificación de avance en presencia del oligonucleótido supresor en la reacción de codón 600.

La Figura 5 muestra amplificación de los exones 2 y 3 del gen *NRAS* humano mediante PCR específico de alelo con supresión de avance mediante amplificación lineal simultánea de la diana M13 para el exón 3 (codón 61), pero sin supresión de avance para el exón 2 (codón 12).

La Figura 6 muestra amplificación del exón 2 del gen *NRAS* humano mediante PCR específica de alelo con supresión de avance mediante oligonucleótidos supresores con diversos grados de homología con el genoma diana. La Figura 6A no muestra supresión de la amplificación de avance mediante un oligonucleótido supresor con bajo grado de homología; La Figura 6B muestra la supresión parcial mediante un oligonucleótido con grado de homología medio; la Figura 6C muestra supresión completa mediante un oligonucleótido con alto grado de homología.

La Figura 7 muestra resultados de una búsqueda de BLAST' con respecto a las regiones de interés en el exón 2 del gen *NRAS* humano para el diseño de oligonucleótidos supresores.

La Figura 8 muestra un ejemplo de selección de oligonucleótidos supresores de la región interés en el exón 2 del gen *NRAS* humano.

55 Descripción detallada de la invención

Para facilitar el entendimiento de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes definiciones de los términos usados en el presente documento.

La expresión "cebador específico de alelo" o "cebador AS" se refiere a un cebador que puede hibridar con más de una variante de la secuencia diana, pero que es capaz de diferenciar entre variantes de la secuencia diana, de modo que se produzca extensión eficaz del cebador mediante la ácido nucleico polimerasa en condiciones adecuadas solamente tras hibridación del cebador con una variante particular. Con otras variantes de la secuencia diana, la extensión es menos eficaz o ineficaz.

El término "amplicón" se refiere a un ácido nucleico formado como un producto de una reacción en cadena de la polimerasa.

5 La expresión "cebador común" se refiere al segundo cebador en el par de cebadores que incluye un cebador específico de alelo. El cebador común no es específico de alelo; es decir, no diferencia entre las variantes de la secuencia diana entre las que diferencia el cebador específico de alelo.

10 Los términos "complementario" o "complementariedad" se usan en referencia a cadenas antiparalelas de polinucleótidos relacionados por las reglas de formación de pares de bases de Watson-Crick. Las cadenas de ácido nucleico complementarias son capaces de formar dobles cadenas en condiciones de hibridación convencionales. Las expresiones "perfectamente complementarias" o "100 % complementarias" se refieren a secuencias complementarias que tienen emparejamiento de Watson-Crick de todas las bases entre las cadenas antiparalelas, es decir, no hay desapareamientos entre dos bases cualesquiera en la doble cadena polinucleotídica. Las expresiones "parcialmente complementarias" o "incompletamente complementarias" se refieren a cualquier alineamiento de bases entre cadenas polinucleotídicas antiparalelas que sea menos de 100 % perfecto (por ejemplo, existe al menos un desapareamiento o base no apareada en la doble cadena polinucleotídica). Una cadena de ácido nucleico menor (por ejemplo, un oligonucleótido) puede ser complementario de una región (sitio) en un ácido nucleico mayor, por ejemplo, un gen o un genoma. En condiciones de hibridación convencionales, se forman dobles cadenas entre cadenas antiparalelas incluso en ausencia de complementariedad perfecta. Sin embargo, las dobles cadenas entre cadenas parcialmente complementarias son generalmente menos estables que las dobles cadenas entre cadenas perfectamente complementarias.

25 Una "curva de crecimiento" en el contexto de un ensayo de amplificación de ácido nucleico es un gráfico de una función, en el que una variable independiente es el número de ciclos de amplificación y una variable dependiente es un parámetro medible dependiente de la amplificación medido en cada ciclo de amplificación. Típicamente, el parámetro medible dependiente de la amplificación es la cantidad de fluorescencia emitida por la sonda tras hibridación, o tras la hidrólisis de la sonda mediante la actividad nucleasa de la ácido nucleico polimerasa, véase, Holland *et al.*, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88:7276-7280 y patente de Estados Unidos N.º 5.210.015. En una reacción en cadena de la polimerasa típica, una curva de crecimiento comprende un segmento de crecimiento exponencial seguido de un nivel estable. Una curva de crecimiento se caracteriza típicamente por un valor de "ciclos hasta umbral" o valor " C_t " que es un número de ciclos en el que se consigue una magnitud predeterminada del parámetro medible. Un valor de C_t menor o "más temprano" representa amplificación más rápida, mientras que el valor de C_t mayor o "posterior" representa amplificación más lenta.

35 Las expresiones "homología" y "regiones de homología" se refieren a regiones (sitios) en los que dos ácidos nucleicos comparten al menos complementariedad parcial. Una región de homología puede abarcar solamente una parte de las secuencias. Por ejemplo, solamente una parte de un oligonucleótido puede ser homólogo de un sitio en el genoma. Diferentes partes del oligonucleótido pueden ser homólogas de varios sitios distintos en el genoma, mientras que un oligonucleótido completo puede ser homólogo de otro sitio más en el genoma. Como con cualquier secuencia de ácido nucleico parcialmente complementaria, una región de homología puede contener uno o más desapareamientos y huecos cuando se alinean las dos secuencias. Una cadena de ácido nucleico más pequeña (por ejemplo, un oligonucleótido) puede ser homólogo de una región (sitio) en un ácido nucleico mayor, por ejemplo, un gen o un genoma. La expresión "grado de homología" entre dos secuencias se refiere al grado de identidad entre las secuencias. El grado de identidad se expresa habitualmente como una relación de nucleótidos desapareados en la región homóloga con respecto al número total de nucleótidos, expresada en porcentaje. Por ejemplo, se dice que un oligonucleótido de 20 bases que hibrida con una región (sitio) homóloga en el genoma diana con dos desapareamientos tiene 90 % de identidad con esa región. La expresión "grado de homología con el genoma diana" es una medida del número y porcentaje de identidad de regiones de homología con el oligonucleótido presente en el genoma diana. Un oligonucleótido con alto grado de homología tiene muchas regiones de homología con alto porcentaje de identidad a lo largo del genoma diana, mientras que un oligonucleótido con una región de bajo grado de homología tendría menos regiones de homología con bajo porcentaje de identidad en el genoma diana.

55 Los términos "hibridado" e "hibridación" se refieren a la interacción de formación de pares de bases entre dos cadenas de ácido nucleico al menos parcialmente complementarias (como se define en el presente documento) que da como resultado la formación de una doble cadena. No se requiere que dos ácidos nucleicos tengan 100 % de complementariedad sobre su longitud completa para conseguir hibridación. Una cadena de ácido nucleico más pequeña (por ejemplo, un oligonucleótido) puede hibridar con una región (sitio) en un ácido nucleico mayor, por ejemplo, un gen o un genoma.

60 La expresión "múltiples regiones de homología" en relación con oligonucleótidos supresores homólogos de regiones de un genoma diana se usa para describir el número de dichas regiones en el genoma diana que es suficiente para apoyar la propiedad supresora del oligonucleótido. En general, "múltiple" significa más de uno, por ejemplo, 2, 3, 20, 30, 200, 300, 2000, 3000, etc., y cualquier número entero entre medias. Sin embargo, un número suficiente varía dependiendo de la complejidad del genoma diana, es decir, para genomas menos complejos, puede ser suficiente un número menor para que se produzca el fenómeno de supresión, mientras que, para genomas más complejos, se requeriría un mayor número.

Las expresiones “ácido nucleico”, “oligonucleótido” y “polinucleótido” se usa indistintamente para describir polímeros de ácido desoxirribo (o ribo) nucleico, incluyendo cebadores, sondas, ADN genómico o ARN de diversos organismos y fragmentos de ADN genómico o ARN, así como otros elementos genéticos, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, etc. Las expresiones no se limitan en longitud y son genéricas para polímeros de polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), y cualquier otro N-glucósido de una base de purina o pirimidina, o bases de purina o pirimidina modificadas. Estas expresiones incluyen ácidos nucleicos bi y monocatenarios. Los ácidos nucleicos pueden comprender enlaces fosfodiéster de origen natural o enlaces modificados incluyendo, pero sin limitación, enlaces tioéster. De forma similar, los ácidos nucleicos pueden comprender las cinco bases de origen biológico (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) u otros restos de bases modificadas, no convencionales o derivatizadas.

Los términos “polinucleótido” y “oligonucleótido” se usan indistintamente. “Oligonucleótido” es un término usado en ocasiones para describir un polinucleótido más corto. Un oligonucleótido puede comprender al menos 6 nucleótidos y hasta 100 nucleótidos.

La expresión “secuencia primaria” se refiere a la secuencia de nucleótidos en un polinucleótido u oligonucleótido. Las modificaciones de nucleótidos tales como modificaciones de bases nitrogenadas, modificaciones de azúcares u otras modificaciones de la cadena principal no son parte de la secuencia primaria. Los marcadores, tales como cromóforos conjugados con los oligonucleótidos tampoco son una parte de la secuencia primaria. Por lo tanto, dos oligonucleótidos pueden compartir la misma secuencia primaria, pero diferir con respecto a modificaciones y marcadores.

El término “cebador” se refiere a un oligonucleótido que hibrida con una secuencia en el ácido nucleico diana y es capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis a lo largo de una cadena complementaria de ácido nucleico en condiciones adecuadas para dicha síntesis. No se requiere una complementariedad perfecta para que se produzca la extensión de cebadores. Sin embargo, un cebador con complementariedad perfecta (especialmente cerca del extremo 3’ terminal) se extenderá más eficazmente que un cebador con desapareamientos, especialmente desapareamientos en o cerca del extremo 3’ terminal.

El término “sonda” se refiere a un polinucleótido que hibrida en una secuencia en el ácido nucleico diana y puede marcarse de forma detectable. La sonda puede tener modificaciones, tales como una modificación 3’ terminal que hace a la sonda no extensible por ácido nucleico polimerasas; y uno o más cromóforos. Un oligonucleótido con la misma secuencia puede actuar como un cebador en un ensayo y una sonda en un ensayo diferente.

La expresión “región de interés” se refiere a una región del genoma diana a partir de la que va a diseñarse el oligonucleótido supresor.

El término “muestra” se refiere a cualquier composición que contiene o se supone que contiene ácido nucleico. Esto incluye una muestra de tejido o fluido aislado de un individuo. Por ejemplo, piel, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, líquido sinovial, orina, lágrimas, células sanguíneas, órganos y tumores, y también muestras de cultivos *in vitro* establecidos a partir de células tomadas de un individuo, incluyendo los tejidos incluidos en parafina fijados en formalina (FFPET) y ácidos nucleicos aislados de los mismos.

La expresión “oligonucleótido supresor” se refiere a un oligonucleótido que, cuando está presente en la mezcla de PCR, suprime o reduce de forma detectable la amplificación de cualquier secuencia no diana. En algunos casos, el oligonucleótido supresor reduce de forma detectable la amplificación exponencial de la secuencia no diana en PCR específica de alelo. El oligonucleótido supresor puede tener opcionalmente funciones adicionales, incluyendo actuar como un cebador para amplificación de la secuencia diana.

Un “molde” o “diana” se refiere a un ácido nucleico que se va a amplificar, detectar o ambos. La diana o el molde es una secuencia con la que puede hibridar un cebador o una sonda. Los ácidos nucleicos molde pueden derivar de esencialmente cualquier fuente, incluyendo microorganismos, mezclas biológicas complejas, tejidos, fluidos corporales, sueros, muestras biológicas conservadas, aislados ambientales, preparaciones *in vitro* o similares. El molde o la diana pueden constituir toda o una parte de una molécula de ácido nucleico.

La expresión “organismo diana” se refiere a un organismo cuya muestra de ácido nucleico se está analizando. El genoma del organismo diana se denomina “genoma diana”.

La expresión “secuencia diana” se refiere a una secuencia del organismo diana de la que se desea amplificación. La expresión “secuencia no diana” se refiere a otra secuencia de la que no se desea amplificación y que debe evitarse. En el contexto de PCR específica de alelo, la secuencia no diana de interés es consecuencia una variante muy similar de la secuencia diana. Aunque no se desee, la secuencia no diana en ocasiones se amplifica mediante PCR específica de alelo junto con la secuencia diana, pero con menor eficacia.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) capaz de amplificar específicamente una secuencia de ácido nucleico diana presente entre un número mucho mayor de otras secuencias. La PCR específica de alelo (AS-PCR) es un

método capaz de distinguir entre secuencias que difieren en tan poco como un único nucleótido. La sensibilidad y especificidad de PCR y AS-PCR es tal que la variante diana del ácido nucleico puede amplificarse selectivamente incluso en presencia de cantidades mucho mayores de variantes no diana y secuencias no relacionadas. Idealmente, los ácidos nucleicos no diana nunca se amplifican hasta un nivel detectable. Sin embargo, la sensibilidad de ensayos de PCR y AS-PCR tiene un reto en un fenómeno denominado "amplificación de avance", que es amplificación detectable de la secuencia de ácido nucleico no diana durante los ciclos posteriores de PCR.

Al realizar PCR específica de alelo, los inventores descubrieron que ciertos oligonucleótidos (inicialmente usados como cebadores) reducen significativamente la amplificación de avance cuando están presentes en ensayos de AS-PCR (Ejemplo 1, Figura 1). Cuando estos oligonucleótidos supresores se investigaron adicionalmente, se descubrió que, más sorprendentemente, los oligonucleótidos ejercen el mismo efecto en dianas no relacionadas, es decir, dianas que no tienen regiones de complementariedad con los oligonucleótidos supresores (Ejemplo 2, Figura 2, Ejemplo 3, Figura 3 y Ejemplo 4, Figura 4). En consecuencia, los inventores idearon métodos de diseño y uso de dichos oligonucleótidos para mejorar los ensayos de PCR y AS-PCR.

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, los inventores plantean la hipótesis de que uno de los mecanismos de supresión de avance puede ser secuestro de reactivos de PCR en los ciclos posteriores de amplificación cuando se produce habitualmente la amplificación de avance. En los ciclos posteriores de PCR, la amplificación de la secuencia diana cesa (se alcanza el nivel estable), en parte debido a que la rehibridación de amplicones bicatenarios está favorecida cinéticamente frente a la hibridación de cebadores con cadenas individuales de amplicones desnaturalizados. En ese estadio, los cebadores en exceso se ponen a disposición para amplificación de avance menos específica (y por tanto menos eficaz) que implica extensión de un cebador desapareado hibridado con la secuencia no diana. Sin embargo, los parámetros termodinámicos de la extensión de cebadores desapareados son desfavorables. En consecuencia, la extensión de cebadores desapareados se ve afectada en gran medida por el agotamiento o secuestro de componentes tales como nucleótidos y ácido nucleico polimerasa. Las propiedades del oligonucleótido supresor permiten la extensión de cebadores lineales en otra parte del genoma y (opcionalmente) para generación exponencial de amplicones adicionales en otra parte del genoma. Estas reacciones ajenas, aunque se puede discutir que no son muy eficaces en sí mismas, secuestran reactivos críticos e inhiben la amplificación de avance que requiere estos reactivos. Para ensayar esta hipótesis, los inventores realizaron un experimento descrito en el Ejemplo 5. En ese Ejemplo, se realizó un ensayo de AS-PCR conocido por su amplificación de avance (Figura 5A) en presencia de una combinación de cebador/diana modificada técnicamente capaz de iniciar múltiples reacciones de extensión lineal. Se ha predicho que las múltiples reacciones de extensión lineal generan parte del efecto de agotamiento y suprimen la amplificación de avance. De hecho, se observó algo de supresión de la amplificación de avance (Figura 5B).

Se desvela un oligonucleótido supresor para suprimir la amplificación de secuencias no diana en una reacción de amplificación, por ejemplo, PCR o PCR específica de alelo (AS-PCR). El oligonucleótido supresor es homólogo de múltiples sitios en el genoma del organismo diana. Estos sitios en el genoma diana comprenden regiones de homología con el oligonucleótido supresor. En algunas realizaciones, las regiones de homología entre el oligonucleótido supresor y el genoma diana tienen al menos 75 % de identidad. En algunas realizaciones, las regiones de homología son de al menos 15 pares de bases de longitud. Sin embargo, se entiende que para ciertas secuencias (por ejemplo, secuencias ricas en GC) regiones más cortas de homología o regiones con menos de 75 % de identidad pueden también ofrecer resultados satisfactorios. En general, cuanto mayor sea la identidad de cada una de las regiones de homología, mejor será el efecto supresor como se demuestra en el Ejemplo 6, Figura 6. En otras realizaciones más, la región de homología abarca el extremo 3' del oligonucleótido supresor. En otras realizaciones más, dentro de los últimos 4 pares de bases en el extremo 3' del oligonucleótido, la región de homología no contiene más de 2 desapareamientos. En algunas realizaciones la al menos una región de homología es de al menos 15 pares de bases de longitud y/o abarca el extremo 3' del oligonucleótido supresor y/o no contienen más de dos desapareamientos a una distancia de 4 nucleótidos del extremo 3'. En ciertas realizaciones la al menos una región de homología además de tener una homología entre el oligonucleótido supresor y el genoma diana de al menos 75 % de identidad tiene una o más de las siguientes propiedades: es de al menos 15 pares de bases de longitud; abarca el extremo 3' del oligonucleótido supresor; no contiene más de dos desapareamientos a una distancia de 4 nucleótidos del extremo 3'. En ciertas otras realizaciones los oligonucleótidos supresores comprenden o consisten en una secuencia de ácido nucleico que tiene SEQ ID NO: 1-5 (véase Tabla 1).

Es deseable que el oligonucleótido supresor provoque mínima interferencia con la amplificación y detección de la secuencia diana. Si un oligonucleótido supresor es capaz de generar amplicones adicionales (no diana), estos amplicones adicionales pueden detectarse y por tanto interferir con la detección de la secuencia diana. Preferentemente se evita la generación de los amplicones mediante el oligonucleótido supresor. En variaciones de esta realización, el oligonucleótido supresor posee una propiedad adicional: no es capaz de generar amplicones adicionales. Un amplicón de PCR se genera de una manera exponencial solamente cuando están presentes cebadores tanto directos como inversos. Por lo tanto, un oligonucleótido es capaz de cebar síntesis exponencial de un amplicón si se empareja con otro oligonucleótido (incluyendo el mismo) que es capaz de hibridar con una secuencia en la cadena opuesta del mismo ácido nucleico, localizándose dicha secuencia a no más de aproximadamente 1000 pares de bases del sitio de hibridación del primer oligonucleótido. Se entiende que, en algunos casos, por ejemplo, cuando se usa una ácido nucleico polimerasa de alta capacidad de procesamiento

(véase por ejemplo patente de Estados Unidos N.º 7.855.055), también pueden generarse amplicones no diana mayores de 1000 pares de bases e interferir con amplificación y detección del ácido nucleico diana. En consecuencia, cuando se usa una polimerasa de alta capacidad de procesamiento, puede excluirse un oligonucleótido supresor potencial basándose en un límite superior mayor de 1000 pares de bases. En ese caso, se excluirían más oligonucleótidos supresores potenciales. Por otro lado, con ácido nucleico fragmentado (por ejemplo, ácido nucleico aislado de tejidos incluidos en parafina fijados en formalina, FFPET), no son posibles amplicones más largos y un oligonucleótido supresor potencial puede excluirse basándose en un límite de menos de 1000 pares de bases. En ese caso, se excluirían menos oligonucleótidos supresores potenciales.

No se usa un oligonucleótido como un oligonucleótido supresor si tiene al menos dos regiones de homología localizadas en las cadenas opuestas del genoma diana, teniendo dichas regiones al menos 75 % de identidad entre el oligonucleótido y la secuencia de genoma diana, en el que dichas regiones de homología están separadas por menos de aproximadamente 1000 pares de bases.

Un oligonucleótido supresor puede prepararse por cualquier método adecuado para preparar un oligonucleótido, habitualmente síntesis química usando prácticos e instrumentos disponibles en el mercado. Como alternativa, un oligonucleótido puede obtenerse a través de fuentes comerciales. Se conocen bien en la técnica métodos para sintetizar oligonucleótidos (véase, Narang *et al.*, Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979; Brown *et al.*, Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979; Beaucage *et al.*, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862, 1981; o patente de Estados Unidos N.º 4.458.066).

En variaciones de esta realización, la invención comprende oligonucleótidos supresores de SEQ ID NO: 1-5.

Se desvela un método para diseñar un oligonucleótido supresor para suprimir la amplificación de secuencias no diana en reacción de amplificación, por ejemplo, PCR o PCR específica de alelo (AS-PCR). El método para diseñar oligonucleótidos supresores de la presente invención se basa en algoritmos de alineamiento de secuencias. En algunas realizaciones, el método de diseño de oligonucleótidos de la presente invención usa software de alineamiento de secuencias. Dicho software está ampliamente disponible en la actualidad y en muchos casos, es accesible al público sin coste. Por ejemplo, los Institutos Nacionales de Salud han puesto a disponibilidad sin coste a través de su sitio web el paquete de software BLAST® (Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básica). La invención no se limita al uso de BLAST®, sino que BLAST® es solamente un ejemplo de un paquete de software adecuado. Otros ejemplos de software de alineamiento de secuencias por pares incluyen ACANA (Huang *et al.* (2006) Accurate anchoring alignment of divergent sequences. Bioinformatics 22: 29-34), Bioconductor (software de código abierto libremente distribuido por el Centro de Investigación de Cáncer Fred Hutchinson), FEAST (paquete de software distribuido sin coste por la Universidad de Waterloo, Canadá), FASTA (paquete de software distribuido sin coste por la Universidad de Virginia), REPuter (Kurtz *et al.* (2001) REPuter: The Manifold Applications of Repeat Analysis on a Genomic Scale, Nucleic Acids Res., 29(22):4633-4642), SWIFT BALSAM (filtro Básico para búsqueda de Alineamiento sin huecos Semiglobal) (Rasmussen *et al.* (2006) Efficient q-Gram Filters for Finding All epsilon-Matches over a Given Length, J. Comp. Biol. 13(2), 296-308). Por lo tanto, en algunas realizaciones el algoritmo del alineamiento de secuencias usado en el método para diseñar un oligonucleótido supresor según la invención se selecciona de herramienta de búsqueda del alineamiento local básica, proceso de Smith-Waterman, ACANA, Bioconductor, FEAST, FASTA, REPuter y SWIFT BALSAM.

En una realización, el método de la presente invención comprende el uso de algoritmos de alineamiento de secuencia para seleccionar un oligonucleótido caracterizado por tener múltiples regiones de homología con el genoma diana. En algunas realizaciones, el método usa algoritmos de alineamientos de secuencias para seleccionar un oligonucleótido en el que las regiones de homología entre el supresor y el genoma diana tienen al menos el 75 % de identidad. En algunas realizaciones, el método usa algoritmos de alineamiento de secuencias para seleccionar un oligonucleótido en el que las regiones de homología son de al menos 15 pares de bases de longitud. En otras realizaciones más, el método usa algoritmos de alineamiento de secuencias para seleccionar un oligonucleótido en el que las regiones de homología abarcan el extremo 3' del oligonucleótido. En otras realizaciones más, el método usa algoritmos de alineamiento de secuencias para seleccionar un oligonucleótido en el que dentro de los últimos cuatro pares de bases en el extremo 3' del oligonucleótido, la región de homología no contiene más de 2 desapareamientos. En algunas realizaciones la al menos una región de homología es de al menos 15 pares de bases de longitud y/o abarca el extremo 3' del oligonucleótido supresor y/o no contiene más de 2 desapareamientos a una distancia de 4 nucleótidos del extremo 3'. En ciertas realizaciones la al menos una región de homología además de tener una homología entre el oligonucleótido supresor y el genoma diana de al menos 75 % de identidad tiene una o más de las siguientes propiedades: es de al menos 15 pares de bases de longitud; abarca el extremo 3' del oligonucleótido supresor; no contiene más de 2 desapareamientos a una distancia de 4 nucleótidos desde el extremo 3'. En variaciones de esta realización, el método de la presente invención comprende el uso de algoritmos de alineamiento de secuencias para excluir un oligonucleótido de su uso como un oligonucleótido supresor si el oligonucleótido tiene al menos dos regiones de homología localizadas en las cadenas opuestas del genoma diana, teniendo dichas regiones al menos el 75 % de identidad entre el oligonucleótido y la secuencia del genoma diana, en el que dichas regiones de homología están separadas por menos de aproximadamente 1000 pares de bases.

El oligonucleótido supresor deriva de una región de interés seleccionada por el usuario. La región de interés puede contener o estar adyacente a la secuencia diana, o puede ser una región no realizada del genoma. No existe limitación sobre el tamaño de la región de interés, aunque en general una región mayor puede producir más opciones para el diseño de los oligonucleótidos supresores. En general, la región de interés debería poseer algunas de las características deseadas en los oligonucleótidos supresores. En algunas realizaciones del método, la región de interés comprende múltiples regiones de homología con el genoma diana que tienen al menos el 75 % de identidad y son al menos de 15 nucleótidos de longitud.

Se desvela un método que comprende las siguientes etapas realizadas con el uso de algoritmos de alineamiento de secuencias:

- (a) identificar una o más regiones de interés;
- (b) realizar una búsqueda de la secuencia de genoma diana usando las regiones de interés como una consulta para identificar regiones de homología entre la región de interés y el genoma diana;
- (c) seleccionar secciones de la región de interés que tienen más regiones de homología con el genoma diana;
- (d) diseñar uno o más oligonucleótidos en las secciones seleccionadas en la etapa (c);
- (e) realizar una búsqueda del genoma diana con los oligonucleótidos diseñados en la etapa (d) para identificar los oligonucleótidos con el número máximo de regiones de homología con el genoma diana que cumplen uno o ambos de los siguientes criterios: al menos 75 % de identidad y no más de 2 desapareamientos presentes en la región 3' terminal del oligonucleótido;
- (f) opcionalmente, realizar una búsqueda del genoma diana con los oligonucleótidos diseñados en la etapa (d) para identificar y excluir los oligonucleótidos que tienen al menos dos regiones de homología localizadas en las cadenas opuestas de la secuencia de genoma diana que están separadas por menos de aproximadamente 1000 pares de bases.

En general, se van a seleccionar la región de interés y el oligonucleótido con más regiones de homología identificadas en la etapa (e) y, opcionalmente, seleccionados como no capaces de generar un amplicón no diana (f). Se entiende, sin embargo, que un número excesivo de regiones de homología puede ser perjudicial para el ensayo en su conjunto. Por ejemplo, un oligonucleótido homólogo de un elemento altamente repetitivo en el genoma diana iniciará un número excesivo de extensiones de cebadores que sobrepasarán la reacción. Véase por ejemplo, Kazazian, H (2004) Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution, Science 303 (5664): 1626-1632 (el elemento repetitivo *Alu* constituye el 11 % del genoma humano, es decir, aparece aproximadamente 3×10^8 a lo largo del genoma).

El Ejemplo 6 demuestra la aplicación del método. La Figura 7 es una ilustración de las etapas (a) a (c) realizada usando BLAST[®]. La Figura 8 es una ilustración de las etapas (d) a (e) realizadas usando BLAST[®].

Tabla 1

Oligonucleótidos supresores	
SEQ ID NO:	Secuencia 5'-3'
SEQ ID NO: 1	CTACCACTGGGCCTCACCT
SEQ ID NO: 2	CAGGATCAGGTCAGCGGGCT
SEQ ID NO: 3	AGACAGGATCAGGTCAGCGGG
SEQ ID NO: 4	CAGGTCAGCGGGCTACCACT
SEQ ID NO: 5	ACAAGTGAGAGACAGGATCAGG

Para una extensión exitosa de un cebador, es necesario que el cebador tenga al menos complementariedad parcial con la secuencia diana. En general, la complementariedad en el extremo 3' del cebador es más crítica que la complementariedad en el extremo 5' del cebador (Innis *et al.* Eds. PCR Protocols, (1990) Academic Press, Capítulo 1, pp. 9-11). Por lo tanto la presente invención abarca los oligonucleótidos desvelados en la Tabla 1, así como variantes de estos oligonucleótidos con variaciones en el extremo 5'.

En una realización, la invención es un método para suprimir o reducir la amplificación de una secuencia no diana en una reacción de amplificación, por ejemplo, PCR o PCR específica de alelo (AS-PCR), que comprende realizar la amplificación tal como, por ejemplo, la AS-PCR en presencia de un oligonucleótido supresor que es homólogo de múltiples sitios en la secuencia genómica del organismo diana. En algunas realizaciones, las regiones de homología entre el oligonucleótido supresor y el genoma diana tienen al menos el 75 % de identidad. En algunas realizaciones, las regiones de homología son de al menos 15 pares de bases de longitud. En otras realizaciones más, la región de homología abarca el extremo 3' del oligonucleótido supresor. En otras realizaciones más, dentro de los últimos cuatro pares de bases del extremo 3' del oligonucleótido, la región de homología contiene no más de 2 desapareamientos. En algunas realizaciones, la al menos una región de homología es de al menos 15 pares de bases de longitud y/o abarca el extremo 3' del oligonucleótido supresor y/o no contiene más de 2 desapareamientos a una distancia de 4 nucleótidos del extremo 3'. En ciertas realizaciones la al menos una región de homología

además de tener una homología entre el oligonucleótido supresor y el genoma diana de al menos 75 % de identidad tiene una o más de las siguientes propiedades: es de al menos 15 pares de bases de longitud; abarca el extremo 3' del oligonucleótido supresor; no contiene más de 2 desapareamientos a una distancia de 4 nucleótidos del extremo 3'. En otras realizaciones más, un oligonucleótido no se usa como un oligonucleótido supresor si tiene al menos dos regiones de homología localizadas en las cadenas opuestas del genoma diana, teniendo dichas regiones de homología al menos 75 % de identidad entre el oligonucleótido y la secuencia de genoma diana, en el que dichas regiones de homología están separadas por menos de aproximadamente 1000 pares de bases. En variaciones de esta realización, el método comprende el uso de oligonucleótidos supresores que comprenden o consisten en una secuencia de ácido nucleico que tiene SEQ ID NO: 1-5.

El método de la presente solicitud es aplicable a PCR tradicional así como PCR específica de alelo. La PCR específica de alelo es una variación de PCR en la que los cebadores se diseñan para amplificar la secuencia diana para evitar la aplicación de otra secuencia estrechamente relacionada. La PCR específica de alelo se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 6.627.402. En PCR específica de alelo, al menos uno de los cebadores es el cebador diferenciador que tiene una secuencia complementaria de la secuencia diana, pero que tienen desapareamientos con la secuencia no diana. Típicamente, el nucleótido diferenciador en el cebador, es decir el nucleótido que coincide solamente con la secuencia diana, es el nucleótido 3' terminal. En casos en los que el cebador no es perfectamente complementario de la secuencia diana, aún comprende un mayor grado de complementariedad de la secuencia diana en comparación con la secuencia no diana. El diseño de cebadores específicos de alelo y métodos generales de optimización de los cebadores para amplificación de ácido nucleico se ha descrito, por ejemplo, en PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.*, eds., (1990) Academic Press.

Típicamente, los cebadores son oligonucleótidos sintéticos, compuestos de nucleótidos A, C, G y T. Sin embargo, también pueden usarse nucleótidos de bases no convencionales, no hallados normalmente en ácidos nucleicos. Por ejemplo, se sabe que ciertas bases modificadas aumentan la especificidad de amplificación, véase Patente de Estados Unidos n.º 6.001.011. Innis *et al.* (mencionada anteriormente) también contiene instrucciones sobre la selección de ácido nucleico polimerasas para su uso en PCR. Las ADN polimerasas termoestables ejemplares incluyen las de *Thermus thermophilus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus sp. ZO5* (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 5.674.738), *Thermus aquaticus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, *Thermus sp. sps17*, *Deinococcus radiodurans*, familia de Fuente Caliente B/clon 7, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldotenax*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana* y *Thermosiphon africanus*.

Puede conseguirse detección de los productos de amplificación mediante cualquier método conocido en la técnica. Estos métodos de detección incluyen el uso de cebadores y sondas marcados así como diversos colorantes de unión a ácido nucleico. El medio de detección puede ser específico de una variante de la secuencia diana, o puede ser genérico para todas las variantes de la secuencia diana o incluso para todo el ADN bicatenario. Los productos de amplificación pueden detectarse después de haberse completado la amplificación, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de los productos no marcados y tinción del gel con un colorante de unión a ácido nucleico. Como alternativa, los productos de amplificación pueden portar un marcador radiactivo o uno químico, bien en virtud de incorporación durante la síntesis o en virtud de tener un cebador marcado. Durante o después de la electroforesis, los productos de amplificación marcados pueden detectarse con herramientas radiológicas o químicas adecuadas conocidas en la técnica. Después de electroforesis, el producto también puede detectarse con una sonda específica de diana marcada por uno cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. La sonda marcada también puede aplicarse a la diana sin electroforesis, es decir, en un ensayo de "transferencia puntual" o similares.

En algunas realizaciones, la presencia del producto de amplificación puede detectarse en un ensayo homogéneo, es decir, un ensayo en el que se detecta un producto naciente durante los ciclos de amplificación, y no se requiere ninguna manipulación pos-amplificación. Se ha descrito un ensayo de amplificación homogéneo usando una sonda de nucleasa, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 5.210.015. El ensayo de amplificación homogéneo usando colorantes intercalantes de ácido nucleico se ha descrito por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.871.908 y 6.569.627. El ensayo homogéneo también puede emplear una o más sondas fluorescentes cuando la hibridación de las sondas con el producto de extensión da como resultado digestión enzimática de la sonda y detección de la fluorescencia resultante (método de sonda TaqMan™, Holland *et al.* (1991) P.N.A.S. USA 88: 7276-7280). Otros métodos usan dos sondas marcadas con dos fluoróforos de interacción. Los ejemplos de dichas sondas incluyen sondas de "baliza molecular" (Tyagi *et al.*, (1996) Nat. Biotechnol., 14: 303-308) o sondas de nucleasa marcadas con fluorescencia (Livak *et al.*, (1995) PCR Meth. Appl., 4: 357-362).

En un ensayo homogéneo, la reacción se caracteriza por una curva de crecimiento que muestra el aumento de fluorescencia de una sonda con cada ciclo de PCR (véase Holland *et al.* (mencionado anteriormente) y Patente de Estados Unidos n.º 5.210.015). Cada curva de crecimiento se caracteriza por un valor de "ciclos hasta umbral" o valor "C_t". Un valor de C_t inferior representa una compleción más rápida de la amplificación, mientras que el valor C_t mayor representa compleción de amplificación más lenta. Un valor C_t menor también puede representar una aportación inicial mayor del ácido nucleico diana, mientras que un valor C_t mayor puede representar una aportación inicial menor. En el caso de PCR específica de alelo, sin embargo, el valor C_t menor representa amplificación eficaz.

Durante la amplificación de avance, la secuencia no diana produce un valor C_t muy alto a pesar de la gran cantidad de la secuencia no diana presente. El valor C_t alto refleja una amplificación muy ineficaz del ácido nucleico no diana.

5 Se desvela un kit que contiene reactivos necesarios para realizar una reacción de amplificación, por ejemplo PCR o AS-PCR, con amplificación reducida de secuencias no diana. Los reactivos comprenden al menos un oligonucleótido supresor caracterizado por tener múltiples regiones de homología con el genoma diana. En algunas realizaciones la al menos una región de homología es de al menos de 15 pares de bases de longitud y/o abarca el extremo 3' del oligonucleótido supresor y/o no contiene más de 2 desapareamientos a una distancia de 4 nucleótidos del extremo 3'. En ciertas realizaciones la al menos una región de homología además de tener una homología entre el
10 oligonucleótido supresor y el genoma diana de al menos 75 % de identidad tiene una o más de las siguientes propiedades: es de al menos 15 pares de bases de longitud; abarca el extremo 3' del oligonucleótido supresor; no contiene más de 2 desapareamientos a una distancia de 4 nucleótidos del extremo 3'. En otras realizaciones más, no se incluye un oligonucleótido en el kit como un oligonucleótido supresor si tiene al menos dos regiones de homología localizadas en las cadenas opuestas del genoma diana, teniendo dichas regiones de homología al menos
15 75 % de identidad entre el oligonucleótido y la secuencia de genoma diana, en el que dichas regiones de homología están separadas en menos de aproximadamente 1000 pares de bases. En variaciones de estas realizaciones los oligonucleótidos supresores comprenden o consisten en una secuencia de ácido nucleico que tiene SEQ ID NO: 1-5.

20 El kit comprende el oligonucleótido supresor y al menos otro reactivo seleccionado del grupo que consiste en uno o más cebadores específicos de alelo, uno o más cebadores comunes correspondientes y opcionalmente, una o más sondas. El kit puede comprender además reactivos necesarios para la realización de una amplificación y ensayo de detección, tal como nucleósido trifosfatos, al menos un ácido nucleico polimerasa y/o tampones necesarios para la función de la polimerasa. En algunas realizaciones, la sonda se marca de forma detectable. En dichas realizaciones,
25 el kit puede comprender reactivos para detectar el marcador. Opcionalmente, el kit también puede contener reactivos que potencian el rendimiento de la PCR, incluyendo dUTP y uracilo-N-glucosilasa (UNG) para reducir la contaminación, y betaína para mejorar la especificidad.

30 Se desvela una mezcla de reacción para realizar una reacción de amplificación, por ejemplo, PCR o PCR específica de alelo, con amplificación reducida de secuencias no diana. La mezcla comprende al menos un oligonucleótido supresor caracterizado por tener múltiples regiones de homología con el genoma diana. En algunas realizaciones, las regiones de homología tienen una o más de las siguientes propiedades: al menos 75 % de identidad entre el oligonucleótido supresor y la secuencia de genoma diana; al menos 15 pares de bases de longitud; abarcan el extremo 3' del oligonucleótido supresor; y dentro de los últimos cuatro pares de bases del extremo 3' del oligonucleótido, la región de homología no contiene más de 2 desapareamientos. En algunas realizaciones la al menos una región de homología es de al menos 15 pares de bases de longitud y/o abarca el extremo 3' del oligonucleótido supresor y/o no contiene más de 2 desapareamientos a una distancia de 4 nucleótidos del extremo 3'. En ciertas realizaciones la al menos una región de homología además de tener una homología entre el oligonucleótido supresor y el genoma diana de al menos 75 % de identidad tiene una o más de las siguientes propiedades: es de al menos de 15 pares de bases de longitud; abarca el extremo 3' del oligonucleótido supresor; no contiene más de 2 desapareamientos a una distancia de 4 nucleótidos del extremo 3'. En algunas realizaciones la mezcla además del oligonucleótido supresor comprende uno o más cebadores específicos de alelo, uno o más cebadores comunes correspondientes y opcionalmente, una o más sondas. En ciertas realizaciones la mezcla de reacción puede comprender además reactivos tales como nucleósido trifosfatos, al menos un ácido nucleico polimerasa y/o tampones necesarios para la función de la polimerasa. En otras realizaciones más, no se incluye un oligonucleótido en la mezcla de reacción como un oligonucleótido supresor si tiene al menos dos regiones de homología localizadas en las cadenas opuestas del genoma diana, teniendo dichas regiones de homología al menos 75 % de identidad entre el oligonucleótido y la secuencia de genoma diana, en el que dichas regiones de homología están separadas por menos de aproximadamente 1000 pares de bases. En variaciones de estas realizaciones los oligonucleótidos supresores comprenden o consisten en una secuencia de ácido que tiene SEQ ID NO: 1-5.
50

Ejemplos

Ejemplo 1

55 *Supresión de amplificación de avance por un cebador de PCR*

En este ejemplo, se observó supresión de la amplificación de avance en una AS-PCR que se dirigía a mutaciones en el codón 12 del gen NRAS humano. Los cebadores y sondas usados en el Ejemplo 1 se muestran en la Tabla 2. Un cebador cadena arriba seleccionado de entre SEQ ID NO: 6-23 se empareja con una de las mutaciones 35G>C, 34G>T, 35G>A, 34G>C, 34G>A y 35G>T correspondientes a los cambios de aminoácidos G12A, G12C, G12D, G12R, G12S y G12V en el exón 2 del gen NRAS humano y está desapareado con la secuencia de tipo silvestre. Un cebador cadena abajo seleccionado de SEQ ID NO: 24-26 es habitual entre las secuencias mutantes y de tipo silvestre del exón 2 en el gen NRAS humano y la sonda de detección se selecciona de SEQ ID NO: 27-29.
60

65

Tabla 2

<i>Cebadores y sondas para el exón 2 del gen NRAS usado en el Ejemplo 1</i>		
SEQ ID NO:	Función	Secuencia 5'-3'
SEQ ID NO: 6	Cebador AS 35G>C	CTGGTGGTGGTTGGAGCCGC
SEQ ID NO: 7	Cebador AS 35G>C	CTGCTGGTGGTTGGAGEAGC
SEQ ID NO: 8	Cebador AS 35G>C	CTGCTGGTGGTTGGAGCMGC
SEQ ID NO: 9	Cebador AS 34G>T	CAAAGTGGTGGTGGTTGGAGCTT
SEQ ID NO: 10	Cebador AS 34G>T	TACAAAGTGGTGGTGGTTGGAGCTT
SEQ ID NO: 11	Cebador AS 34G>T	CAGAGTGGTGGTGGTTGGAGCDT
SEQ ID NO: 12	Cebador AS 35G>A	AAGTGGTGGTGGTTGGAGCDGA
SEQ ID NO: 13	Cebador AS 35G>A	AACTGGTGGTGGTTGGAGTMGA
SEQ ID NO: 14	Cebador AS 35G>A	AACTGGTGGTGGTTGGAGCTGA
SEQ ID NO: 15	Cebador AS 34G>C	AACTGGTGGTGGTTGGAAACAC
SEQ ID NO: 16	Cebador AS 34G>C	AACTGGTGGTGGTTGGATCAC
SEQ ID NO: 17	Cebador AS 34G>C	ATCGGGTGGTGGTTGGAGFAC
SEQ ID NO: 18	Cebador AS 34G>A	CAGACTGGTGGTGGTTGGAGFAA
SEQ ID NO: 19	Cebador AS 34G>A	AGACTGGTGGTGGTTGGAGCDA
SEQ ID NO: 20	Cebador AS 34G>A	AGACTGGTGGTGGTTGGAGFAA
SEQ ID NO: 21	Cebador AS 35G>T	AACTGGTGGTGGTTGGAGCAAT
SEQ ID NO: 22	Cebador AS 35G>T	AACTGGTGGTGGTTGGAGCATT
SEQ ID NO: 23	Cebador AS 35G>T	AACTGGTGGTGGTTGGAGEAAT
SEQ ID NO: 24	Común de exón 2	GAATATGGGTAAGATGATCCGACAA
SEQ ID NO: 25	Común de exón 2	GTAAGATGATCCGACAAGTGAGAGA
SEQ ID NO: 26	Común de exón 2	GAATATGGGTAAGATGATCCGACAAGT
SEQ ID NO: 27	Sonda de exón 2	JCACTGAECAATCCAGCTAATCCAGAACCACP
SEQ ID NO: 28	Sonda de exón 2	JCACTGAECAATCCAGCTAATCCAGAACCACP
SEQ ID NO: 29	Sonda de exón 2	JGTGGTTECTGGATTAGCTGGATTGTCAGTGP
Clave:	Cebador AS: cebador específico de alelo, Común: cebador común, E=N4-Metil-dC, M=N6-Metil-dA, D=N6-terciario-butil-benzil-dA, F=N4-terciario-butil-benzil-dC, J=HEX, Q=BHQ-2, P=Fosfato	

La mezcla de PCR convencional incluyó nucleósido trifosfatos (incluyendo dUTP), ADN polimerasa, 0,1 μ M de cada uno de los cebadores selectivos, cebador común 0,1-0,7 μ M, una sonda de detección, ADN diana (9900 copias de línea celular K562 de tipo silvestre con 100 copias de plásmido mutante, o 10.000 copias de ADN de línea celular de tipo silvestre o 10.000 copias de plásmido del exón 2 o 3 de tipo silvestre de NRAS), y uracil-N-glucosilasa. Se realizó amplificación y análisis usando el instrumento Roche LightCycle[®] 480 (Roche Applied Science, Indianápolis, Ind.) Se usó el siguiente perfil de temperatura: 2 ciclos de 95 °C (10 segundos) a 62 °C (30 segundos) seguido de ciclación de 93 °C (10 segundos) a 62 °C (30 segundos) 55 veces. Se recogieron datos de fluorescencia al comienzo de cada etapa de 62 °C en el programa de 55 ciclos.

Los resultados se muestran en la Figura 1. Se muestra la amplificación del ADN genómico de tipo silvestre mediante líneas discontinuas; se muestra la amplificación del plásmido que contiene la secuencia de tipo silvestre mediante líneas continuas en negrita y se muestra la amplificación del ADN mutante (secuencia diana) por líneas continuas estrechas. Los resultados demuestran que cuando se empareja un cebador específico de mutación corriente arriba con uno de los cebadores cadena abajo seleccionados de entre SEQ ID NO: 24-26, se detectó la amplificación de avance de la secuencia no diana (de tipo silvestre). Véase Figura 1A (línea discontinua). Cuando se emparejó el mismo cebador específico de mutación con un cebador cadena abajo diferente, seleccionado de entre SEQ ID NO: 1-5, se suprimió la amplificación de avance de la secuencia no diana (tipo silvestre), véase Figura 1B. Notablemente, la amplificación de la secuencia no diana presente en un plásmido no está afectada y no está suprimida (línea continua en negrita).

Ejemplo 2

Supresión de amplificación de avance mediante un oligonucleótido supresor adicional

En este ejemplo, se observó supresión de la amplificación de avance en una AS-PCR que se dirige a mutaciones en el codón 61 del gen NRAS humano. Los cebadores y sondas usados en el Ejemplo 2 se muestran en la Tabla 3. Un cebador cadena arriba seleccionado de entre SEQ ID NO: 30-47 coincide con una de las mutaciones 183A>T, 183A>C, 181C>A, 182A>T, 182A>C, 182A>G correspondiente a los cambios de aminoácidos Q61Ha, Q61Hb, Q61K, Q61L, Q61P y Q61R en el gen NRAS humano y está desapareado con la secuencia de tipo silvestre. Un cebador cadena abajo seleccionado de entre SEQ ID NO: 48-50 y sonda de detección seleccionada de entre SEQ ID NO: 51-53 son habituales entre las secuencias mutantes y de tipo silvestre en el exón 3 del gen NRAS. Los oligonucleótidos supresores seleccionados de entre SEQ ID NO: 1-5 no hibridan con ninguno de los amplicones definidos por los pares de cebadores usados en este ejemplo.

Tabla 3

Cebadores y sondas para el exón 3 del gen NRAS usado en el Ejemplo 2		
SEQ ID NO:	Función	Secuencia 5'-3'
SEQ ID NO: 30	Cebador AS 183A>T	GGATATACTGGATACAGCTGGACDT
SEQ ID NO: 31	Cebador AS 183A>T	GGACATACTGGATACAGCTGGACTT
SEQ ID NO: 32	Cebador AS 183A>T	GGACATACTGGATACAGCTGGAGAT
SEQ ID NO: 33	Cebador AS 183A>C	ACATACTGGATACAGCTGGACTC
SEQ ID NO: 34	Cebador AS 183A>C	ATACTGGATACAGCTGGACTC
SEQ ID NO: 35	Cebador AS 183A>C	ATACTGGATACAGCTGGATAC
SEQ ID NO: 36	Cebador AS 181C>A	TGGATATACTGGATACAGCTGIAA
SEQ ID NO: 37	Cebador AS 181C>A	GACATACTGGATACAGCTGGAA
SEQ ID NO: 38	Cebador AS 181C>A	TGGATATACTGGATACAGCTGGMA
SEQ ID NO: 39	Cebador AS 182A>T	GAGATACTGGATACAGCTGGAFT
SEQ ID NO: 40	Cebador AS 182A>T	GACATACTGGATACAGCTGTACT
SEQ ID NO: 41	Cebador AS 182A>T	GACATACTGGATACAGCTGAACT
SEQ ID NO: 42	Cebador AS 182A>C	GACGTA CTGGATACAGCTGG AFC
SEQ ID NO: 43	Cebador AS 182A>C	CGTACTGGATACAGCTGG AFC
SEQ ID NO: 44	Cebador AS 182A>C	GACATACTGGATACAGCTGAACC
SEQ ID NO: 45	Cebador AS 182A>G	GACATACTGGATACAGCTGGTEG
SEQ ID NO: 46	Cebador AS 182A>G	ACGTA CTGGATACAGCTGG AFG
SEQ ID NO: 47	Cebador AS 182A>G	GACACA CTGGATACAGCTGG AFG
SEQ ID NO: 48	Común de exón 3	AGAGAAAATAATGCTCCTAGTACCTGTAG
SEQ ID NO: 49	Común de exón 3	TCCTTTCAGAGAAAATAATGCTCCTAGT
SEQ ID NO: 50	Común de exón 3	GTTAATATCCGCAAATGACTTGCTATTATT
SEQ ID NO: 51	Sonda de exón 3	JCTGTCCETCATGTATTGGTCTCTCATGGCACTGP
SEQ ID NO: 52	Sonda de exón 3	JCTCATGETATTGGTCTCTCATGGCACTGTACP
SEQ ID NO: 53	Sonda de exón 3	JCTTCGCECTGTCCTCATGTATTGGTCTCTCP
Clave:	Cebador AS: cebador específico de alelo, Común: cebador común, E=N4-Metil-dC, M=N6-Metil-dA, D=N6-terciario-butil-benzil-dA, F=N4-terciario-butil-benzil-dC, I=Inosina, J=FAM, Q=BHQ-2, P=Fosfato	

En este ejemplo, se usaron las mismas condiciones de reacción que en el Ejemplo 1, excepto que además del cebador cadena abajo y corriente arriba, se añadió uno de los oligonucleótidos supresores seleccionados de entre SEQ ID NO: 1-5 a la reacción a 0,1 o 0,7 μ M.

Los resultados se muestran en la Figura 2. Se muestra la amplificación del ADN genómico de tipo silvestre por líneas discontinuas y se muestra la amplificación del ADN mutante (secuencia diana) por líneas continuas estrechas. Los resultados demuestran que cuando se usa el par de cebadores compuesto de un cebador común y un cebador específico de mutación Q61, se detectó amplificación de avance de las secuencias no diana. Véase Figura 2A (líneas discontinuas). Cuando el oligonucleótido supresor también estaba presente en la mezcla de reacción a 0,1 μ M, no se suprimió la amplificación de avance de las secuencias no diana, véase Figura 2B. Pero cuando el oligonucleótido supresor estaba presente en la mezcla de reacción a 0,7 μ M, se suprimió la amplificación de avance de la secuencia no diana, véase Figura 2C. En este ejemplo, todos los cebadores están presentes a 0,1 μ M mientras que el oligonucleótido supresor estaba presente a 0,1 μ M o 0,7 μ M.

Ejemplo 3

Supresión de amplificación de avance del molde no relacionado PI3KCA mediante un oligonucleótido supresor

5 En este ejemplo, se observó supresión de la amplificación de avance en una AS-PCR que se dirige a mutaciones en codón 1049 del gen *PI3KCA* humano. Los cebadores y sondas usados en el Ejemplo 3 se muestran en la Tabla 4. Un cebador cadena arriba seleccionado de entre SEQ ID NO: 54-56 coincide con la mutación 3145G>C correspondiente al cambio de aminoácido G1049R en el gen *PI3KCA* humano y está desapareado con la secuencia de tipo silvestre. Un cebador cadena abajo seleccionado de entre SEQ ID NO: 57-59 y una sonda seleccionada de entre SEQ ID NO: 60 y 96 y 61 y 97 son comunes entre las secuencias mutantes y de tipo silvestre. Los oligonucleótidos supresores seleccionados de entre SEQ ID NO: 1-5 (específicos para el gen *NRAS* humano) no hibridan con los amplicones de *PI3KCA* usados en este ejemplo.

Tabla 4

<i>Cebadores y sondas para el gen PI3KCA usado en el Ejemplo 3</i>		
Función	Función	Secuencia 5'-3'
SEQ ID NO: 54	Cebador AS 3145G>C	CATGAAACAAATGAATGATGCACATCCTC
SEQ ID NO: 55	Cebador AS 3145G>C	CATGAAACAAATGAATGATGCACATCGTC
SEQ ID NO: 56	Cebador AS 3145G>C	CATGAAACAAATGAATGATGCACATTATC
SEQ ID NO: 57	Común 3145	CAATGCATGCTGTTTAATTGTGTGGA
SEQ ID NO: 58	Común 3145	TTCAGTTCAATGCATGCTGTTTAATTGTG
SEQ ID NO: 59	Común 3145	GTGGAATCCAGAGTGAGCTTTCAT
SEQ ID NO: 60 y 96	Sonda 3145	JTGGCTGGACAAQCAAAAATGGATTGGATCP
SEQ ID NO: 61 y 97	Sonda 3145	JATGGATTGGAQTCTTCCACACAATTAACAGCATGP
Clave:	Cebador AS: cebador específico de alelo, Común: cebador común, J=JA270, Q= BHQ-2, P=fosfato	

15 En este ejemplo, se usaron las mismas condiciones de reacción que en el Ejemplo 1, excepto que además del cebador cadena arriba y cadena abajo, se añadió uno de los oligonucleótidos supresores seleccionados de entre SEQ ID NO: 1-5 a la reacción a 1,0 μ M.

20 Los resultados se muestran en la Figura 3. Se muestra la amplificación del ADN genómico de tipo silvestre mediante líneas discontinuas; y se muestra la amplificación del ADN mutante (secuencia diana) mediante líneas continuas estrechas. Los resultados demuestran que cuando se usó el par de cebadores compuesto de un cebador específico de G1049R y un cebador común, se detectó amplificación de avance de la secuencia no diana (tipo silvestre). Véase Figura 3A (líneas discontinuas). Cuando el oligonucleótido supresor seleccionado de entre SEQ ID NO: 1-5 también estaba presente en la mezcla de reacción, se suprimió la amplificación de avance de la secuencia no diana (tipo silvestre), sin ningún impacto sobre la amplificación específica de la secuencia diana (G1049R mutante) (líneas continuas). Véase Figura 3B. El mismo oligonucleótido supresor seleccionado de entre SEQ ID NO: 1-5 también se añadió a PCR específica de alelo diseñada para detectar mutaciones de *PI3KCA* 1258T>C, 1635G>T, 1634A>G y 1633G>A. Se observó la misma tendencia: ningún impacto sobre la amplificación específica de la secuencia diana (mutante) y supresión de la amplificación de avance de la secuencia no diana (tipo silvestre) (datos no mostrados).

Ejemplo 4

Supresión de amplificación de avance del molde no relacionado BRAF mediante un oligonucleótido supresor

35 En este ejemplo, se observó supresión parcial de amplificación de avance en una AS-PCR que se dirigía a mutaciones en los codones 469 y 600 del gen *BRAF* humano. Los cebadores y sondas usados en el Ejemplo 4 se muestran en la Tabla 5. Para mutaciones en el codón 469, el cebador cadena arriba se seleccionó de entre SEQ ID NO: 62-70. Estos cebadores se emparejan con diversas mutaciones en el codón 469 en el exón 11. Para mutaciones en el codón 600, el cebador cadena arriba se seleccionó de entre SEQ ID NO: 75-86. Estos cebadores coinciden con diversas mutaciones en el codón 600 en el exón 15. Para las mutaciones del codón 469, el cebador cadena abajo común se seleccionó de entre SEQ ID NO: 71-72, y la sonda se seleccionó de entre SEQ ID NO: 73 y 98 y 74 y 99. Para las mutaciones del codón 600, se seleccionó el cebador cadena abajo de entre SEQ ID NO: 87-89, y la sonda se seleccionó de entre SEQ ID NO: 90-92. Los oligonucleótidos supresores seleccionados de entre SEQ ID NO: 1-5 (específicos para el gen *NRAS* humano) no hibridan con los amplicones de *BRAF* definidos por cualquiera de los pares de cebadores en este ejemplo.

Tabla 5

Cebadores y sondas para el gen <i>BRAF</i> usado en el Ejemplo 4.		
SEQ ID NO:	Función	Secuencia 5'-3'
SEQ ID NO: 62	Cebador AS 1406G>C	AAAGAATTGGATCTGGATCATTAGC
SEQ ID NO: 63	Cebador AS 1406G>C	AAAGAATTGGATCTGGATCATTCGC
SEQ ID NO: 64	Cebador AS 1406G>C	AAAGAATTGGATCTGGATCATGTGC
SEQ ID NO: 65	Cebador AS 1405G>A	AAAGAATTGGATCTGGATCATATA
SEQ ID NO: 66	Cebador AS 1405G>A	ACAAAGAATTGGATCTGGATCATTAA
SEQ ID NO: 67	Cebador AS 1406G>T	AGTGGGACAAAGAATTGGATCAGT
SEQ ID NO: 68	Cebador AS 1406G>T	AGTGGGACAAAGAATTGGATCTAT
SEQ ID NO: 69	Cebador AS 1406G>A	ACAAAGAATTGGATCTGGATCATTAA
SEQ ID NO: 70	Cebador AS 1406G>A	GACAAAGAATTGGATCTGGATCATTAA
SEQ ID NO: 71	Común de exón 11	GCGAACAGTGAATATTTCTTTGATG
SEQ ID NO: 72	Común de exón 11	GACTTGTCACAATGTCACCACATTACATA
SEQ ID NO: 73 y 98	Sonda de exón 11	EAGTCTACAAGQGGAAAGTGGCATGGTAAP
SEQ ID NO: 74 y 99	Sonda de exón 11	ETGGCATGGTAQAGTATGTAATGTGGTGACATTP
SEQ ID NO: 75	Cebador AS 1798_1799GT>AA, 1798_1799GT>AG, 1798G>A	AGTAAGAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACFA
SEQ ID NO: 76	Cebador AS 1798_1799GT>AA, 1798_1799GT>AG, 1798G>A	AGTAAGAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTALAA
SEQ ID NO: 77	Cebador 1798_1799GT>AA, 1798_1799GT>AG, 1798G>A AS	AGTAAGAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTCLAA
SEQ ID NO: 78	Cebador AS 1798G>T	AGTAAGAATAGGTGATTTTGITCTAGCTACFT
SEQ ID NO: 79	Cebador AS 1798G>T	AGTAAGAATAGGTGATTTTGGTCTAICTACFT
SEQ ID NO: 80	Cebador AS 1798G>T	AGTAAGAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACFT
SEQ ID NO: 81	Cebador AS 1799T>G	AATGGGTGATTTTGGTCTAGCTFCTGG
SEQ ID NO: 82	Cebador AS 1799T>G	AATGGGTGATTTTGGTCTAGCTFTAIG
SEQ ID NO: 83	Cebador AS 1799T>G	AGTAGGTGATTTTGGTCTAGCTATFGG
SEQ ID NO: 84	Cebador AS 1799T>C	AATGGGTGATTTTGGTCTAGCTFTAIC
SEQ ID NO: 85	Cebador AS 1799T>C	AATGGGTGATTTTGGTCTAGCTALTIC
SEQ ID NO: 86	Cebador AS 1799T>C	AATGGGTGATTTTGGTCTAGCTALTGC
SEQ ID NO: 87	Común de exón 15	GTGGAAAAATAGCCTCAATTCTTACCA
SEQ ID NO: 88	Común de exón 15	TAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAA
SEQ ID NO: 89	Común de exón 15	CTAGTAACTCAGCAGCATCTCAG
SEQ ID NO: 90	Sonda de exón 15	ETGGATCQCAGACAAGTTCAAACTGATGGGP
SEQ ID NO: 91	Sonda de exón 15	ETCCCATQCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCAP
SEQ ID NO: 92	Sonda de exón 15	ETCTCGATGGAGTGGGTCCQP
CLAVE	Cebador AS: cebador específico de alelo, Común: cebador común, F=N6- terciario-butil-benzil-dA, L=N4-terciario-butil-benzil-dC, I=inosina, E=FAM, Q=BHQ-2, P= Fosfato	

En este ejemplo, se usaron las mismas condiciones de reacción que en el Ejemplo 3.

- 5 Los resultados se muestran en la Figura 4. Se muestra la amplificación del ADN genómico de tipo silvestre mediante líneas discontinuas y se muestra la amplificación de las dianas del codón de *BRAF* 469 y 600 mediante líneas continuas. Los resultados demuestran que cuando se usó el par de cebadores que consiste en un cebador coincidente con una de las mutaciones del codón 469 y un cebador común, se detectó amplificación de avance de la secuencia no diana (tipo silvestre), véase la Figura 4A (líneas discontinuas). Cuando también estaba presente un oligonucleótido supresor seleccionado de entre SEQ ID NO: 1-5 en la mezcla de reacción, se suprimió la amplificación de avance de la secuencia no diana (tipo silvestre) (líneas discontinuas), con ligero impacto sobre la amplificación específica de la secuencia mutante (líneas continuas). Véase Figura 4B. Cuando se usó el par de cebadores consistente en un cebador coincidente con una de las mutaciones de codón 600 y un cebador común, se detectó amplificación de avance de la secuencia no diana (tipo silvestre). Véase Figura 4C (líneas discontinuas).
- 10 Cuando también estaba presente un oligonucleótido supresor seleccionado de entre SEQ ID NO: 1-5 en la mezcla de reacción, se suprimió parcialmente la amplificación de avance de la secuencia no diana (tipo silvestre), véase
- 15

Figura 4D. La supresión incompleta de la amplificación no diana y ligero impacto sobre la amplificación diana observados con el sistema *BRAF* sugieren que el fenómeno de supresión puede depender de la secuencia.

Ejemplo 5

Supresión de amplificación de avance por reacciones de extensión de cebadores lineales.

En este ejemplo, se observó supresión de amplificación de avance del molde de *NRAS* en presencia del molde de M13 y una serie de cebadores específicos de M13. La AS-PCR se dirigió a mutaciones en los codones 12 y 61 del gen *NRAS* humano. Los cebadores M13 usados en el Ejemplo 5 se muestran en la Tabla 6. Para la diana de *NRAS*, el cebador cadena arriba se seleccionó de entre SEQ ID NO: 30-47. Estos cebadores coinciden con una de las mutaciones 183A>T, 183A>C, 181C>A, 182A>T, 182A>C, 182A>G correspondientes a los cambios de aminoácidos Q61Ha, Q61Hb, Q61K, Q61L, Q61P y Q61R en el gen de *NRAS* humano y están desapareados con la secuencia de tipo silvestre. El cebador cadena abajo seleccionado de entre SEQ ID NO: 48-50 y la sonda seleccionada de entre SEQ ID NO: 51-53 son comunes entre las secuencias mutantes y de tipo silvestre el gen *NRAS* humano. El cebador cadena arriba seleccionado de entre SEQ ID NO: 6-23, coincide con una de las mutaciones 35G>C, 34G>T, 35G>A, 34G>C, 34G>A y 35G>T en el exón 2 del gen *NRAS* humano y está desapareado con la secuencia de tipo silvestre. El cebador cadena abajo seleccionado de SEQ ID NO: 24-26 y la sonda de detección seleccionada de SEQ ID NO: 27-29 son comunes entre las secuencias mutantes y de tipo silvestre del exón 2 en el gen *NRAS* humano. La mezcla de reacción también contenía ADN circular monocatenario del bacteriófago M13 y tres cebadores (SEQ ID NO: 93-95, Tabla 6) orientados en la misma dirección para asegurar la amplificación lineal del molde viral.

Tabla 6

<i>Cebadores M13 usados en el Ejemplo 5</i>		
SEQ ID NO:	Función	Secuencia 5'-3'
SEQ ID NO: 93	Cebador M13	ACATGAAAGTATTAAGAGGCTGAGACTCCTCA
SEQ ID NO: 94	Cebador M13	GAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGC
SEQ ID NO: 95	Cebador M13	GGAACGAGGGTAGCAACGGCTACA

En este ejemplo, se usaron las mismas condiciones de reacción que en el Ejemplo 1, excepto que se añadió el molde de bacteriófago monocatenario M13 a 10.000 copias por reacción, y se añadieron cebadores, SEQ ID NO: 63-65, a concentraciones equimolares de 0,033 μ M cada una para una concentración total de 0,1 μ M.

Los resultados se muestran en la Figura 5. Se muestra la amplificación del ADN genómico de tipo silvestre por líneas discontinuas y se muestra la amplificación de las dianas mutantes de codón 12 o codón 61 de *NRAS* por líneas continuas. Los resultados demuestran que cuando se usó el par de cebadores consistente en un cebador específico de alelo que coincide con una de las mutaciones en el codón 61 y un cebador común, se detectó amplificación de avance de la secuencia de *NRAS* no diana (tipo silvestre). Véase Figura 5A (líneas discontinuas). Cuando también estaban presentes en la mezcla de reacción el ADN de M13 y los tres cebadores con capacidad de amplificación lineal del ADN del M13, se suprimió la amplificación de avance de la secuencia de *NRAS* no diana (tipo silvestre). Véase Figura 5B. Por comparación, cuando se usó el par de cebadores consistente en un cebador específico de alelo coincidente con una de las mutaciones en el codón 12 y un cebador común, se detectó amplificación de avance de la secuencia de *NRAS* no diana (tipo silvestre). Véase Figura 5C (líneas discontinuas). Esta amplificación de avance no se suprimió por el ADN de M13 y los tres cebadores con capacidad de amplificación lineal. Véase Figura 5D.

Ejemplo 6

Supresión de avance mediante oligonucleótidos supresores con diversos grados de homología con el genoma diana

En este ejemplo, se observó supresión de amplificación de avance con varios oligonucleótidos supresores en una AS-PCR que se dirigía a mutaciones en el codón 12 del gen *NRAS* humano. Se seleccionó un cebador cadena arriba de entre SEQ ID NO: 6-23, los cebadores coincidentes con una de las mutaciones de codón 12 (35G>C, 34G>T, 35G>A, 34G>C, 34G>A y 35G>T, correspondientes a los cambios de aminoácidos G12A, G12C, G12D, G12R, G12S y G12V) en el gen *NRAS* humano y desapareados con la secuencia de tipo silvestre. El cebador cadena arriba se emparejó con diferentes cebadores cadena abajo que actuaban como supresores de la amplificación de avance. Estos cebadores cadena abajo representados por SEQ ID NO: 1-5 y 24-26 tienen diversos grados de homología con el genoma diana que varían entre bajo, medio y alto como se determina de acuerdo con el método de la presente invención (véase Ejemplo 8 y Figura 8).

En este ejemplo, se usaron las mismas condiciones de reacción que en el Ejemplo 1. Los oligonucleótidos supresores con homología baja, media y alta se usaron a 0,1 μ M.

Los resultados se muestran en la Figura 6. Se muestra la amplificación del ADN genómico de tipo silvestre por líneas discontinuas; se muestra la amplificación de las dianas de codón 12 de *NRAS* por líneas continuas. Los resultados demuestran que el cebador cadena abajo con el mayor grado de homología con el genoma diana como se determina por el método de la presente invención (SEQ ID NO: 1), produjo el mayor nivel de supresión (véase Figura 6C), mientras que los cebadores cadena abajo con el grado medio de homología (SEQ ID NO: 2-5) produjeron un menor nivel de supresión, véase Figura 6B. Los cebadores cadena abajo con el menor grado de homología (SEQ ID NO: 24-26) no tuvieron ningún efecto en el avance de tipo silvestre y no mostraron supresión, véase Figura 6A. También vale la pena observar que los oligonucleótidos supresores (SEQ ID NO: 1-5) tuvieron diversos grados de supresión, pero no tuvieron impacto negativo en la amplificación específica como se mide por C_t .

Ejemplo 7

Selección de regiones de homología dentro de la región de interés

En este ejemplo, se seleccionó el gen *NRAS* humano como la región de interés para diseñar oligonucleótidos supresores. La región de 488 pares de bases del exón 2 del gen *NRAS* se usó como una secuencia de consulta para comparar con la secuencia de genoma humano en condiciones relajadas seleccionando la opción que encuentra "secuencias algo similares" usando el algoritmo "blastn". La Figura 7 muestra que la búsqueda reveló regiones de múltiples homologías en las partes definidas por los oligonucleótidos 180-270 y 360-450 de la secuencia de consulta. Estas regiones se seleccionaron como regiones de interés para diseño de oligonucleótidos supresores.

Ejemplo 8

Selección de oligonucleótidos supresores de la región de interés

En este ejemplo, se diseñaron varios oligonucleótidos de las regiones de interés y se sometieron a un análisis de BLAST® para determinar regiones de homología en el genoma humano que cumple los criterios expuestos por la presente invención. La Figura 8 muestra parámetros para cada oligonucleótido y la capacidad real de suprimir la amplificación de avance en las reacciones. Los parámetros incluyen la longitud del oligonucleótido en la columna "nMer". En la columna "Acertos Totales" está el número total de "Acertos de Blast" entre el oligonucleótido y el genoma diana que el programa Blastn fue capaz de encontrar. La rigurosidad del programa se ajustó a "secuencias algo similares". En la columna "Acertos con criterios", este es el número total de acertos que cumplen los criterios de 75 % de identidad y menos de dos desapareamientos en el extremo 3'. La columna "Grado de Homología" contiene un valor asignado de la siguiente manera: se dice que el grado de homología con el genoma diana es "bajo" cuando solamente hay un acierto que cumple los criterios expuestos por la presente invención. Se dice que el grado de homología es "medio" cuando hay diez o menos acertos que cumplen los criterios, y se dice que el grado de homología es "alto" cuando hay más de 10 acertos que cumplen los criterios. Finalmente, se observó que la columna de "avance" indica si hay o no amplificación de avance en presencia del oligonucleótido.

REIVINDICACIONES

1. Un método para diseñar un oligonucleótido supresor para su uso en una reacción de amplificación de ácido nucleico para reducir la amplificación no específica, comprendiendo el método
- 5
- (a) identificar una o más regiones de interés en el genoma de un organismo diana;
 - (b) para cada región de interés, realizar una búsqueda de la secuencia de genoma diana usando la región de interés como una consulta para identificar regiones de homología entre la región de interés y el genoma diana;
 - (c) seleccionar secciones de la región de interés que tienen las mayores regiones de homología en el genoma diana;
 - 10 (d) diseñar uno o más oligonucleótidos en las secciones seleccionadas en la etapa (c);
 - (e) realizar una búsqueda del genoma diana con los oligonucleótidos diseñados en la etapa (d) para identificar los oligonucleótidos con el número máximo de regiones de homología con el genoma diana que son de al menos 15 pares de longitud, tienen al menos 75 % de identidad con dicho número de regiones de homología y que abarcan el extremo 3' del oligonucleótido supresor mientras que no están presentes más de 2 desapareamientos a una distancia de 4 nucleótidos de la región 3' terminal del oligonucleótido y que no tienen regiones de complementariedad con la secuencia diana que se va a amplificar en la reacción de amplificación;
 - 15 (f) seleccionar el oligonucleótido identificado en la etapa (e) como el oligonucleótido supresor.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, que entre la etapa (e) y (f), comprende además una etapa de realizar una búsqueda del genoma diana con los oligonucleótidos diseñados en la etapa (d) para identificar y excluir oligonucleótidos que tienen al menos dos regiones de homología localizadas en las cadenas opuestas del genoma diana, teniendo dichas regiones de homología al menos 75 % de homología entre el oligonucleótido y la secuencia de genoma diana, en el que dichas regiones de homología están separadas por menos de aproximadamente 1000 pares de bases.
- 25 3. Un método para reducir la amplificación de un molde de ácido nucleico no diana en una reacción de amplificación de ácido nucleico de una secuencia diana en el genoma de un organismo diana que comprende realizar una reacción de amplificación usando un conjunto de cebadores que comprenden al menos un cebador específico de alelo específico para una variante de la secuencia diana en presencia de un oligonucleótido supresor, siendo el oligonucleótido supresor extensible por extensión de cebadores lineal, que no tiene regiones de complementariedad con la secuencia diana; y que tiene una secuencia que comprende al menos una región de homología con al menos 75 % de identidad con múltiples sitios en el genoma de un organismo diana, en el que dicha al menos una región de homología es de al menos 15 pares de bases de longitud, abarca el extremo 3' del oligonucleótido supresor, y no contiene más de 2 desapareamientos a una distancia de 4 nucleótidos del extremo 3'.
- 30 4. El método de la reivindicación 3, en el que el oligonucleótido supresor comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-5.
- 35 5. Un kit para realizar una reacción de amplificación de la secuencia diana en el genoma de un organismo diana con amplificación reducida de las secuencias no diana que comprende
- un conjunto de cebadores que comprende al menos un cebador específico de alelo específico para una variante de la secuencia diana; y
 - 45 - un oligonucleótido supresor que puede extenderse por extensión de cebador lineal, que no tiene regiones de complementariedad con la secuencia diana; y que tiene una secuencia que comprende al menos una región de homología con al menos 75 % de identidad con múltiples sitios en el genoma de un organismo diana, en el que dicha al menos una región de homología es de al menos 15 pares de bases de longitud, abarca el extremo 3' del oligonucleótido supresor y no contiene más de 2 desapareamientos a una distancia de 4 nucleótidos del extremo 3'.
 - 50
6. El kit de la reivindicación 5 que comprende además uno o más de los siguientes: al menos un cebador común, sondas, nucleósido trifosfatos, ácido nucleico polimerasa y tampones necesarios para la función de la polimerasa.
- 55 7. Una mezcla de reacción para realizar una reacción de amplificación de la secuencia diana en el genoma de un organismo diana con amplificación reducida de las secuencias no diana, que comprende:
- un conjunto de cebadores adecuado para amplificación de la secuencia diana que comprende al menos un cebador específico de alelo específico para una variante de la secuencia diana; y
 - 60 - un oligonucleótido supresor que puede extenderse por extensión de cebador lineal, que no tiene regiones de complementariedad con la secuencia diana; y que tiene una secuencia que comprende al menos una región de homología con al menos 75 % de identidad con múltiples sitios en el genoma de un organismo diana, en el que dicha al menos una región de homología es de al menos 15 pares de bases de longitud, abarca el extremo 3' del oligonucleótido supresor y no contiene más de 2 desapareamientos a una distancia de 4 nucleótidos del extremo 3'.
 - 65

8. La mezcla de reacción de la reivindicación 7 que comprende además uno o más de los siguientes: uno o más cebadores comunes correspondientes, una o más sondas, nucleósido trifosfatos, al menos una ácido nucleico polimerasa y tampones necesarios para la función de la polimerasa.
- 5 9. La mezcla de reacción de una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en la que el oligonucleótido supresor comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-5.

FIGURA 1A

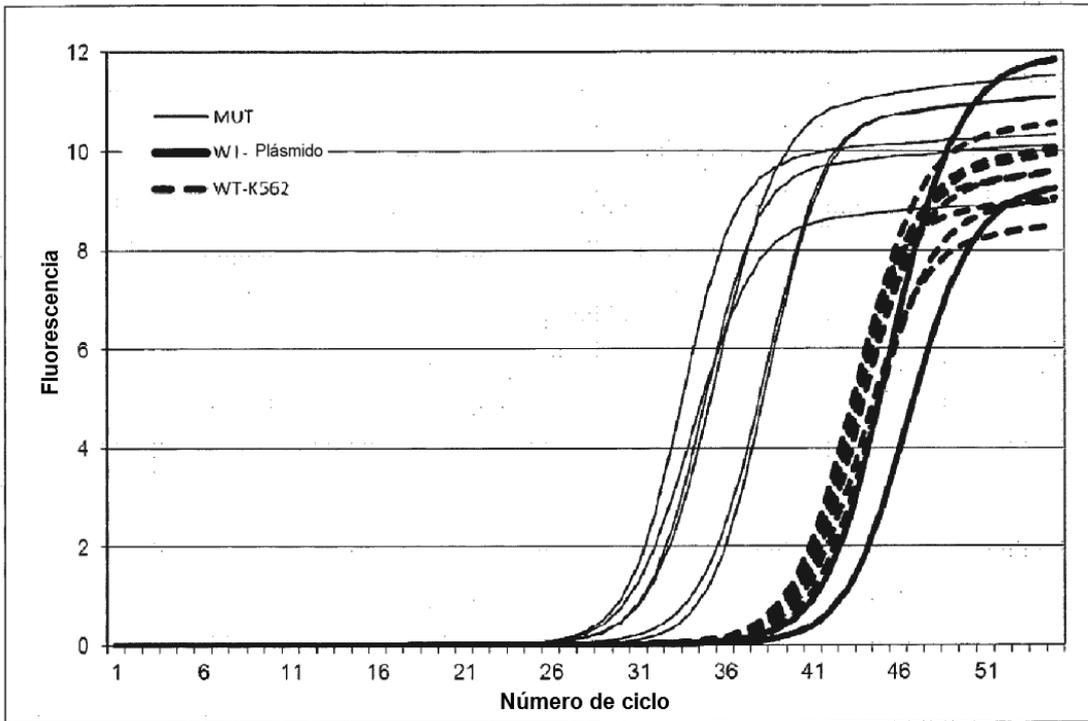


FIGURA 1B

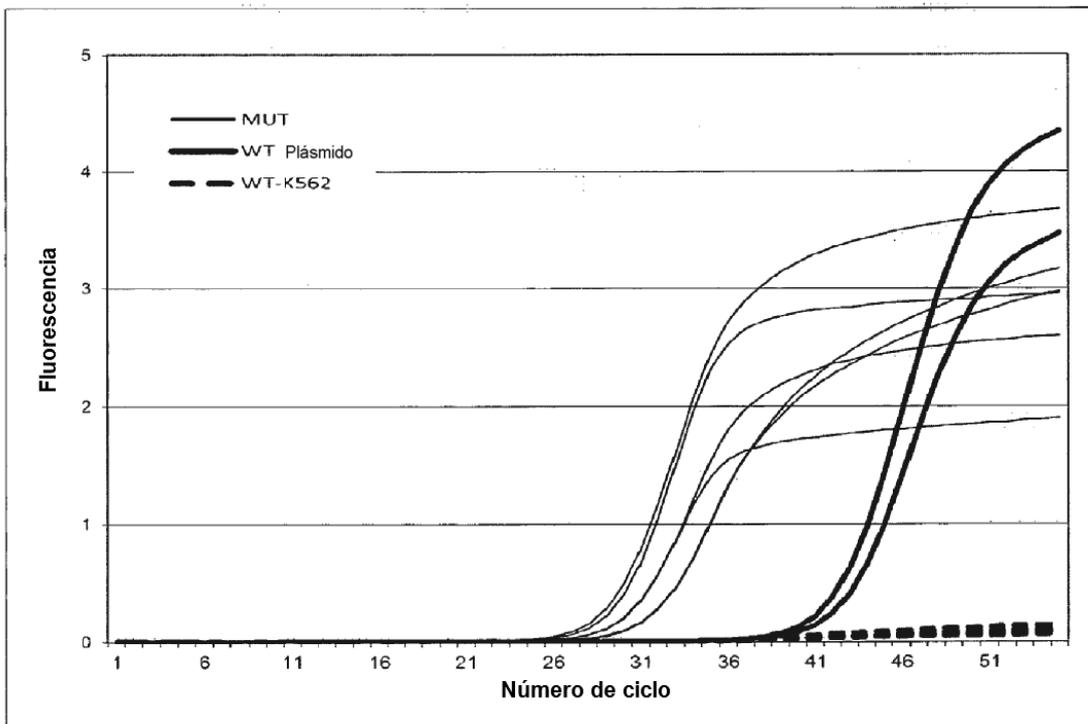


FIGURA 2A

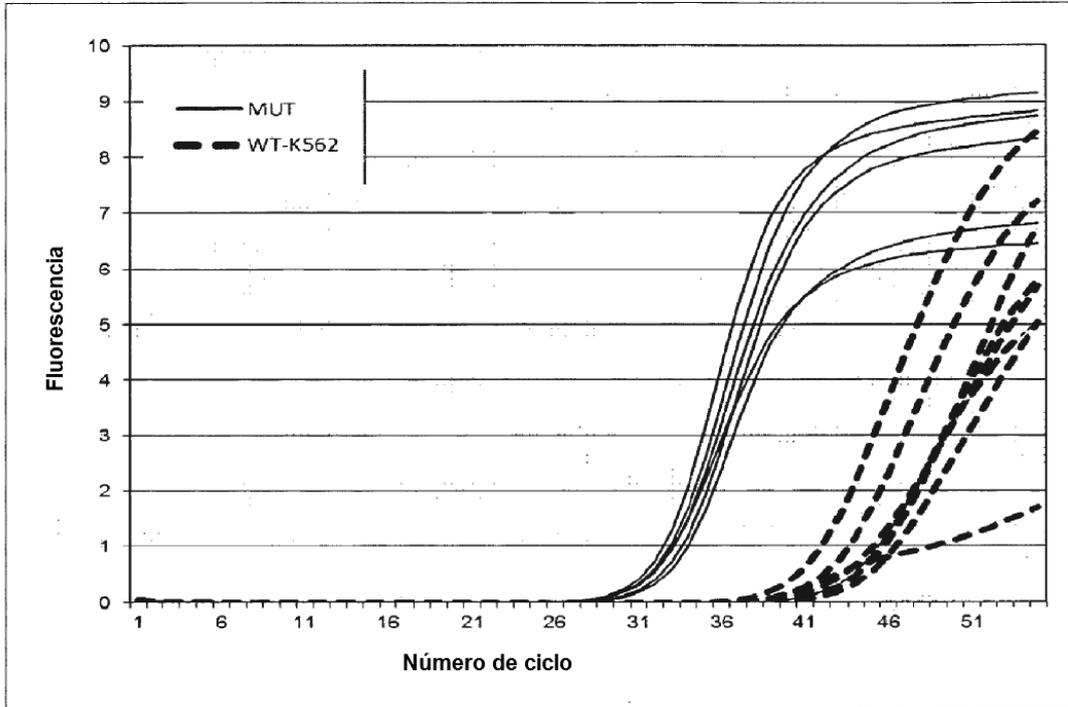


FIGURA 2B

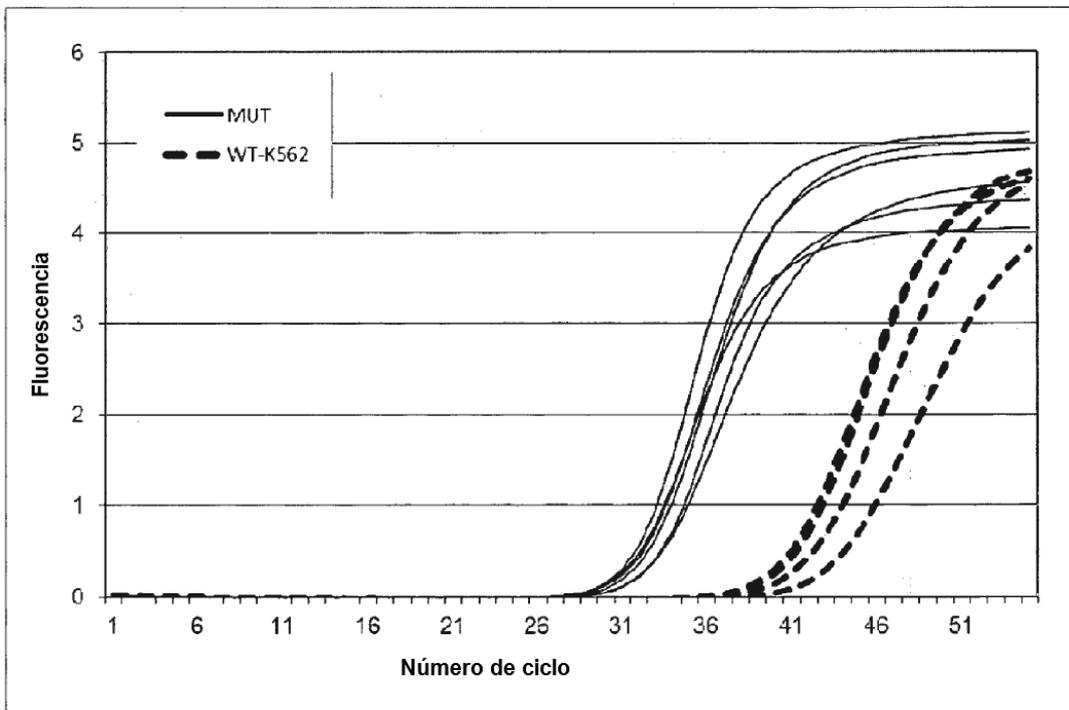


FIGURA 2C

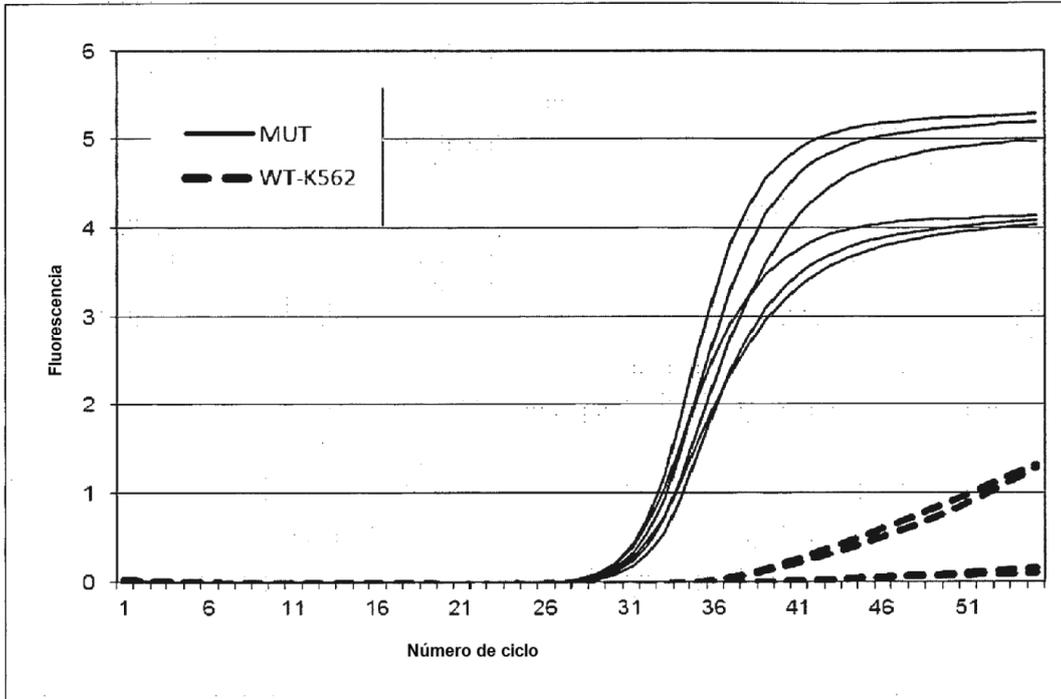


FIGURA 3A

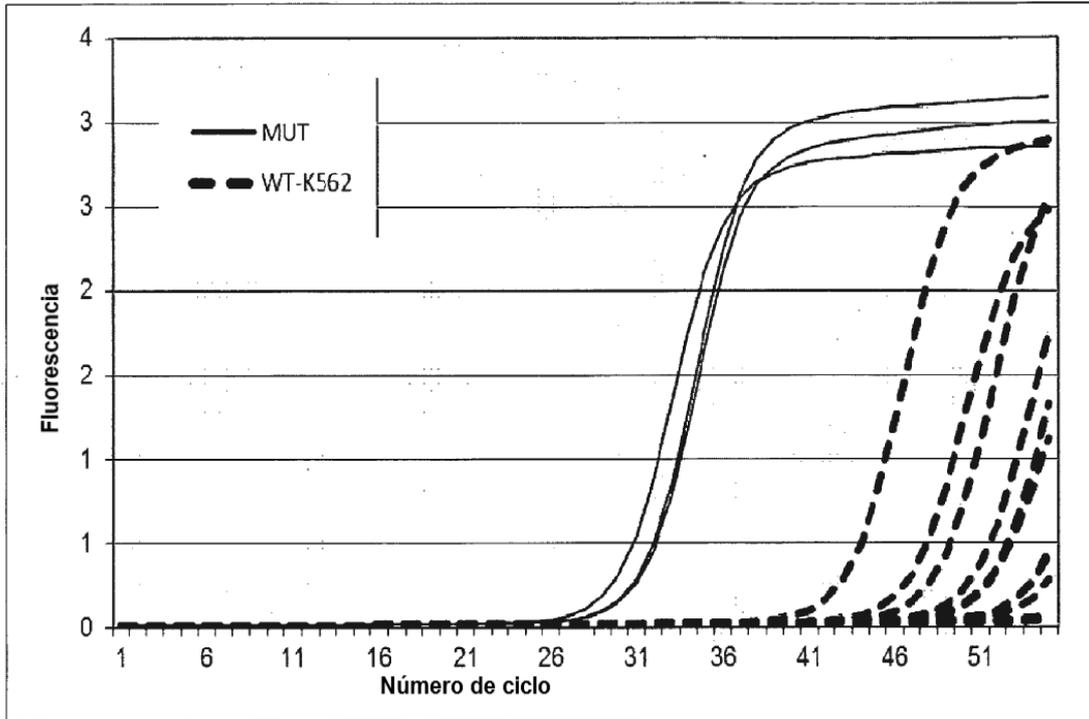


FIGURA 3B

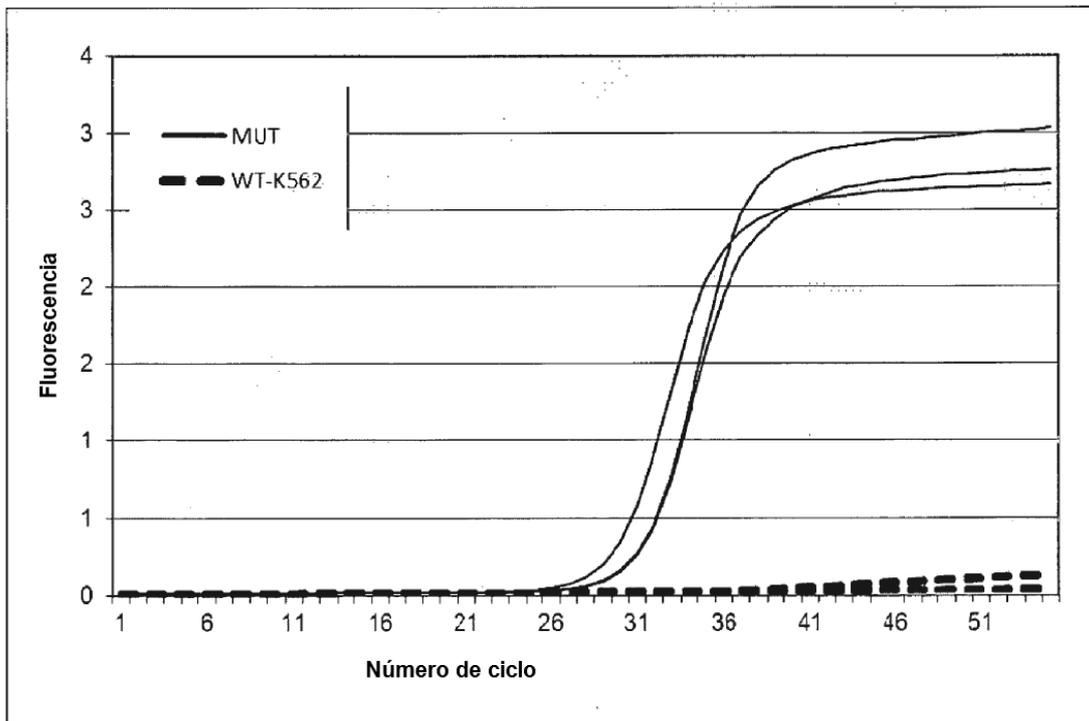


FIGURA 4A

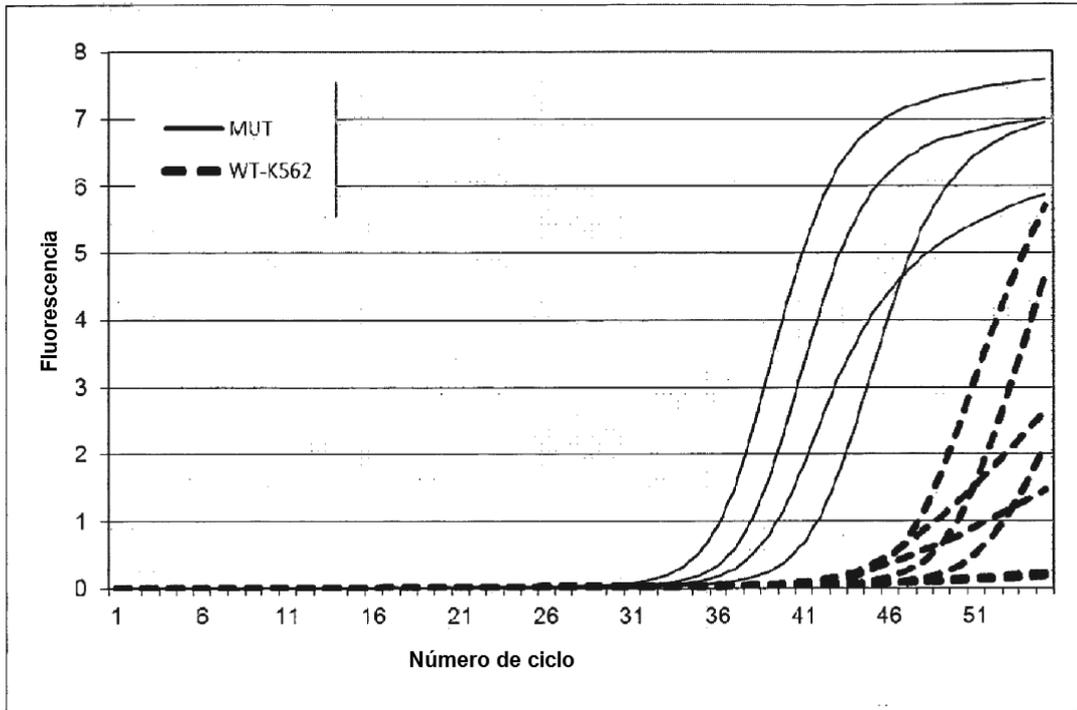


FIGURA 4B

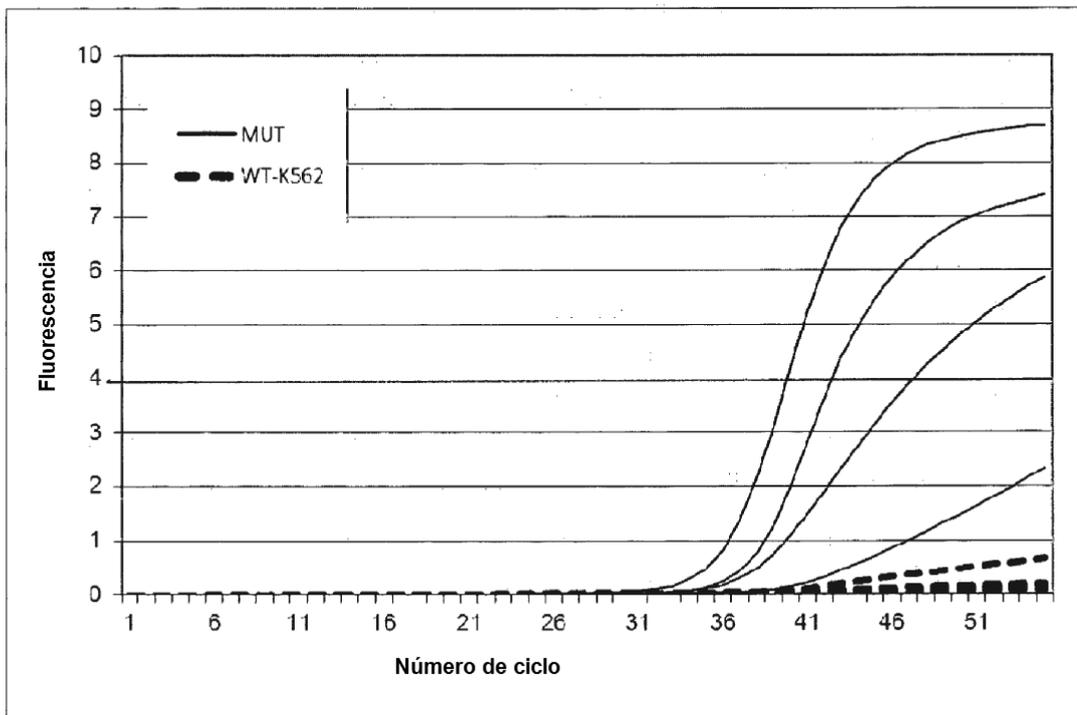


FIGURA 4C

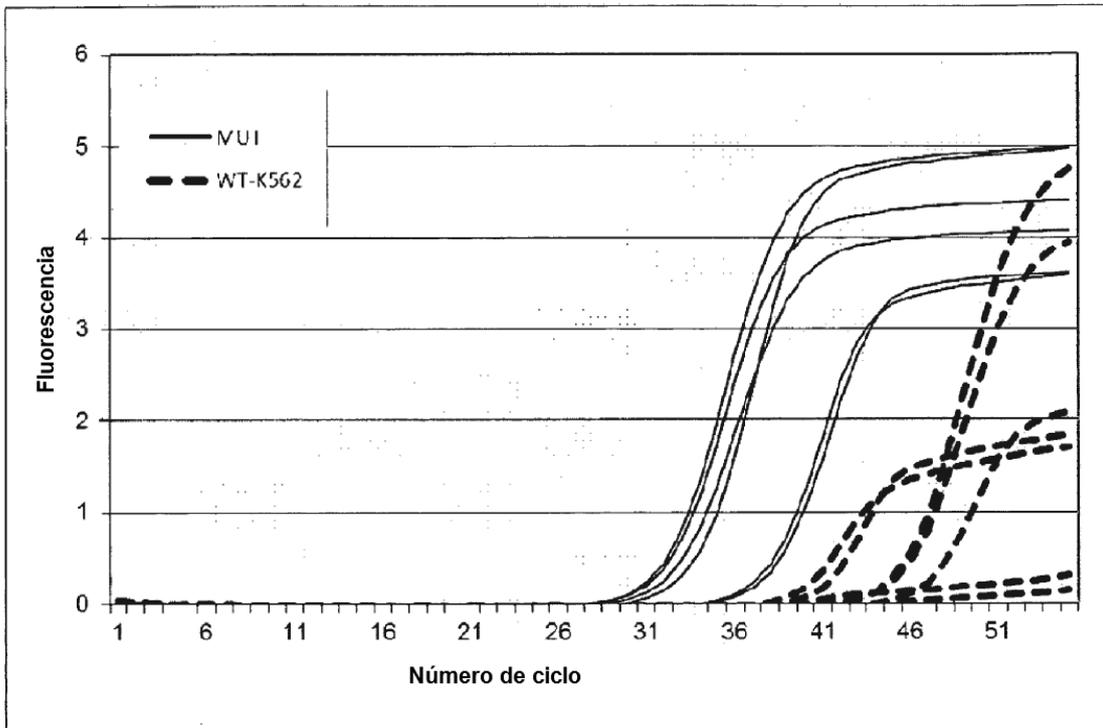


FIGURA 4D

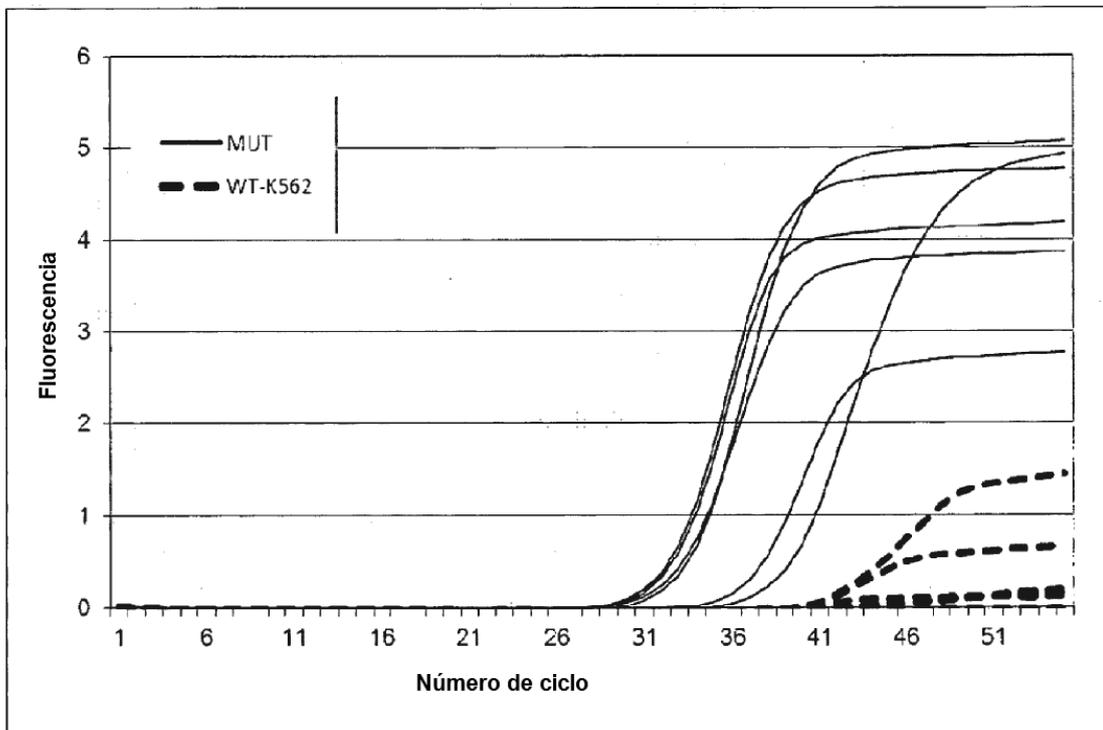


FIGURA 5A

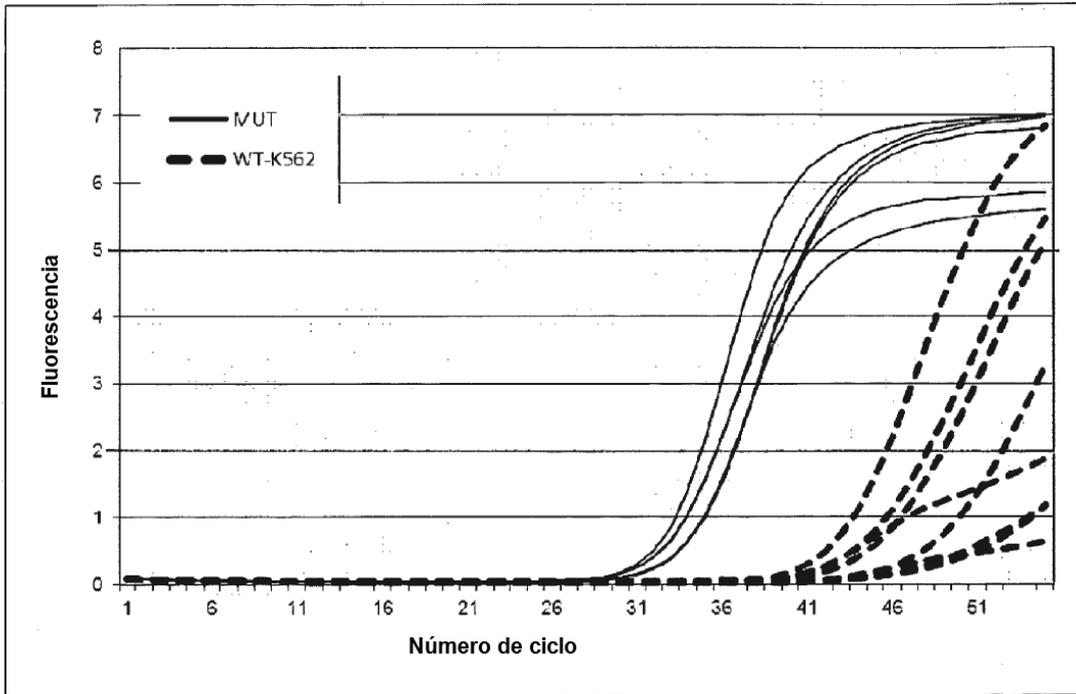


FIGURA 5B

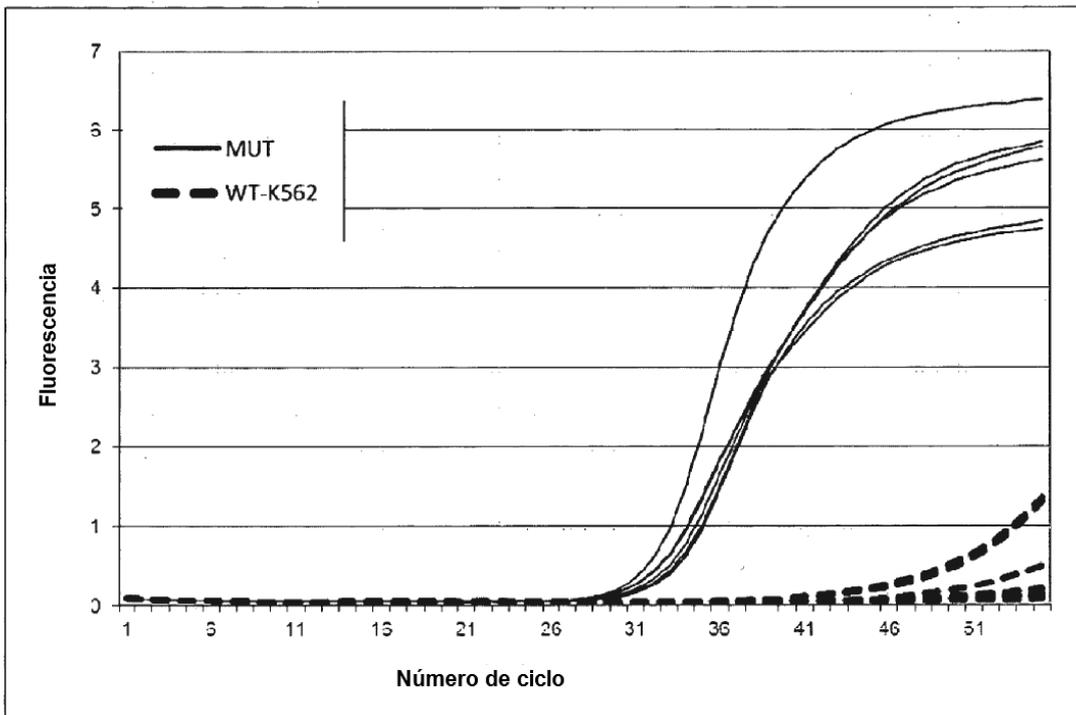


FIGURA 5C

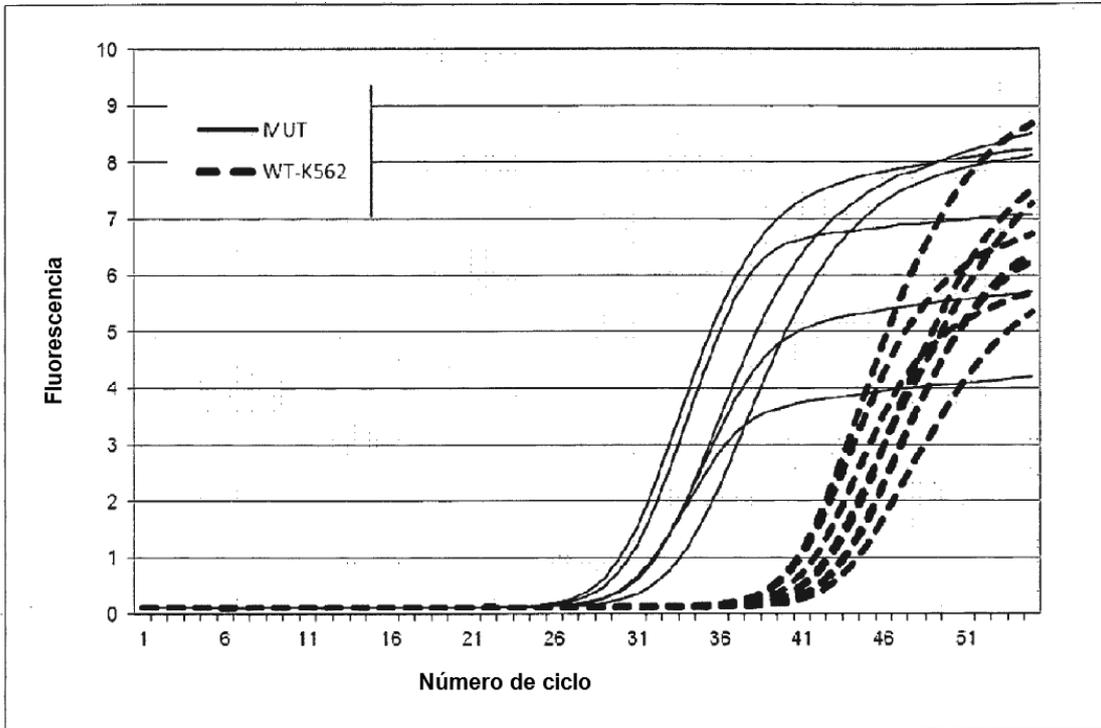


FIGURA 5D

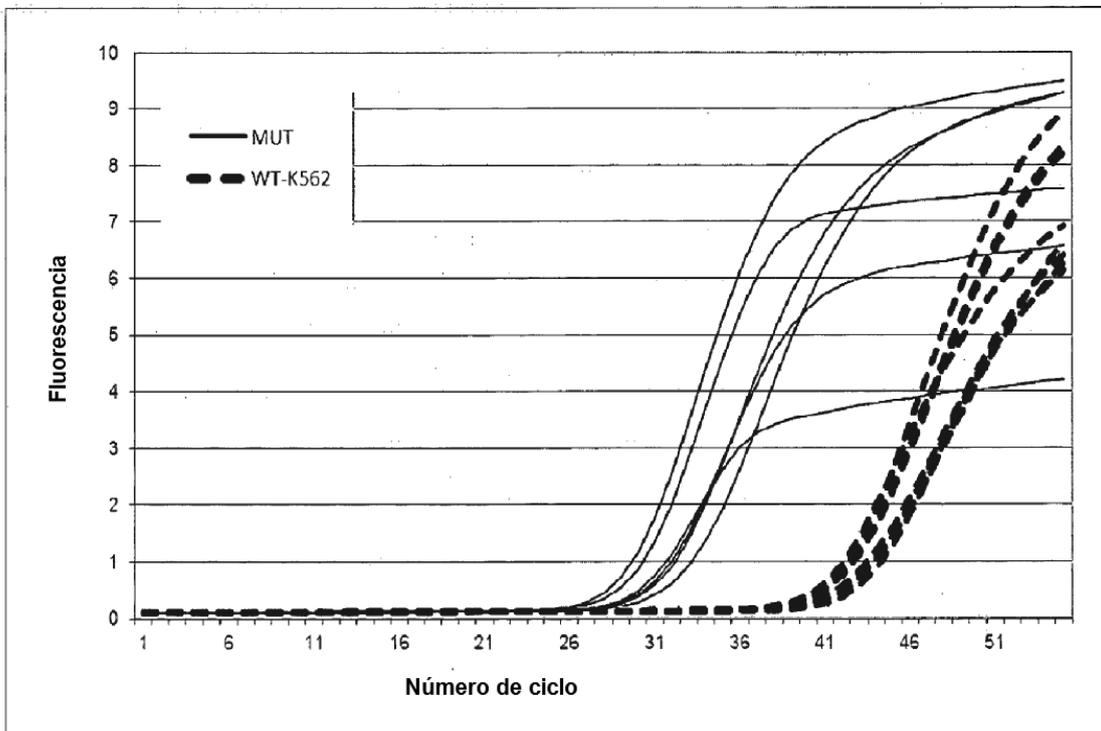


FIGURA 6A

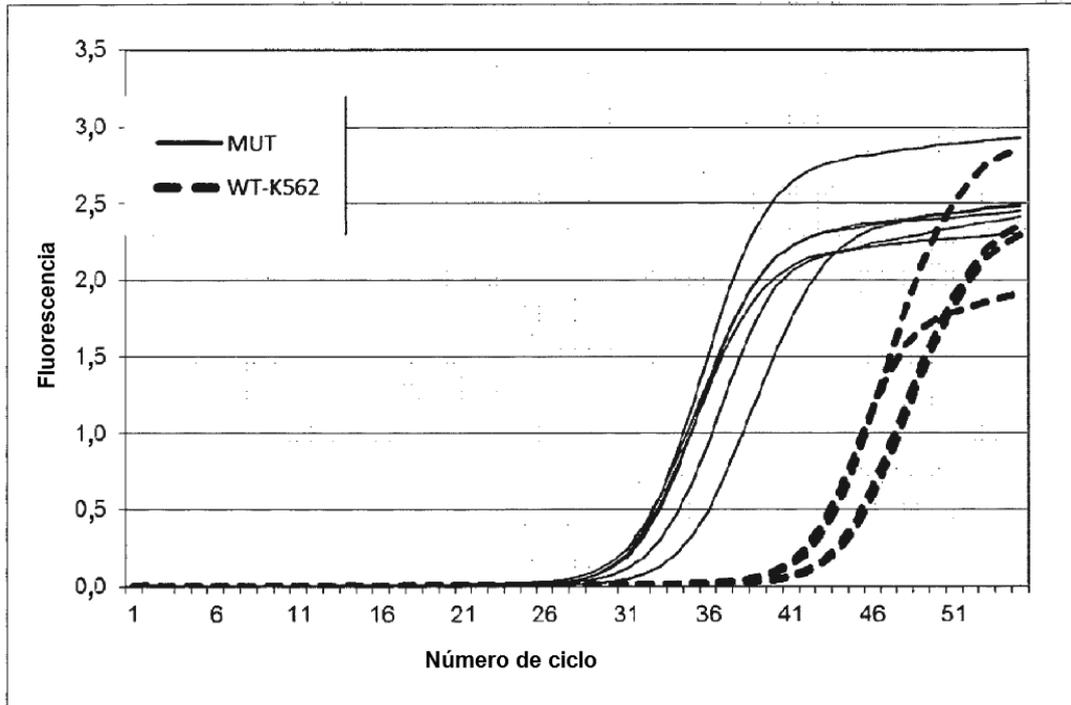


FIGURA 6B

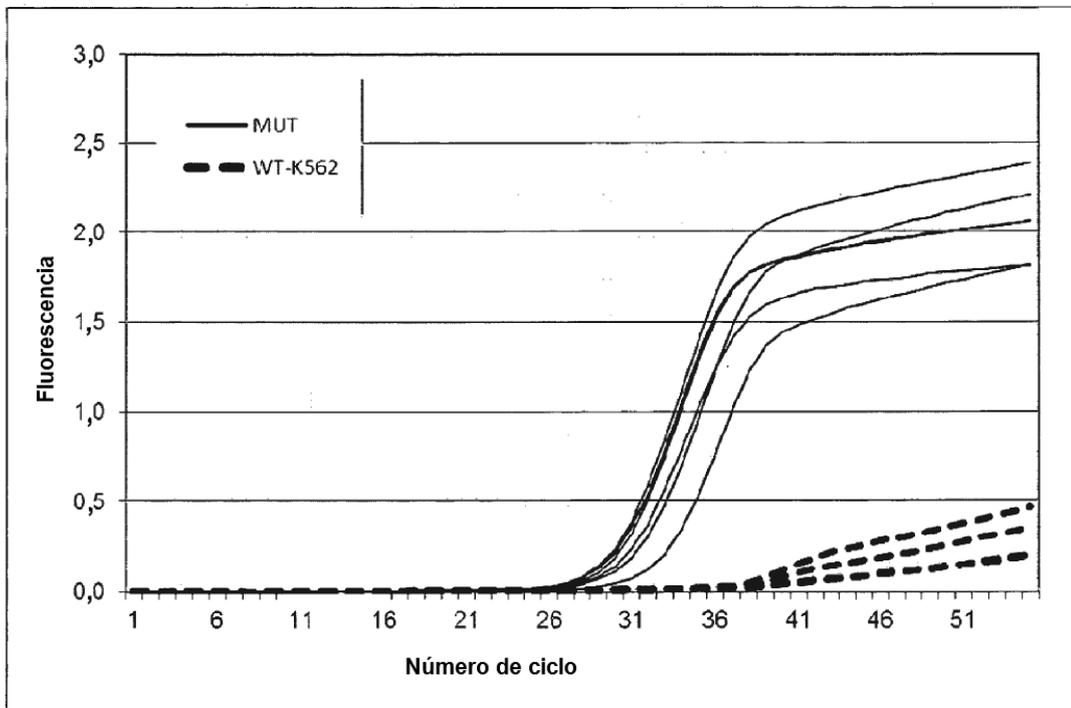


FIGURA 6C

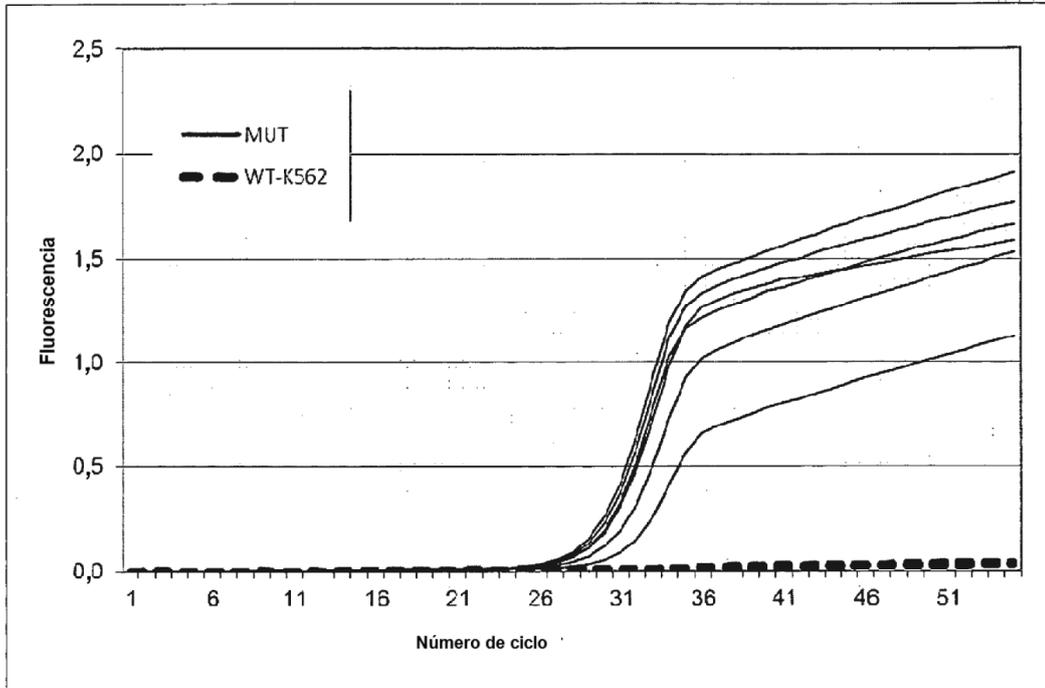


FIGURA 7

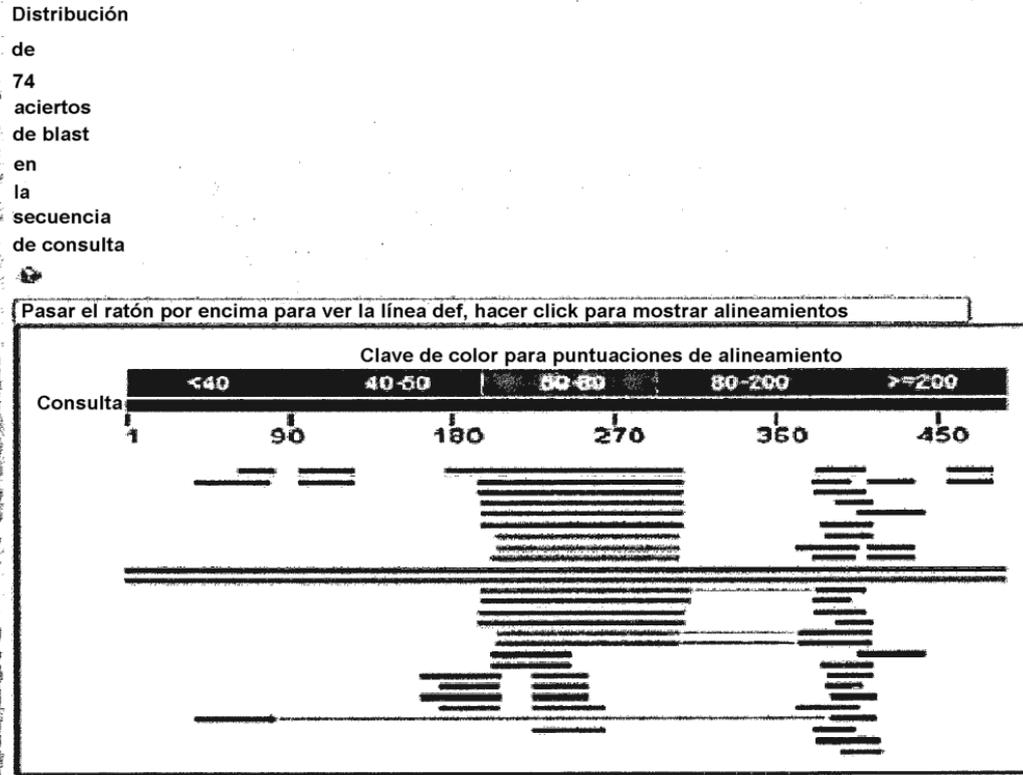


FIGURA 8

SEQ ID	Longitud	Aciertos totales	Aciertos con/ criterios	Grado de homología	Avance
SEQ ID NO: 1	19	3973	>20	Alto	No
SEQ ID NO: 2	20	1118	6	Medio	No
SEQ ID NO: 3	21	1939	3	Medio	No
SEQ ID NO: 4	20	426	6	Medio	No
SEQ ID NO: 5	24	1954	3	Medio	No
SEQ ID NO: 24	26	911	1	Bajo	Sí
SEQ ID NO: 25	26	328	1	Bajo	Sí
SEQ ID NO: 26	28	926	1	Bajo	Sí