

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 616**

51 Int. Cl.:

**C07H 21/00** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2009 PCT/CN2009/071026**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10108325**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2009 E 09842062 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2412718**

54 Título: **Cebador con conformación de bucle empleado en la amplificación de ácidos nucleicos y el uso del mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.04.2017**

73 Titular/es:

**XIAMEN AMOY DIAGNOSTICS CO., LTD (100.0%)  
5F Kechuang Building, No.289 Wengjiao Road,  
Haicang District, Xiamen  
Fujian 361000, CN**

72 Inventor/es:

**RUAN, LI;  
HE, DONGHUA;  
ZHENG, LIMOU y  
CHEN, YAN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 610 616 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**

Cebador con conformación de bucle empleado en la amplificación de ácidos nucleicos y el uso del mismo

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere al diseño y la aplicación de la amplificación de un ácido nucleico de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), más particularmente, a la aplicación para PCR en tiempo real, especialmente a la aplicación para la detección de mutaciones y mutaciones raras.

**Antecedentes de la invención**

10 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método de amplificación génica con un procedimiento simple, gran sensibilidad y excelente especificidad. Generalmente, el procedimiento está comprendido por 20-50 ciclos que tienen cada uno tres etapas: desnaturalización, renaturalización y extensión. El ácido nucleico buscado se puede amplificar hasta millones de veces de su concentración original en 1,5-3 h. En los últimos años, la amplificación por PCR en tiempo real ha hecho innecesaria la electroforesis en gel de los productos de PCR, así, la manipulación posterior de productos de PCR no es necesaria, y se evitan oportunidades de contaminación de la PCR. Debido a estas ventajas, la PCR en tiempo real se usa cada vez más. Originalmente, la PCR en tiempo real se usa con colorantes fluorescentes, tales como SYBR GREEN, EVE GREEN etc., para detectar el producto de PCR. Más recientemente, se aplican sondas de ácido nucleico con marcadores fluorescentes en la PCR en tiempo real, tales como una sonda Taqman, una baliza molecular, una sonda de transformación de energía de resonancia de fluorescencia, cebadores, sondas, etc. Scorpion usados en la tecnología de 5'-exonucleasas. Aunque la PCR basada en colorantes fluorescentes es simple, no puede identificar la amplificación no específica, especialmente la amplificación no específica provocada por dímeros de cebadores, de modo que hay muchas limitaciones en la aplicación. Una sonda proporciona una segunda etapa de identificación para los productos de amplificación, por lo tanto, se evita la amplificación no específica, de modo que su resultado es más fiable. Pero la sonda tiene desventajas tales como un diseño complejo y gran coste sintético, etc. Los inconvenientes de los dos métodos se basan en el hecho de que no pueden evitar la amplificación no específica.

25 Las mutaciones raras se refieren a alelos mutantes que están presentes a una concentración, o número de copias, relativamente baja en comparación con los alelos normales. Se refiere especialmente a genes con una mutación de una sola base. Generalmente, la relación de gen de mutación a gen silvestre es menor de 1/1.000, por ejemplo, un gen mutante embrionario vestigial contenido en la sangre de una mujer embarazada, o ADN mutante derivado de células tumorales contenido en sangre o tejido tumoral de un cáncer. La detección de estas mutaciones raras puede ser un reto para las tecnologías de detección de la técnica anterior.

35 La clave para una PCR satisfactoria aplicada a la detección de mutaciones es diseñar un par de cebadores con gran precisión y complementariedad hacia ADN o ARN del gen diana. El sistema de mutación refractario a la amplificación, ARMS, se inventó en 1989, también se denomina PCR específica de un alelo (AS-PCR) o PCR con cebadores específicos de secuencias (PCR-SSP). Tiene el uso más amplio de cualquier método de detección de mutaciones. La idea básica es diseñar dos cebadores de ARMS directos, que tienen un cebador inverso común para formar un sistema de PCR. La base específica del gen alélico se establece en el extremo 3' del cebador, esto se debe a que la ADN polimerasa de Taq no tiene actividad correctora de exonucleasa 3'-5', en la PCR, la base específica en el extremo 3' de los cebadores se combina con los sitios de un gen alélico silvestre o de mutación; si la base esta desapareada, la reacción de extensión de ADN fallará debido a la incapacidad para formar el enlace fosfodiéster 3'-5'. Sin embargo, la base del extremo 3' de cebadores de ARMS tiene una capacidad limitada para diferenciar entre desapareamientos diferentes, así, tienen una capacidad limitada para diferenciar entre algunas mutaciones.

45 Métodos, composiciones, mezclas de reacción y estuches para una amplificación selectiva de múltiples copias de una secuencia de ácido nucleico específica o secuencia diana, que puede estar presente bien sola o bien como un componente de una mezcla homogénea o heterogénea de ácidos nucleicos, se conocen del documento US 2007/0281317 A1.

50 El documento WO 00/79009 A2 divulga una composición para cuantificar o detectar una o más moléculas de ácido nucleico diana en una muestra, en donde la composición comprende uno o más oligonucleótidos marcados detectablemente y una o más moléculas de ácido nucleico diana que se han de detectar o cuantificar. Los oligonucleótidos comprenden uno o más marcadores detectables situados internamente y/o en o cerca de los extremos 3' y 5' de los oligonucleótidos y en donde el marcador sufre un cambio detectable en una propiedad observable al entrar a formar parte de una molécula de doble hebra .

55 El documento WO 2004/061134 A1 se refiere a un método para detectar polimorfismos de un solo nucleótido en un organismo a través de un ensayo modificado de mutación refractaria a la amplificación que utiliza un par con

conformación de horquilla que discrimina entre diferentes alelos al situar su nucleótido 3' en la posición de un polimorfismo de un solo nucleótido.

### Sumario de la invención

5 La invención se refiere a un nuevo cebador para la amplificación de un ácido nucleico. El cebador de la invención tiene un concepto de diseño diferente en comparación con cebadores anteriores. Al incorporar nuevas características de diseño, la especificidad del cebador se mejora notablemente. El cebador de la invención tiene gran especificidad y diseño simple, no forma dímeros del cebador y es adecuado para cuantificar niveles de expresión génica y detectar SNP y mutaciones raras.

10 Los cebadores de la invención comprenden cebadores de un tipo, a saber cebadores de amplificación dobles con conformación de bucle, que se pueden usar especialmente en un sistema de detección de mutaciones, especialmente para un sistema de detección de mutaciones raras.

15 Los cebadores de amplificación dobles con conformación de bucle de la invención proporcionan una secuencia de etiquetaje universal dentro del cebador, la secuencia de etiquetaje y el cebador con conformación de bucle se introducen en un sistema de amplificación por PCR en una cierta concentración (generalmente, la secuencia de etiquetaje es más de 10 veces la de los cebadores con conformación de bucle), en los dos primeros ciclos de PCR, el cebador con conformación de bucle reconoce la secuencia diana de mutación con gran especificidad y produce una amplificación más temprana, a partir del tercer ciclo, debido a la mayor cantidad del cebador marcador, los productos de PCR de las fases más tempranas se amplificarán mucho y rápidamente mediante el cebador de etiquetaje, manteniendo así gran especificidad y sensibilidad para una secuencia diana de una mutación rara.

20 Por lo tanto, los cebadores con conformación de bucle de la invención se pueden usar para detectar el ácido nucleico diana en PCR en tiempo real.

25 El nucleótido del cebador de la invención puede ser ADN, ARN, LNA o PNA o un nucleótido no natural.

La invención también se refiere a la aplicación del cebador con conformación de bucle.

30 La invención proporciona un nuevo cebador para la detección por PCR y la detección por PCR en tiempo real de la mutación génica, especialmente para una mutación rara. El cebador es un oligonucleótido, y el extremo 5' y el extremo 3' tienen 3-20 bases complementarias, en ciertas condiciones pueden formar una doble hebra para dotar al cebador de una estructura con conformación de bucle, y el interior del cebador tiene una secuencia de etiquetaje universal, la base de reconocimiento se puede establecer en la primera base del extremo 3' o dentro del cebador. En ciertas condiciones, el extremo 3' forma una doble hebra intramolecular, y el interior del cebador forma una estructura con conformación de bucle; cuando el cebador reconoce y se hibrida a la secuencia diana, la estructura de doble hebra intramolecular se abre y la estructura con conformación de bucle se pierde, y la doble hebra del cebador se transforma para ser la doble hebra combinada con la secuencia diana, adquiriendo así la capacidad de extensión de ADN. La secuencia marcadora y el cebador con conformación de bucle se introducen en un sistema de amplificación por PCR en una concentración apropiada (generalmente, la secuencia de etiquetaje es más de 10 veces la de los cebadores con conformación de bucle), en los dos primeros ciclos de PCR, el cebador con conformación de bucle reconoce la secuencia diana de mutación con gran especificidad y produce una amplificación más temprana, a partir del tercer ciclo, debido a la mayor cantidad del cebador de etiquetaje, los productos de PCR de las fases más tempranas se amplificarán mucho y rápidamente mediante el cebador de etiquetaje, manteniendo así gran especificidad y sensibilidad para una secuencia diana de una mutación rara. Si no hay una secuencia diana presente, el cebador puede formar una estructura con conformación de bucle en la etapa de renaturalización; puesto que el extremo 3' se forma como una estructura de doble hebra intramolecular, el extremo 3' no puede iniciar la extensión de ADN, así, no se producirá amplificación no específica (especialmente dímeros del cebador). La base de reconocimiento para la secuencia de mutación se puede establecer en el extremo 3' del cebador según la especialidad de la secuencia diana. La especialidad del cebador se puede ajustar mediante la longitud de la doble hebra en el extremo 3' del propio cebador, cuando la secuencia diana tenga una o más bases desapareadas con el cebador, la estructura con conformación de bucle de la primera no se puede abrir, la estructura de doble hebra en el extremo 3' del cebador existirá, y esto detiene la capacidad de extensión del extremo 3', así, no empezará la amplificación. Referencia a la FIG 1a y FIG 1b.

55 Estructura del cebador con conformación de bucle

Los cebadores con conformación de bucle de la invención comprenden un diseño, a saber un cebador de amplificación doble con conformación de bucle, para detectar una mutación rara con gran especificidad.

60 Cebador de amplificación doble con conformación de bucle. El cebador es un solo oligonucleótido, y el extremo 5' y el extremo 3' tienen 3-20 bases complementarias, en condiciones apropiadas pueden formar una doble hebra para

dotar al cebador de una estructura con conformación de bucle, y el interior del cebador tiene una secuencia de etiquetaje universal, la base distintiva se puede establecer en la primera base del extremo 3' o en el interior del cebador. En condiciones apropiadas, el extremo 3' puede formar una doble hebra intramolecular, y el interior del cebador forma una estructura con conformación de bucle; cuando el cebador reconoce y se hibrida a la secuencia diana, la estructura de doble hebra se pierde, y el cebador forma una doble hebra con la secuencia diana, adquiriendo así la capacidad de extensión de ADN. La secuencia de etiquetaje y el cebador con conformación de bucle se introducen en un sistema de amplificación por PCR en una cierta concentración (generalmente, el cebador de etiquetaje es más de 10 veces con respecto a los cebadores con conformación de bucle), en los dos primeros ciclos de PCR, el cebador con conformación de bucle reconoce la secuencia diana de mutación con gran especificidad y produce una amplificación más temprana, a partir del tercer ciclo, debido a la mayor cantidad del cebador de etiquetaje, los productos de PCR de las fases más tempranas se amplificarán mucho y rápidamente mediante el cebador de etiquetaje, manteniendo así gran especificidad y sensibilidad para la secuencia diana de mutación. Si no hay secuencia diana presente, el cebador puede formar una estructura con conformación de bucle en la etapa de renaturalización, el extremo 3' puede formar una doble hebra para detener la capacidad de extensión de ADN por el extremo 3', así no se producirá la amplificación no específica (especialmente dímeros del cebador). El sitio de reconocimiento para la secuencia de mutación se puede establecer en el extremo 3' o dentro del cebador según la especialidad de la secuencia diana. La especificidad del cebador se puede ajustar mediante la longitud de la doble hebra en el extremo 3' del propio cebador, si la secuencia diana tiene uno o más desapareamientos de bases con el cebador, la estructura con conformación de bucle de la primera no se puede abrir, la estructura de doble hebra en el extremo 3' del cebador todavía se formará y detendrá la capacidad de extensión del extremo 3', así, no empezará la amplificación. Referencia a la FIG 1a y FIG 1b.

En referencia a la FIG. 1a, según los defectos de una mutación rara que se detectan en la técnica anterior, la presente invención proporciona un método para detectar la mutación rara. Según la FIG. 1a, el sistema de la invención comprende tres cebadores, un cebador directo de doble amplificación F, un cebador inverso de doble amplificación R y un cebador de etiquetaje universal T. En una realización preferida, el cebador directo F tiene cuatro dominios funcionales diferentes 11, 12, 13 y 14, en donde el dominio 11 se denomina dominio de reconocimiento de la diana, el dominio 12 se denomina dominio de reconocimiento de mutación, el dominio de reconocimiento de mutación se puede establecer en el extremo 3' o lejos del extremo 3' según los tipos de la mutación rara, el dominio 13 se denomina secuencia de etiquetaje y el dominio 14 se denomina secuencia complementaria. En una realización preferida, el cebador antirecto R comprende tres dominios funcionales 13, 15 y 16, en donde el dominio 13 se denomina secuencia marcadora que tiene la misma secuencia que el dominio 13 del cebador directo, el dominio 15 se denomina dominio de combinación con la diana y el dominio 16 se denomina secuencia complementaria. En una realización preferida, el cebador universal T se ajusta al dominio 13 del cebador directo F y el cebador inverso R.

La FIG. 1b muestra el procedimiento de amplificación buscada de la mutación rara por los cebadores de la invención. La amplificación comprende tres fases, en la primera fase, la secuencia diana contiene la mutación rara en un sistema con cebador directo F y cebador inverso R, a una temperatura de renaturalización alta, preferiblemente, la mejor temperatura de renaturalización es 60-66°C. El cebador universal T tiene un valor de la  $T_m$  inferior a la temperatura, de modo que no se puede ajustar a la secuencia diana, mientras que el cebador directo F y cebador inverso R se pueden ajustar a la secuencia diana 21 y 22 con gran especificidad, y extenderse para obtener la secuencia 23 y 24, la secuencia 23 se ajusta al cebador inverso R a una temperatura de renaturalización para extenderse para obtener la secuencia 25, y así alcanzar la acumulación de la secuencia de la mutación rara. Debido a la temperatura de renaturalización alta, el cebador tiene una eficacia combinatoria inferior a la secuencia diana, así la acumulación en la fase no puede obtener una acumulación exponencial con gran eficacia.

En la segunda fase se usa el cebador universal T, el extremo 3' de la secuencia 25 de la mutación rara acumulado en la primera fase tiene una secuencia complementaria al cebador universal T, a una temperatura de renaturalización inferior, preferiblemente, la temperatura de renaturalización es 54-58°C, a esta temperatura de renaturalización el cebador universal T se puede combinar con la secuencia 25 de la mutación rara con gran eficacia, y extenderse para obtener la secuencia 26 que contiene mutación rara, tanto la secuencia 25 como la 26 se pueden ajustar al cebador universal T, así se pueden amplificar exponencialmente, y obtener una gran cantidad de secuencia 27 que contiene mutación rara, por lo tanto se consigue la amplificación de la secuencia de la mutación rara.

El método de diseño de los cebadores con conformación de bucle

Valor de la  $T_m$  del dominio combinado con la secuencia diana: El valor de la  $T_m$  del dominio combinado con la secuencia diana del cebador se puede mantener en un valor de la  $T_m$  de un cebador general, esto se puede determinar según el contenido de GC de la secuencia diana, comúnmente, el valor de la  $T_m$  puede ser 55-65°C. La temperatura de renaturalización en la amplificación puede tener el mismo valor de la  $T_m$  o 3-5°C inferior que el valor de la  $T_m$  del cebador.

Valor de la  $T_m$  del dominio del interior de la doble hebra: generalmente, las bases complementarias del cebador son 3-20 pb, el valor de la  $T_m$  tiene el mismo valor que el cebador de amplificación o 2-5°C superior que la temperatura

de renaturalización. Según los resultados de las realizaciones preferidas de la invención, si el cebador con conformación de bucle se usa para detectar una mutación de una sola base mediante PCR en tiempo real, el valor de la T<sub>m</sub> puede ser 3-5°C superior que la temperatura de renaturalización. Según el cebador para detectar una mutación rara, el valor de la T<sub>m</sub> del dominio de doble hebra puede ser 5-12°C superior que la temperatura de renaturalización.

El sitio de la base de reconocimiento de la mutación: según la mutación puntual general, el sitio de reconocimiento se puede establecer en la primera base del extremo 3' del cebador; según la mutación por eliminación y la inserción, el sitio de reconocimiento puede ser varias bases contiguas en el extremo 3' o cerca del extremo 3'; según la condición que pueda haber, las otras mutaciones similares cerca de la posición de mutación del gen diana, la base de reconocimiento de la mutación se puede establecer dentro del cebador, en lugar de la primera base del extremo 3'.

La longitud del cebador: generalmente, la longitud total del cebador es 20-80 pb, el dominio de combinación diana es 16-40 pb, el dominio complementario interno, es decir el dominio de doble hebra, el extremo 5' y el extremo 3' es 3-20 pb, respectivamente, el dominio con conformación de bucle es 5-60 pb, la secuencia marcadora universal es 16-30 pb.

El ácido nucleico no natural: cualquier ácido nucleico no natural, p. ej., LNA, PNA se puede usar en cualquier sitio del cebador.

La mejor estructura detectora del cebador con conformación de bucle: el cebador con conformación de bucle se puede usar para detectar por amplificación en PCR en tiempo real. Los amplificadores para la PCR en tiempo real del cebador con conformación de bucle comprenden: 7300, 7500, 7700 de Applied Biosystems (ABI), IQ Cycler de Bio-Rad, LightCycler2.0, LightCycler480 de Roche, Rotor-Gene 3000, 6000 de Corbett Research, MX3000P, MX3005P de Stratagene etc.

#### Ventajas del cebador con conformación de bucle

Diseño simple: El extremo 3' del cebador es una parte de la secuencia diana, hay varias bases en el extremo 5' complementario al extremo 3', la secuencia marcadora se puede añadir o no añadir al interior del cebador, la base de reconocimiento de mutación se puede establecer en la primera base del extremo 3' o dentro del cebador, solo el valor de la T<sub>m</sub> de la doble hebra del cebador tiene la misma temperatura o superior que la temperatura de renaturalización en el sistema de PCR. Mediante la enseñanza de la invención, cualquier experto en la técnica puede diseñar el cebador.

Sin dímeros del cebador: antes de que la temperatura de predesnaturalización de PCR alcance la temperatura de desnaturalización, debido a que la doble hebra del propio cebador finalizaba la capacidad de extensión de ADN; en los últimos ciclos de PCR, en condiciones de mantenimiento de una cierta temperatura de renaturalización, el cebador que no se puede combinar con la secuencia diana formará una doble hebra intramolecular, y no se combinará con otro cebador, así no se producirán dímeros del cebador.

Gran especificidad: debido a que el cebador tiene una estructura de doble hebra complementaria inversa por sí mismo, solo cuando la fuerza de combinación de la secuencia diana combinada con el dominio de combinación diana del cebador es más fuerte que la energía de combinación de la doble hebra complementaria inversa, el cebador se puede hibridar con la secuencia diana, la estructura con conformación de bucle se puede abrir y el cebador puede obtener capacidad de extensión de ADN. Si existen bases en la secuencia diana que no se ajusten al cebador, p. ej. una sola base desapareada, si la posición de desapareamiento está en el extremo 3' o dentro del cebador, el cebador mantendrá la estructura con conformación de bucle en primer lugar, y a continuación se finaliza la capacidad de extensión de ADN del cebador. Además, debido a que existe una estructura complementaria inversa en sí misma, la longitud del dominio complementario se puede ajustar para ajustar la especificación del cebador en el diseño. Para una mutación rara, por ejemplo, una mutación somática en un fondo de mayor cantidad de ADN silvestre, el cebador mantiene la especificación, excepto que la secuencia complementaria compite con la especificación de secuencia del extremo 3'.

Gran sensibilidad: el cebador de amplificación doble con conformación de bucle comprende una secuencia de etiquetaje universal, de modo que la secuencia diana se pueda amplificar durante dos fases. El ADN de la mutación tiene menor contenido en la plantilla, y el cebador está en un fondo en mayor cantidad de tipo silvestre, así la amplificación de la mutación tiene menor eficacia, sin embargo, si se amplifica una copia, la secuencia diana será rápidamente amplificada por el cebador de etiquetaje con gran contenido en el sistema.

Adecuado para un sistema de PCR múltiple: debido a que el cebador puede mantener una gran especificidad por sí mismo y no producirá dímeros del cebador, y tiene secuencia de etiquetaje, después de dos ciclos de amplificación inicial, todo el producto de amplificación será amplificado por la misma secuencia marcadora, se evita así el problema de la diferente eficacia de amplificación de los cebadores y el problema de que los cebadores se vean

afectados entre ellos, de modo que el cebador de la invención es muy adecuado para un sistema de PCR múltiple, y se adapta a un sistema de detección para la expresión de múltiples genes.

5 Adecuado para la amplificación precisa para una sola mutación de una región de acumulación de mutaciones: la región génica que puede producir una mutación por la que están interesados los investigadores a menudo producía densamente mutaciones que no tenían relación con la investigación, pero las mutaciones eran muy similares a las mutaciones por las que están interesados los investigadores; en la técnica anterior, el establecimiento de la base especificada en el extremo 3' en ARMS provocaba fácilmente reacciones cruzadas, mientras que el cebador con conformación de bucle puede establecer la base especificada dentro del cebador y contener más dominio de la  
10 secuencia diana, asegurando así una amplificación precisa. Esto se muestra en la FIG. 2.

Síntesis simples: No se necesita ninguna máquina especial, se pueden usar para la síntesis amplificadores de ADN generales.

15 Campo de aplicación amplio: se puede usar para amplificar plantillas difíciles con gran contenido de AT y gran contenido de GC, y detectará mutaciones puntuales, mutaciones por eliminación o mutaciones por inserción.

### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1a muestra la estructura de un cebador de amplificación doble con conformación de bucle;

20 La FIG. 1b muestra el principio de reacción en la detección por PCR de un cebador de amplificación doble con conformación de bucle.

La FIG. 2 muestra la amplificación precisa para una sola mutación rara de una región de agrupación de mutaciones mediante un cebador de amplificación doble con conformación de bucle en la realización 1.

### Realización preferida de la invención

#### Realización 1

25 Cebador de amplificación doble con conformación de bucle usado en la amplificación precisa para una sola mutación rara de una región de agrupación de mutaciones del codón 12 de K-ras

30 El gen K-ras tiene importantes funciones en el crecimiento y la diferenciación celulares, existen aproximadamente 70% de cánceres relacionados con la mutación de los codones 12, 13, la otra mutación del codón se produce en el sitio 59 y 61. Cada base de las tres bases en el codón 12 o 13 puede ser una mutación, generalmente, la mutación se produce en las bases primera o segunda, puede mutar para ser las otras tres bases excepto ella misma, o las bases tanto primera como segunda pueden estar mutadas. Por ejemplo, la primera base del codón 12 está mutada en A, es decir GGT>IGT (Cosmic ID:480,) esta mutación es una mutación de punto caliente relacionada con la resistencia farmacológica al Erbitux, un fármaco para tratar el cáncer de colon; aunque mutaban las bases tanto primera como segunda, p. ej. GGT>IGC (Cosmic ID:513), GGT>TTT (Cosmic ID:512), GGT>TAT (Cosmic ID:25081), estas tres mutaciones son una mutación común, y no es seguro que estén relacionadas con la resistencia farmacológica al Erbitux. Los cebadores de ARMS comunes detectan fácilmente estas mutaciones como GGT>IGT por error.

40 Según la secuencia silvestre y de mutación GGT>IGT (Cosmic ID:480) del codón 12 publicada por Cosmic, se diseñan un par de cebadores de amplificación dobles con conformación de bucle y una sonda, que son K-ras-M1-F, K-ras-M1-R, K-ras-P, respectivamente. Según el gen silvestre de HGH publicado por Cosmic, se diseñan un par de cebadores de amplificación dobles con conformación de bucle y una sonda como HGH-F, HGH-R, HGH-P, respectivamente.

45 El método para detectar la mutación GGT>IGT de K-ras de una muestra de tejido combinado con parafina clínica mediante el sistema de PCR anterior comprende las siguientes etapas:

(1) tratamiento de la muestra y extracción de la plantilla: muestras de tejido combinado con parafina clínica se cortan en rodajas hasta 5-10 µm, y se añade 1 ml de xileno para retirar la parafina, se recoge el depósito mediante una  
50 centrífuga y se añade 1 ml de etanol absoluto al depósito, se seca a temperatura ambiente o 37°C, se añade proteasa K y tampón ATL, se digiere a 56°C durante 1 h, se incuba a 90°C durante 1 h, se añaden 200 µl de tampón AL y se combina, a continuación se añaden 200 µl de etanol absoluto y se combina, el sobrenadante se retira cuidadosamente hasta una columna giratoria de 2 ml QIA, 6.000×g (8.000 rpm) 1 min., a continuación se añaden 500 µl de tampón AW1, 6.000×g (8.000 rpm) 1 min., se abre cuidadosamente la tapa y se añaden 500 µl de tampón  
55 AW2, 6.000×g (8.000 rpm) 1 min., el tubo vacío se centrifuga a 20.000×g (14.000 rpm) durante 3 min., se añaden

## ES 2 610 616 T3

100 µl de tampón ATE en el medio de la película, se incuba durante 5 min., 20.000xg (14.000 rpm) 1 min. se recogen 3,3 µl para detectar el valor de OD, la muestra de ADN se diluye hasta 2 ng/µl, se recogen 5 µl para la PCR

(2) Sistema de amplificación por PCR fluorescente que comprende:

5

1×tampón de PCR

MgCl <sub>2</sub>	7,0 mmol
dNTP cada uno	1,0 mmol
cebadores	0,5~1,0 µmol
secuencia marcadora T	5~10 µmol
sondas	0,5~1,0 µmol
polimerasa de Taq	1,0 U
plantilla	5 µl
volumen total	25 µl

Secuencia de los cebadores y la sonda

K-ras-M1-F : ACAAGCTCCGCAAGGGGTCAGTAAAGCGAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTTGT ,

en donde las bases con subrayado son secuencia marcadora, las bases con marco en el extremo 5' son complementarias a las bases del extremo 3', las bases en negrita son la base de reconocimiento de mutación;

10 K-ras-M1-R: GCAAGGGGTCAGTAAAGCGTCGTCCACAAAATGATTCTG, en donde las bases con subrayado son secuencia marcadora, la secuencia marcadora T es GCAAGGGGTCAGTAAAGCG•K-ras-P: FAM-5' TGCCTTGACGATACAGCT3'-BHQ. El sistema de control interno HGH-F: 5'-  
15 GCAAGGGGTCAGTAAAGCGGCAGTGCCTTCCCAACCATT-3', HGH-R: 5'-  
GCAAGGGGTCAGTAAAGCGCATTCCCAAGAGCTTACAAACTC-3', en donde las bases con subrayado son secuencia marcadora, HGH-P: HEX-5'TTGACAACGCTATGCTCCGC3' - BHQ.

La condición de reacción de PCR en tiempo real es: predesnaturalización a 96°C durante 15 ciclos de 3 min., a continuación desnaturalización a 95°C 15 s, 64°C 25 s, extensión a 72°C 10 s, 35 ciclos; 95°C 15 s; 58°C 25 s, 72°C 15 s, extensión °C 10 s, 35 ciclos. Los 35 ciclos finales detectan las señales de FAM y HEX en etapas de renaturalización.

20

(3) detección: la fluorescencia se detecta en la fase de renaturalización mediante un amplificador de PCR en tiempo real MX3000p (SRATGENE), el tubo de PCR que contiene el líquido de reacción se detecta uno a uno en el amplificador de PCR de fluorescencia.

25 Juicio de los resultados: según el valor de Ct mostrado en el amplificador de PCR de fluorescencia para detectar la intensidad de fluorescencia de FAM y HEX en el sistema de reacción, la señal de HEX que alcanza el umbral (Ct>18) significa que el contenido de ADN está dentro del límite, y el resultado de la señal de FAM es fiable; si la señal de FAM se plantea según el juicio de negativo y positivo, la curva de amplificación por PCR con conformación de S normal es positiva.

(4) Análisis de la especificación

30 Detección de la especificación: se toma como control ADN de la célula SW48, se detecta la mutación GTG>TGT de K-ras de la muestra recogida, el resultado muestra que solo la muestra que contiene la mutación GTG>TGT de K-ras tiene señal fluorescente, mientras que el ADN de la célula SW48 usado como control no tiene señal fluorescente. Además, se usan 100 muestras procedentes de un banco de sangre para identificar adicionalmente la especificación de la PCR fluorescente. Los resultados muestran que las muestras de sangre procedentes del banco de sangre no tienen señal fluorescente detectando mediante PCR fluorescente.

35

(5) Análisis de sensibilidad

El análisis cuantitativo se procesa mediante ADN plasmídico sintético que contiene la mutación GTG>TGT de K-ras, se toma el ADN de la muestra con contenido de 1000 copias después de cuantificar y se diluye 10 veces, y se toman tres clases diluidas, a continuación se toman 5 µl en cada una de las cuatro clases diluidas, se usan ocho grupos paralelos para la PCR fluorescente. El método de la presente invención tiene gran sensibilidad, se pueden detectar 1-10 copias/µl.

40

## (6) Selectividad

5 copias de ADN plasmídico sintético que contienen mutación GTG>TGT de K-ras se detectan por fluorescencia en un fondo de 1 ng, 5 ng, 10 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, mostrado en la FIG. 6

- 5 La FIG. 6 muestra el resultado de detección de la amplificación para la plantilla de mutación rara en un fondo de diferente contenido mediante el cebador de amplificación doble con conformación de bucle de la presente invención. La plantilla de mutación se detecta en un fondo de 1 ng, 5 ng, 10 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, respectivamente, la línea 71 es 5 copias en fondo de 1 ng, la línea 72 es 5 copias en fondo de 5 ng, la línea 73 es 5 copias en fondo de 10 ng, la línea 74 es 5 copias en fondo de 50 ng, la línea 75 es 5 copias en fondo de 100 ng y la línea 76 es 5 copias en fondo de 200 ng. El resultado muestra que el cebador de amplificación doble con conformación de bucle de la presente invención tiene gran selectividad. En el sistema de reacción, se producirá la correspondiente amplificación. Cuando las dos secuencias diana estén en las muestras, los productos del cebador silvestre (línea 67) y el cebador de mutación (línea 68) se incrementan notablemente. Sin embargo, según la diana silvestre, el incremento del producto está provocado por la amplificación del cebador silvestre (línea 63), no por la amplificación del cebador de mutación (línea 64). A la inversa, según la diana de mutación, el incremento del producto está provocado por la amplificación del cebador de mutación (línea 65), no por la amplificación del cebador silvestre (línea 66). Esto prueba que el cebador de la invención diferencia la diana por uno o más ácidos nucleicos. Cuando no hay plantilla, no se encuentra amplificación, cuando hay dos plantillas, se encuentran señales de amplificación de las dos PCR.

## Realización 4

- 20 Cebador de amplificación doble con conformación de bucle usado en la amplificación precisa para una sola mutación rara de la región de agrupación de mutaciones del codón 12 de K-ras

El gen K-ras tiene importantes funciones en el crecimiento y la diferenciación celulares, aproximadamente 70% de los cánceres se relacionan con la mutación de los codones 12, 13, la otra mutación codónica se produce en el sitio 59 y 61. Cada base de las tres bases en el codón 12 o 13 puede ser una mutación, generalmente, la mutación se produce en las bases primera o segunda, puede estar mutada en las otras tres bases excepto ella misma, o las bases tanto primera como segunda pueden estar mutadas. Por ejemplo, la primera base del codón 12 esta mutada en A, es decir GGT>TGT (Cosmic ID:480,) esta mutación es una mutación de punto caliente relacionada con la resistencia farmacológica al Erbitux, un fármaco para tratar el cáncer de colon; aunque mutaban las bases tanto primera como segunda, p. ej. GGT>TGC (Cosmic ID:513), GGT>TTT (Cosmic ID:512), GGT>TTAT (Cosmic ID:25081), estas tres mutaciones son una mutación común, y no es seguro que estén relacionadas con la resistencia farmacológica al Erbitux. Los cebadores de ARMS comunes detectan fácilmente estas mutaciones como GGT>TGT por error.

35 Según la secuencia silvestre y de mutación GGT>TGT (Cosmic ID:480) del codón 12 publicada por Cosmic, se diseñan un par de cebadores de amplificación dobles con conformación de bucle y una sonda, que son K-ras-M1-F, K-ras-M1-R, K-ras-P, respectivamente. Según el gen silvestre de HGH publicado por Cosmic, se diseñan un par de cebadores de amplificación dobles con conformación de bucle y una sonda como HGH-F, HGH-R, HGH-P, respectivamente.

- 40 El método para detectar la mutación GGT>TGT de K-ras de una muestra de tejido combinado con parafina clínica mediante el sistema de PCR anterior comprende las siguientes etapas:

(1) tratamiento de la muestra y extracción de la plantilla: muestras de tejido combinado con parafina clínica se cortan en rodajas hasta 5-10  $\mu$ m, y se añade 1 ml de xileno para retirar la parafina, se recoge el depósito mediante una centrífuga y se añade 1 ml de etanol absoluto al depósito, se seca a temperatura ambiente o 37°C, se añade proteasa K y tampón ATL, se digiere a 56°C durante 1 h, se incuba a 90°C durante 1 h, se añaden 200  $\mu$ l de tampón AL y se combina, a continuación se añaden 200  $\mu$ l de etanol absoluto y se combina, el sobrenadante se retira cuidadosamente hasta una columna giratoria de 2 ml QIA, 6.000 $\times$ g (8.000 rpm) 1 min., a continuación se añaden 500  $\mu$ l de tampón AW1, 6.000 $\times$ g (8.000 rpm) 1 min., se abre cuidadosamente la tapa y se añaden 500  $\mu$ l de tampón AW2, 6.000 $\times$ g (8.000 rpm) 1 min., el tubo vacío se centrifuga a 20.000 $\times$ g (14.000 rpm) durante 3 min., se añaden 100  $\mu$ l de tampón ATE en el medio de la película, se incuba durante 5 min., 20.000 $\times$ g (14.000 rpm) 1 min. se recogen 3,3  $\mu$ l para detectar el valor de OD, la muestra de ADN se diluye hasta 2 ng/ $\mu$ l, se recogen 5  $\mu$ l para la PCR.

- (2) Sistema de amplificación por PCR fluorescente que comprende:

55

1×tampón de PCR	
MgCl <sub>2</sub>	7,0 mmol
dNTP cada uno	1,0 mmol
cebadores	0,5~1,0 µmol
secuencia marcadora T	5~10 µmol
sondas	0,5~1,0 µmol
polimerasa de Taq	1,0 U
plantilla	5 µl
volumen total	25 µl

Secuencia de los cebadores y la sonda

K-ras-M1-F : ACAAGCTCCGCAAGGGGTCAGTAAAGCGAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTTGT ,

5 en donde las bases con subrayado son secuencia marcadora, las bases con marco en el extremo 5' son complementarias a las bases del extremo 3', las bases en negrita son la base de reconocimiento de mutación;  
 K-ras-M1-R: GCAAGGGGTCAGTAAAGCGTCGTCCACAAAATGATTCTG, en donde las bases con subrayado son secuencia marcadora, la secuencia marcadora T es GCAAGGGGTCAGTAAAGCG•K-ras-P: FAM-5' TGCCTTGACGATACAGCT3'-BHQ. El sistema de control interno HGH-F: 5' -  
 10 GCAAGGGGTCAGTAAAGCGGCAGTGCCTTCCCAACCATT-3', HGH-R: 5' - GCAAGGGGTCAGTAAAGCGCATTCCCAAGAGCTTACAAACTC-3', en donde las bases con subrayado son secuencia marcadora, HGH-P: HEX-5'TTGACAACGCTATGCTCCGC3' - BHQ.

15 La condición de reacción de PCR en tiempo real es: predesnaturalización a 96°C durante 15 ciclos de 3 min., a continuación desnaturalización a 95°C 15 s, 64°C 25 s, extensión a 72°C 10 s, 35 ciclos; 95°C 15 s; 58°C 25 s, 72 (detección de señal de fluorescencia de FAM), 72°C 15 s, extensión °C 10 s, 35 ciclos. Los 35 ciclos finales detectan las señales de FAM y HEX en etapas de renaturalización.

(3) detección: la fluorescencia se detecta en la fase de renaturalización mediante un amplificador de PCR en tiempo real MX3000p (SRATGENE), el tubo de PCR que contiene el líquido de reacción se detecta uno a uno en el amplificador de PCR de fluorescencia.

20 Juicio de los resultados: según el valor de Ct mostrado en el amplificador de PCR de fluorescencia para detectar la intensidad de fluorescencia de FAM y HEX en el sistema de reacción, la señal de HEX que alcanza el umbral (Ct>18) significa que el contenido de ADN está dentro del límite, y el resultado de la señal de FAM es fiable; si la señal de FAM se plantea según el juicio de negativo y positivo, la curva de amplificación por PCR con conformación de S normal es positiva.

25 (4) Análisis de la especificación

30 Detección de la especificación: se toma como control ADN de la célula SW48, se detecta la mutación GTG>TGT de K-ras de la muestra recogida, el resultado muestra que solo la muestra que contiene la mutación GTG>TGT de K-ras tiene señal fluorescente, mientras que el ADN de la célula SW48 usado como control no tiene señal fluorescente. Además, se usan 100 muestras procedentes de un banco de sangre para identificar adicionalmente la especificación de la PCR fluorescente. Los resultados muestran que las muestras de sangre procedentes del banco de sangre no tienen señal fluorescente detectando mediante PCR fluorescente.

(5) Análisis de sensibilidad

35 El análisis cuantitativo se procesa mediante ADN plasmídico sintético que contiene la mutación GTG>TGT de K-ras, se toma el ADN de la muestra con contenido de 1.000 copias después de cuantificar y se diluye 10 veces, y se toman tres clases diluidas, a continuación se toman 5 µl en cada una de las cuatro clases diluidas, se usan ocho grupos paralelos para la PCR fluorescente. El método de la presente invención tiene gran sensibilidad, se pueden detectar 1-10 copias/µl.

(6) Selectividad

5 copias de ADN plasmídico sintético que contienen mutación GTG>TGT de K-ras se detectan por fluorescencia en un fondo de 1 ng, 5 ng, 10 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, mostrado en la FIG. 6

5 La FIG. 6 muestra el resultado de detección de la amplificación para la plantilla de mutación rara en un fondo de diferente contenido mediante el cebador de amplificación doble con conformación de bucle de la presente invención. La plantilla de mutación se detecta en un fondo de 1 ng, 5 ng, 10 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, respectivamente, la línea 71 es 5 copias en fondo de 1 ng, la línea 72 es 5 copias en fondo de 5 ng, la línea 73 es 5 copias en fondo de 10 ng, la línea 74 es 5 copias en fondo de 50 ng, la línea 75 es 5 copias en fondo de 100 ng y la línea 76 es 5 copias en fondo de 200 ng. El resultado muestra que el cebador de amplificación doble con conformación de bucle de la  
10 presente invención tiene gran selectividad.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la amplificación de un ácido nucleico que comprende un sistema de tres cebadores, en el que dichos cebadores son el cebador directo F, el cebador inverso R y el cebador universal T, en donde

5 al menos un cebador es un cebador con conformación de bucle en el cebador directo F y el cebador inverso R, el extremo 3' del cebador con conformación de bucle es la región de reconocimiento de la diana, y el extremo 5' tiene 3-20 bases complementarias con el extremo 3', en ciertas condiciones el extremo 3' y el extremo 5' del cebador directo F y/o el cebador inverso R pueden formar una doble hebra para dotar al cebador de una estructura con conformación de bucle, el interior del cebador directo F y el cebador inverso R tiene una misma secuencia de etiquetaje universal, respectivamente;

10 en ciertas condiciones, el extremo 3' y el extremo 5' del cebador directo F y/o el cebador inverso R pueden formar una doble hebra para dotar al cebador de una estructura con conformación de bucle, cuando el cebador se reconoce y se hibrida a la secuencia diana, la estructura de doble hebra se abre y la estructura con conformación de bucle se pierde, y la doble hebra del cebador se transforma para ser la doble hebra combinada con la secuencia diana, así adquieren capacidad de extensión de ADN; el cebador universal T tiene la misma secuencia que la secuencia de etiquetaje universal en el cebador directo F y el cebador inverso R, en donde dicho cebador con conformación de bucle comprende además una región de reconocimiento de mutación.

20 2. El método para la amplificación de un ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que dicha región de reconocimiento de mutación se establece en la primera base del extremo 3' o dentro de la región de reconocimiento de la diana.

25 3. El método para la amplificación de un ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que la longitud total del cebador es 35-80 pb, la región de reconocimiento de la diana es 16-40 pb y la secuencia de etiquetaje universal ee 16-30 pb.

4. El método para la amplificación de un ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que la cantidad añadida de la secuencia marcadora T es más de 10 veces la cantidad total del cebador F y el cebador R.

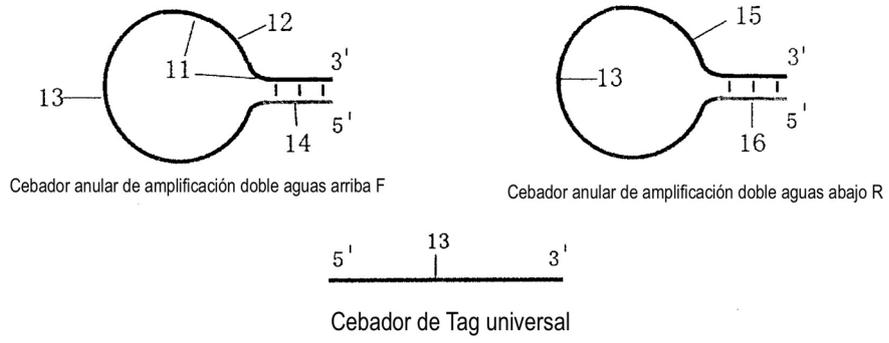


Fig. 1a

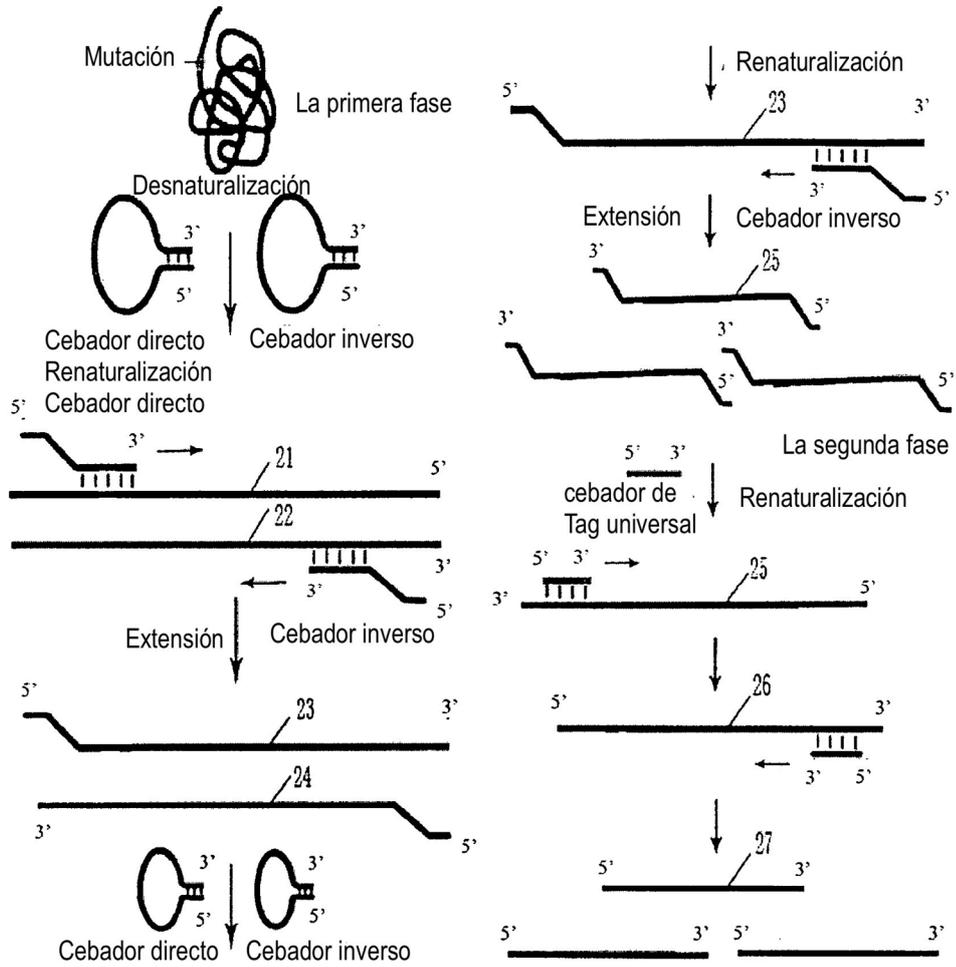


Fig. 1'b

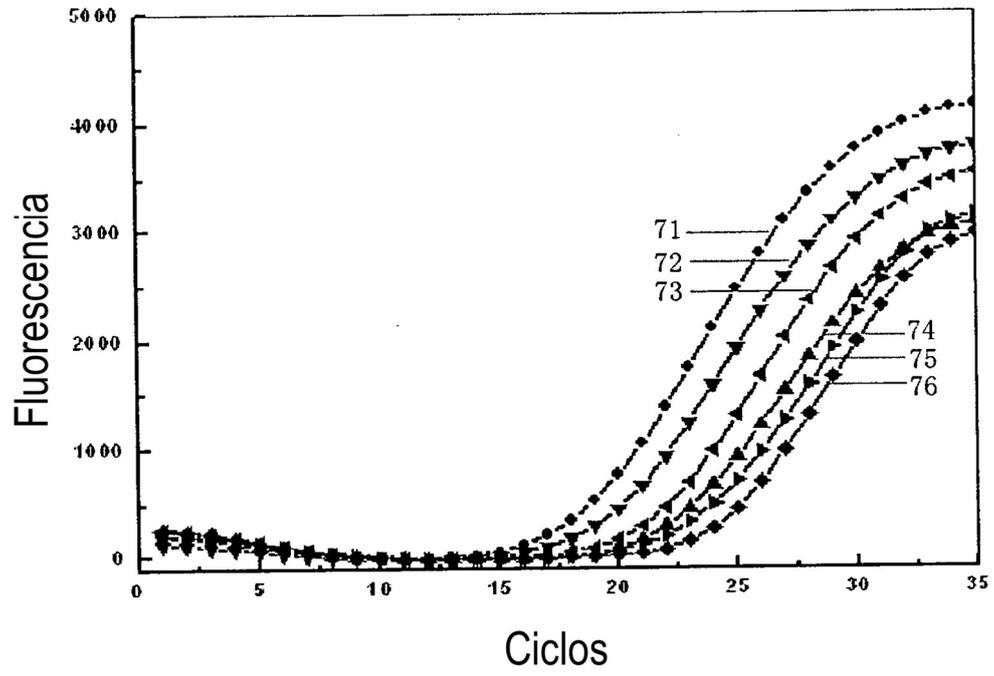


Fig. 2

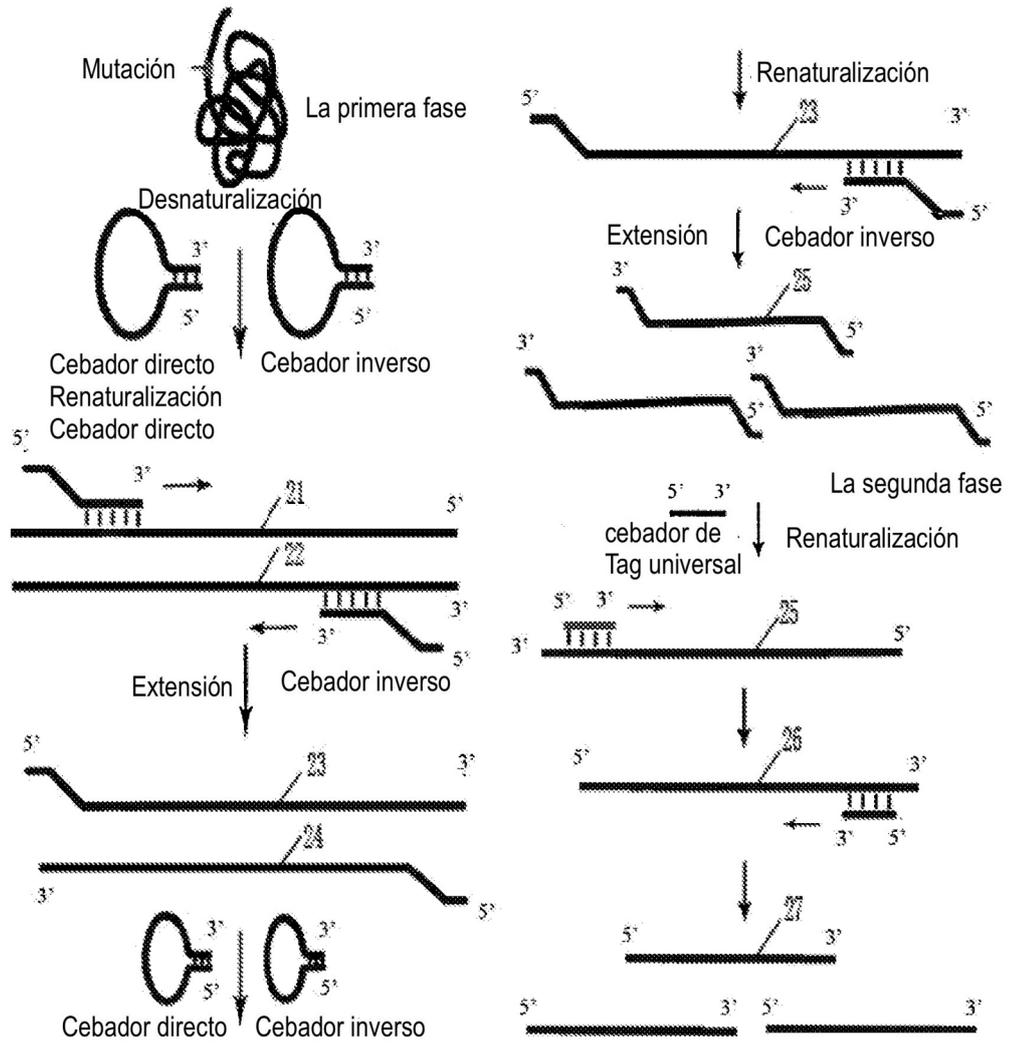


Fig. 2b

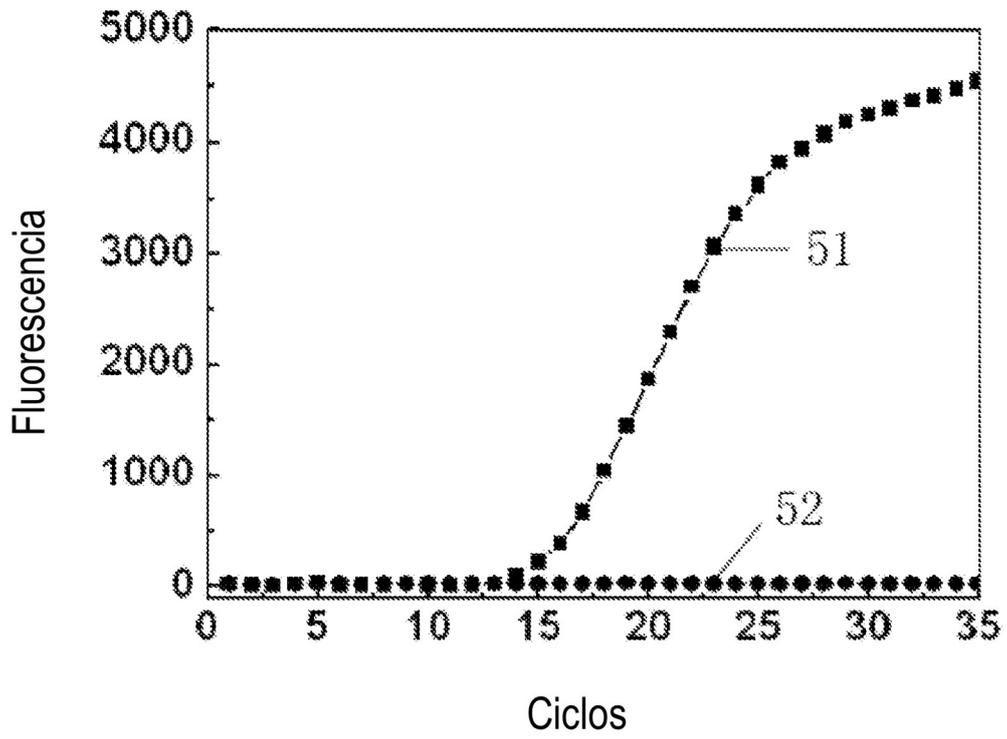


Fig. 3a

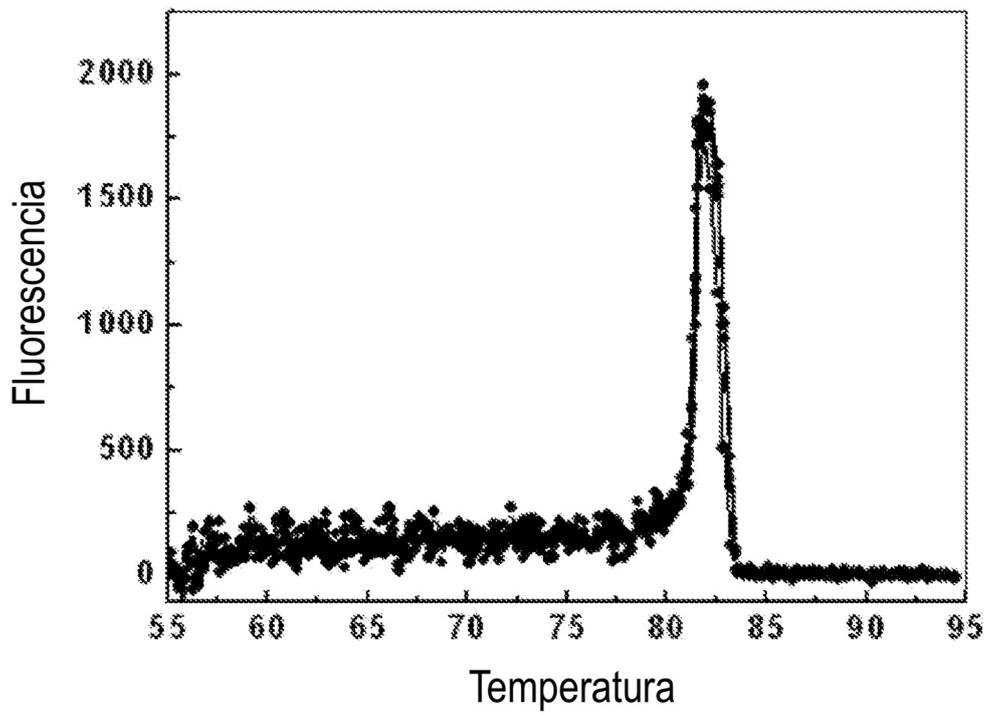


Fig. 3b

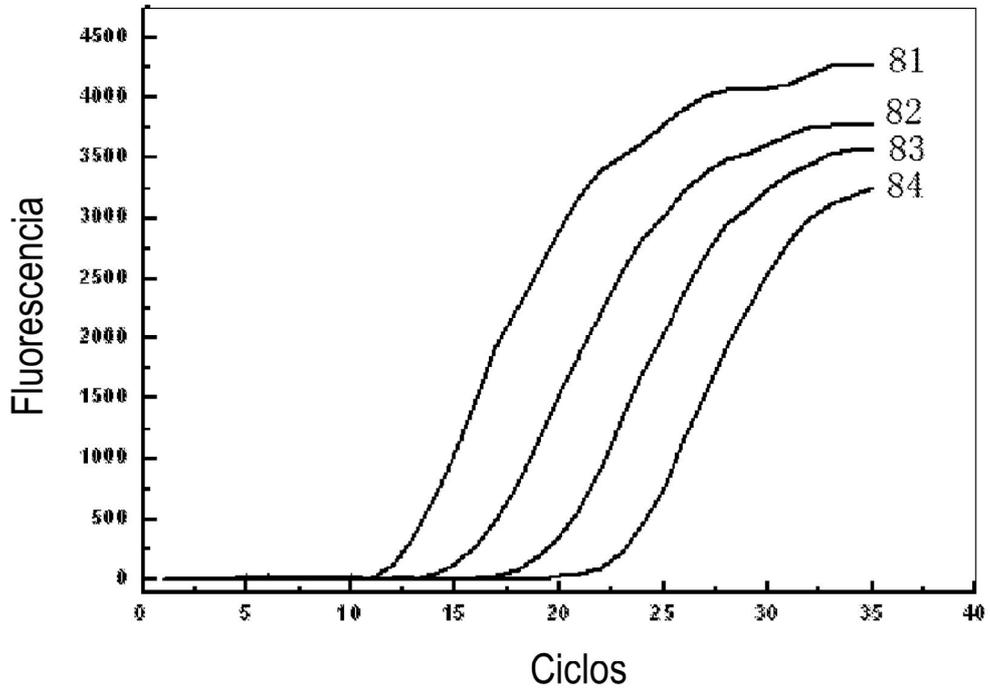


Fig. 4

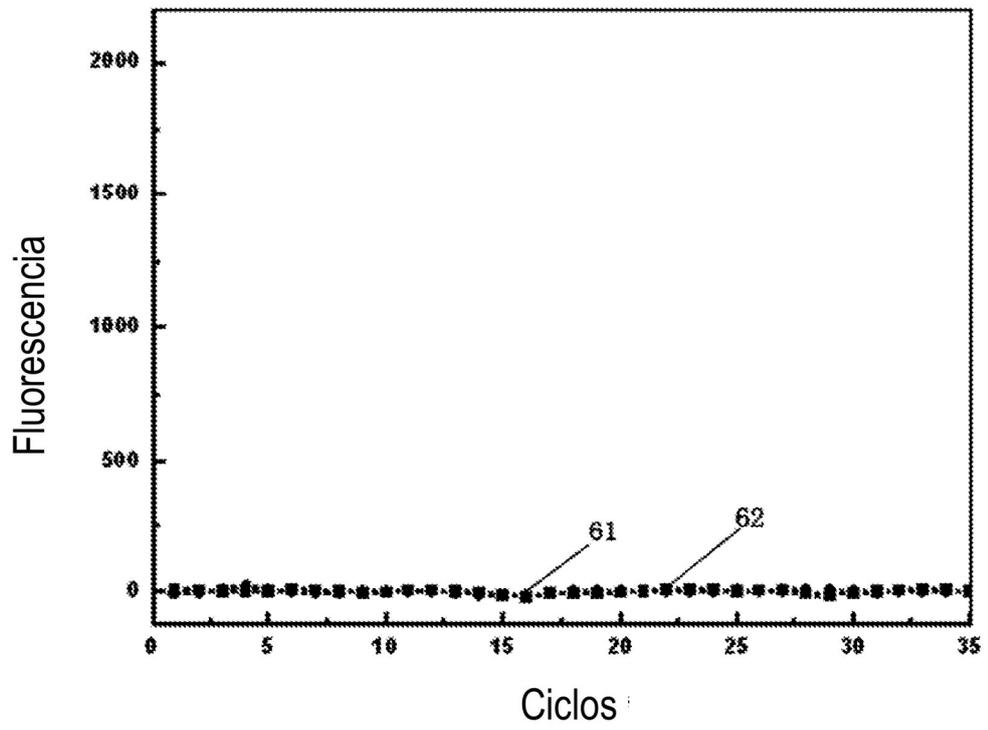


Fig. 5a

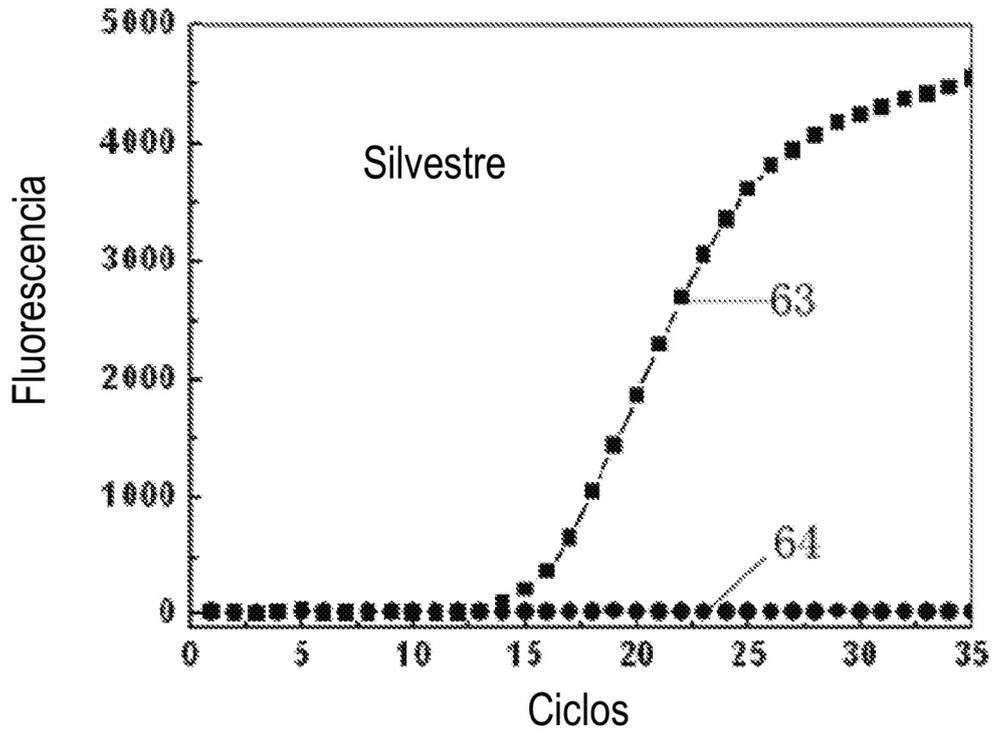


Fig. 5b

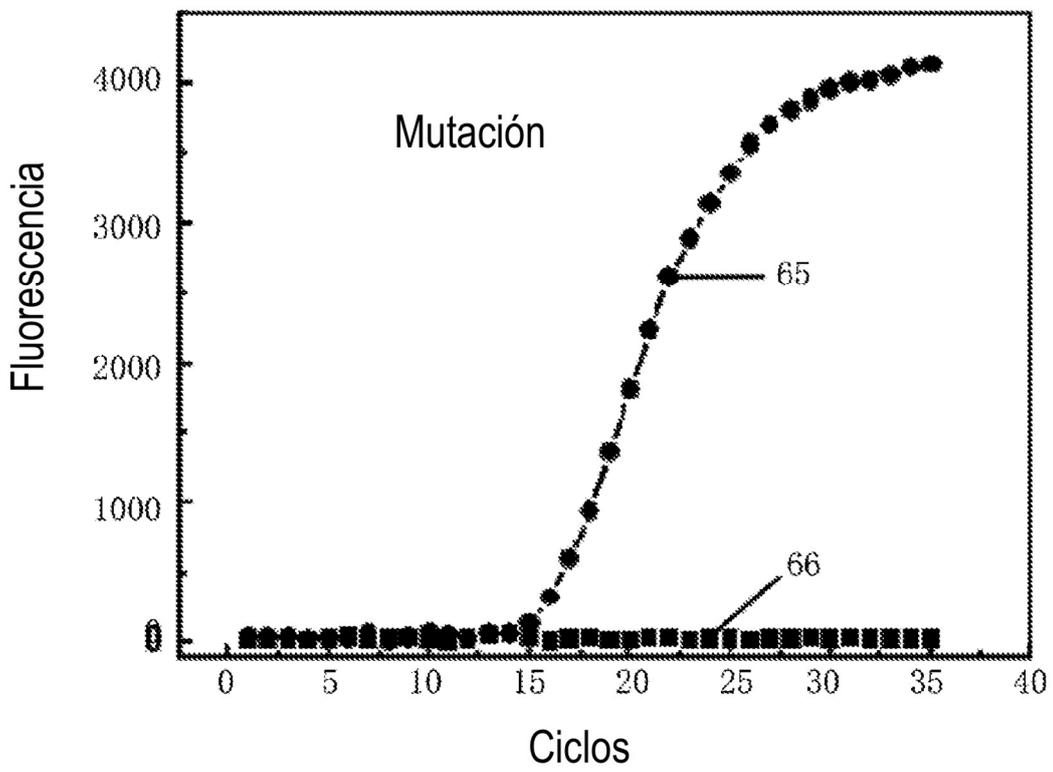


Fig. 5c

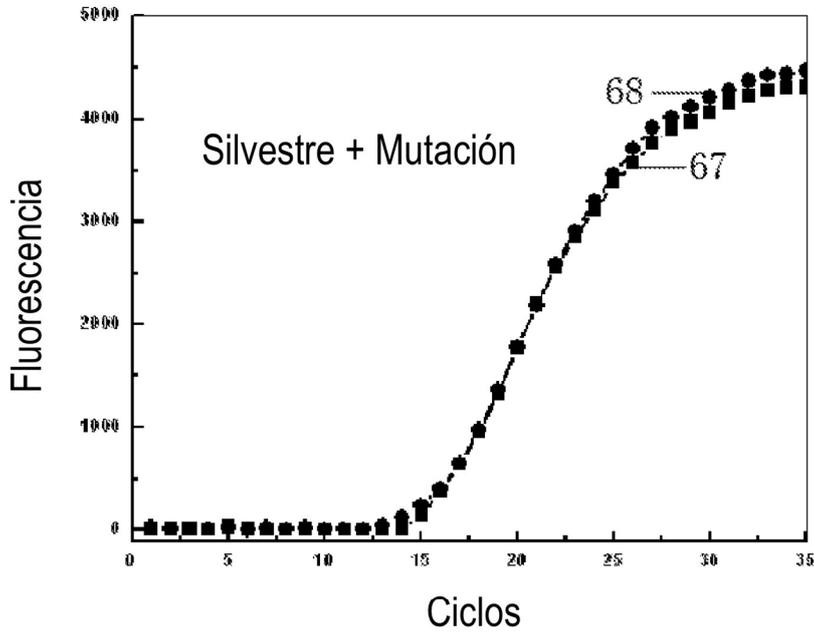


Fig. 5d

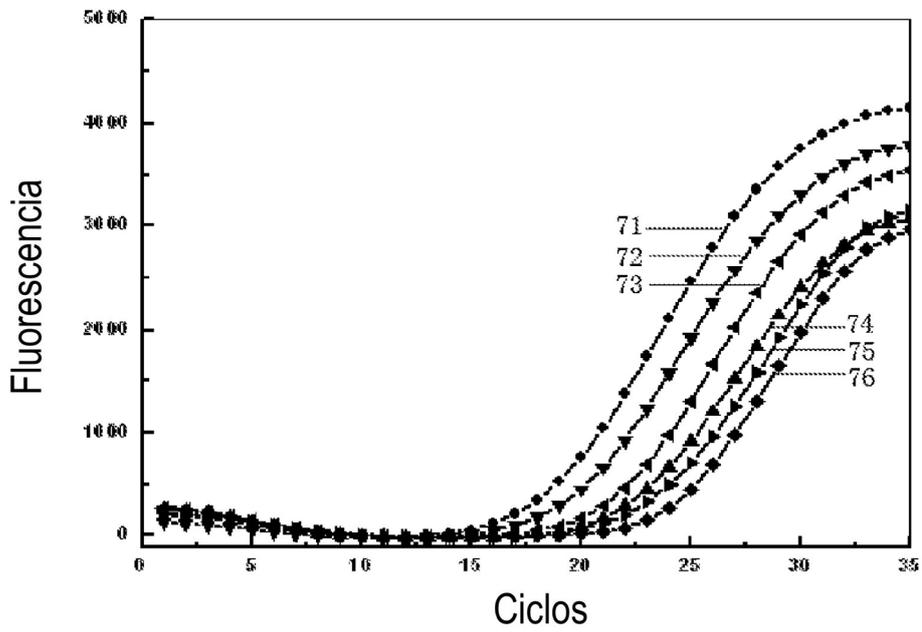


Fig. 6