

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 627 523**

51) Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2013 PCT/EP2013/076148**

87) Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14090837**

96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2013 E 13802395 (7)**

97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2931917**

54) Título: **Cebadores con fosfato y base modificados en PCR específica de alelo**

30) Prioridad:

**13.12.2012 US 201261736742 P**

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

**28.07.2017**

73) Titular/es:

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

72) Inventor/es:

**FROEHNER, STEFANIE;  
HEINDL, DIETER;  
KESSLER, DIRK;  
SCHOENBRUNNER, NANCY y  
TSAN, ALISON**

74) Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 627 523 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**

Cebadores con fosfato y base modificados en PCR específica de alelo

**CAMPO DE LA INVENCION**

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

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 La amplificación específica de alelo de ácidos nucleicos permite la amplificación y el análisis simultáneos de la secuencia diana. La amplificación específica de alelo se usa comúnmente cuando se sospecha que el ácido nucleico diana tiene una o más subpoblaciones con una variación (polimorfismo) en su secuencia. Los polimorfismos de ADN se usan en el análisis del perfil de ADN (medicina forense, pruebas de paternidad, tipificación de tejidos para trasplantes de órganos), cartografía genética, así como la detección de mutaciones raras, como las que aparecen en células cancerosas en el fondo de células con ADN normal.

15 En una amplificación específica de alelo exitosa, la variante deseada del ácido nucleico diana se amplifica, pero no así las otras variantes, al menos no a un nivel detectable. Un ensayo de amplificación específico de alelo típico implica una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la que al menos un cebador es complementario de la región con un presunto polimorfismo. El diseño del cebador específico del alelo es tal que la extensión del cebador aparece solo cuando está presente cierta variante del polimorfismo. En su forma más simple, el cebador específico de alelo tiene un nucleótido del extremo 3' complementario de la variante deseada del nucleótido polimórfico en la diana. A menudo, un único emparejamiento erróneo en el extremo 3' del cebador es suficiente para impedir la  
20 amplificación de las variantes no deseadas de la secuencia diana. Sin embargo, la especificidad de la amplificación varía mucho entre las diferentes secuencias del extremo 3': algunos emparejamientos erróneos bloquean eficazmente la extensión por la polimerasa, mientras que otros no lo hacen, véase la patente de Estados Unidos n.º 5.639.611.

25 El éxito de la discriminación alélica depende de la incapacidad de la ADN polimerasa para extender los cebadores con emparejamientos erróneos. Esta incapacidad de la ADN polimerasa se puede modular ajustando las condiciones de reacción para conseguir la máxima selectividad. No obstante, la escasa selectividad de la PCR específica de alelo sigue siendo un problema para muchas secuencias polimórficas.

30 Un método para aumentar la especificidad implica insertar uno o más nucleótidos internos con emparejamientos erróneos en cebadores de amplificación. Este método resultó exitoso en algunos sistemas, véase la patente de EE. UU. 5.137.806.

35 Otro método para aumentar la especificidad implica la modificación química de los cebadores. Por ejemplo, se observó que ciertas modificaciones en los carbonos 2'-C y 4'-C de la desoxirribosa de algunos nucleótidos en el cebador potencian la discriminación alélica por la polimerasa. Véase Gaster, J. y Marx, A., Chem. Eur. J. 2005, 11:1861-1870. En otro estudio, se observó que la discriminación alélica se potencia mediante el uso de una base de pirimidina no natural en uno de los nucleótidos del cebador, específicamente, pseudoisocitidina con varios sustituyentes en la posición 6 del anillo de pirimidina, véase la patente de EE. UU. n.º 7.408.051. Otro procedimiento para la amplificación específica del alelo se describe en el documento WO 2010/046067 utilizando un oligonucleótido específico de alelo que tiene un nucleótido del extremo 3' que es complementario de solo una variante de la secuencia diana y que tiene al menos un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino  
40 exocíclico, en el que el oligonucleótido específico de alelo se extiende mediante un biocatalizador que incorpora nucleótidos, predominantemente cuando se hibrida con la variante de la secuencia diana para la que tiene dichos nucleótidos del extremo 3' complementarios.

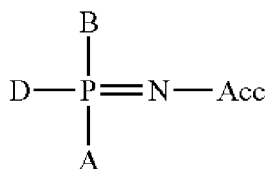
45 En el contexto de la PCR específica de alelo en tiempo real, la selectividad del ensayo puede medirse como la diferencia en el número de ciclo umbral (Ct) entre las plantillas con emparejamientos correctos y con emparejamientos erróneos. Una diferencia mayor indica un mayor retraso en la amplificación de la plantilla con emparejamientos erróneos y, por tanto, una mayor discriminación entre alelos. Se ha demostrado que la desoxirribosa modificada da como resultado diferencias en el Ct de entre 1 y 14 ciclos. El uso de pseudoisocitidina daba como resultado un retraso de 7 ciclos en la amplificación de la plantilla con emparejamientos erróneos. Este grado de discriminación es insuficiente para muchas aplicaciones, en las que la muestra contiene varias variantes de la plantilla, compitiendo todas por la amplificación. A menudo, la plantilla con emparejamientos erróneos está presente en cantidades mucho mayores que la plantilla con emparejamientos correctos. Por ejemplo, en muestras tisulares, solo una pequeña fracción de células pueden ser cancerosas y portar la mutación («plantilla con emparejamientos correctos») a la que se dirige el ensayo de amplificación específico de alelo. La plantilla presente en células normales puede amplificarse menos eficientemente, pero el número abrumador de células normales  
50 superará cualquier retraso en la amplificación y eliminará cualquier ventaja de la plantilla mutante. Para detectar mutaciones raras en presencia de la plantilla natural, es necesario mejorar la especificidad del ensayo de amplificación específico de alelo.

Se han propuesto muchas maneras de potenciar la especificidad de alelo de los cebadores. Sin embargo, para muchas dianas de ácidos nucleicos clínicamente relevantes, la falta de especificidad de la PCR sigue siendo un problema. Por lo tanto, son necesarios métodos novedosos para el diseño de cebadores específicos de alelo.

5 Se han descrito nucleótidos y oligonucleótidos que contienen residuos de fosfato modificados en la patente de Estados Unidos n.º 7.741.472 (o EP 1 801 114). La característica clave de este fosfato modificado era comenzar con un átomo de fósforo trivalente y hacerlo reaccionar con un reactivo, de tal manera que se formara un mimético de fosfato estable. Se hizo reaccionar un átomo de fósforo que contenía al menos un residuo hidroxilo, que se proporcionó con un grupo protector, con una azida que tenía la estructura N=N=N-Acc en la que Acc es un aceptor de electrones o un aceptor de electrones sustituido con un residuo R y R es cualquier sustituyente orgánico. Esto da como resultado la formación de un átomo de fósforo pentavalente al que un grupo aceptor de electrones que atrae electrones fuertemente está unido covalentemente a través de un átomo de N. Este grupo garantiza que los oligonucleótidos producidos de esta manera están, a diferencia de los compuestos de fosforamidato, estabilizados por resonancia y no son susceptibles de hidrólisis. Se divulgan nucleótidos y oligonucleótidos similares que contienen residuos modificados en el documento WO 2008/128686. La característica clave de este fosfato modificado se basa en un nucleótido de la estructura: B-S[Y(P)]OH=N=Acc, en la que un átomo de oxígeno del alfa-fosfato es reemplazado por -N=Acc y en la que Acc es un aceptor de electrones o un aceptor de electrones sustituido con un residuo R y R es cualquier sustituyente orgánico; mencionado en asociación con la preparación de aptámeros, la PCR o la secuenciación de pirofosfato.

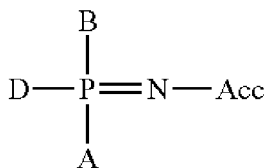
#### RESUMEN DE LA INVENCION

20 En un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de amplificación específica de alelo de una variante de una secuencia diana, existiendo la diana en forma de varias secuencias variantes, comprendiendo el procedimiento: (a) hibridar un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido con al menos una variante de la secuencia diana; en el que el primer oligonucleótido es al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y el segundo oligonucleótido es al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y tiene al menos un nucleótido selectivo complementario de una única variante de la secuencia diana; en el que dicho segundo oligonucleótido comprende tanto un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico como un fosfato modificado que tiene una estructura:



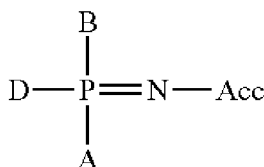
30 en la que A y B representan una cadena de nucleótidos, D es OH o CH<sub>3</sub> y Acc es un aceptor de electrones o un aceptor de electrones sustituido con un residuo R en el que R es un sustituyente orgánico, en la que Acc se selecciona del grupo que consiste en CN, SO<sub>2</sub>-R', en el que R' comprende al menos un alquilo aminosustituido, un anillo opcionalmente sustituido o un heterociclo opcionalmente sustituido y un heterociclo N<sup>+</sup> de seis miembros con al menos un átomo de N alquilado en posición orto o para, estando dicho heterociclo seleccionado del grupo que consiste en piridinio, pirimidinio y quinolinio; (b) proporcionar condiciones adecuadas para la extensión de oligonucleótidos por una polimerasa de ácidos nucleicos; (c) extender dicho primer oligonucleótido y dicho segundo oligonucleótido mediante dicha polimerasa de ácidos nucleicos, en el que dicha polimerasa de ácidos nucleicos es capaz de extender dicho segundo oligonucleótido eficientemente cuando dicho oligonucleótido se hibrida con una variante de la secuencia diana que es complementaria de al menos dicho nucleótido selectivo, y sustancialmente menos eficientemente cuando dicho segundo oligonucleótido se hibrida con una variante de la secuencia diana que no es complementaria de al menos dicho nucleótido selectivo.

40 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de detección de una variante de una secuencia diana, existiendo la diana en forma de varias secuencias variantes, comprendiendo el procedimiento: (a) hibridar un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido con al menos una variante de la secuencia diana; en el que el primer oligonucleótido es al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y el segundo oligonucleótido es al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y tiene al menos un nucleótido selectivo complementario de una única variante de la secuencia diana; en el que dicho segundo oligonucleótido comprende tanto un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico como un fosfato modificado que tiene una estructura:



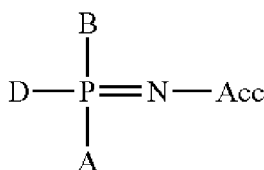
5 en la que A y B representan una cadena de nucleótidos, D es OH o CH<sub>3</sub> y Acc es un aceptor de electrones o un aceptor de electrones sustituido con un residuo R en el que R es un sustituyente orgánico, en el que Acc se selecciona del grupo que consiste en CN, SO<sub>2</sub>-R', en el que R' comprende al menos un alquilo aminosustituido, un arilo opcionalmente sustituido o un heterociclo opcionalmente sustituido y un heterociclo N<sup>+</sup> de seis miembros con al menos un átomo de N alquilado en posición orto o para, estando dicho heterociclo seleccionado del grupo que  
10 consiste en piridinio, pirimidinio y quinolinio; (b) proporcionar condiciones adecuadas para la extensión de oligonucleótidos por una polimerasa de ácidos nucleicos; (c) extender dicho primer oligonucleótido y dicho segundo oligonucleótido por dicha polimerasa de ácidos nucleicos, en el que dicha polimerasa de ácidos nucleicos es capaz de extender dicho segundo oligonucleótido eficientemente cuando dicho oligonucleótido se hibrida con una variante de la secuencia diana que es complementaria de al menos dicho nucleótido selectivo, y sustancialmente menos eficientemente cuando dicho segundo oligonucleótido se hibrida con una variante de la secuencia diana que no es complementaria de al menos dicho nucleótido selectivo; (d) detectar productos de dicha extensión de oligonucleótidos, en el que dicha extensión significa la presencia de la variante de dicha secuencia diana con la que  
15 dicho segundo oligonucleótido tiene un nucleótido selectivo complementario.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un kit para la amplificación específica de alelo de una secuencia diana, existiendo la diana en forma de varias secuencias variantes, como se describe anteriormente, comprendiendo el kit: (a) un primer oligonucleótido al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia  
20 diana; y (b) un segundo oligonucleótido al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y que tiene al menos un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana; en el que dicho segundo oligonucleótido comprende tanto un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico como un fosfato modificado que tiene una estructura:



25 en la que A y B representan una cadena de nucleótidos, D es OH o CH<sub>3</sub> y Acc es un aceptor de electrones o un aceptor de electrones sustituido con un residuo R en el que R es un sustituyente orgánico, en la que Acc se selecciona del grupo que consiste en CN, SO<sub>2</sub>-R', en el que R' comprende al menos un alquilo aminosustituido, un arilo opcionalmente sustituido o un heterociclo opcionalmente sustituido y un heterociclo N<sup>+</sup> de seis miembros con al menos un átomo de N alquilado en posición orto o para, estando dicho heterociclo seleccionado del grupo que consiste en piridinio, pirimidinio y quinolinio.

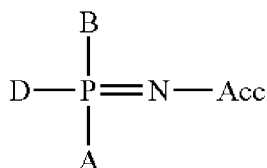
30 En un cuarto aspecto, la invención se refiere al uso de un oligonucleótido para realizar una amplificación específica de alelo de una secuencia diana, existiendo la diana en forma de varias secuencias variantes, como se describe anteriormente, comprendiendo el oligonucleótido, (a) una secuencia al menos parcialmente complementaria de una porción de una o más variantes de dicha secuencia diana; (b) al menos un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana; (c) un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo  
35 amino exocíclico; (d) un fosfato modificado que tiene una estructura:



en la que A y B representan una cadena de nucleótidos, D es OH o CH<sub>3</sub> y Acc es un aceptor de electrones o un

aceptor de electrones sustituido con un residuo R en el que R es un sustituyente orgánico, en la que Acc se selecciona del grupo que consiste en CN, SO<sub>2</sub>-R', en el que R' comprende al menos un alquilo aminosustituido, un arilo opcionalmente sustituido o un heterociclo opcionalmente sustituido y un heterociclo N<sup>+</sup> de seis miembros con al menos un átomo de N alquilado en posición orto o para, estando dicho heterociclo seleccionado del grupo que

En un quinto aspecto, la invención se refiere al uso de una mezcla de reacción para la amplificación específica de alelo de una secuencia diana, existiendo la diana en forma de varias secuencias variantes, como se describe anteriormente, comprendiendo la mezcla: (a) un primer oligonucleótido al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana; y (b) un segundo oligonucleótido al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y que tiene al menos un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana; en el que dicho segundo oligonucleótido comprende tanto un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico como un fosfato modificado que tiene una estructura:



en la que A y B representan una cadena de nucleótidos, D es OH o CH<sub>3</sub> y Acc es un aceptor de electrones o un aceptor de electrones sustituido con un residuo R en el que R es un sustituyente orgánico, en la que Acc se selecciona del grupo que consiste en CN, SO<sub>2</sub>-R', en el que R' comprende al menos un alquilo aminosustituido, un arilo opcionalmente sustituido o un heterociclo opcionalmente sustituido y un heterociclo N<sup>+</sup> de seis miembros con al menos un átomo de N alquilado en posición orto o para, estando dicho heterociclo seleccionado del grupo que consiste en piridinio, pirimidinio y quinolinio; (c) una polimerasa de ácidos nucleicos; (d) trifosfatos de nucleósidos; y (e) un tampón adecuado para la extensión de ácidos nucleicos por la polimerasa de ácidos nucleicos.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Definiciones

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

El término «ácido nucleico» se refiere a polímeros de nucleótidos (por ejemplo, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de nucleótidos, etc.) y que comprenden ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN), híbridos de ADN-ARN, oligonucleótidos, polinucleótidos, aptámeros, ácidos peptidnucleicos (APN), conjugados de APN-ADN, conjugados de PNA-ARN, etc., que comprenden nucleótidos unidos covalentemente, ya sea de forma lineal o ramificada. Un ácido nucleico es típicamente monocatenario o bicatenario y generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden tener cadenas principales alternativas, incluyendo, por ejemplo, fosforamida (Beaucage et al. (1993) Tetrahedron 49(10):1925); fosforotioato (Mag et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 1437 y la patente de EE. UU. n.º 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:2321), enlaces de O-metilfosforoamidita (véase Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press (1992)), y cadenas principales y enlaces de ácidos peptidnucleicos (véase Egholm (1992) J. Am. Chem. Soc. 114:1895). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con cadenas principales cargadas positivamente (Denpcy et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6097); cadenas principales no iónicas (patente de EE. UU. n.º 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863) y cadenas principales sin ribosa, incluyendo las descritas en las patentes de EE. UU. n.º 5.235.033 y 5.034.506. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos están también incluidos dentro de la definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins et al. (1995) Chem. Soc. Rev. pp. 169-176), y se describen también análogos en, por ejemplo, Rawls, C & E News 2 de junio de 1997, página 35. Estas modificaciones de la cadena principal de ribosa-fosfato pueden hacerse para facilitar la adición de restos adicionales tales como marcadores, o para alterar la estabilidad y la semivida de dichas moléculas en entornos fisiológicos.

Además de las bases heterocíclicas de origen natural que se encuentran típicamente en ácidos nucleicos (por ejemplo, adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), los análogos de nucleótidos también pueden incluir bases heterocíclicas de origen no natural, tales como las descritas, por ejemplo, en Seela et al. (1999) Helv. Chim. Acta 82:1640. Ciertas bases usadas en análogos de nucleótidos actúan como modificadores de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>). Por ejemplo, algunos de estos incluyen 7-desazapurinas (por ejemplo, 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, etc.), pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo, propinil-dU, propinil-dC, etc.), y similares. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.990.303. Otras bases heterocíclicas representativas incluyen, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina; derivados 8-aza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina,

hipoxantina, inosina y xantina; derivados 7-desaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitidina; 5-fluorocitidina; 5-clorocitidina; 5-yodocitidina; 5-bromocitidina; 5-metilcitidina; 5-propinilcitidina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluorouracilo; 5-clorouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracilo y similares.

- 5 «Nucleósido» se refiere a un componente del ácido nucleico que comprende una base o grupo básico (que comprende al menos un anillo homocíclico, al menos un anillo heterocíclico, al menos un grupo arilo y/o similares) unido covalentemente a un resto de azúcar (un azúcar ribosa o un azúcar desoxirribosa), un derivado de un resto de azúcar, o un equivalente funcional de un resto de azúcar (por ejemplo, un anillo carbocíclico). Por ejemplo, cuando un nucleósido incluye un resto de azúcar, la base está típicamente unida a una posición 1' de ese resto de azúcar.
- 10 Como se ha descrito anteriormente, una base puede ser una base de origen natural o una base de origen no natural. Los nucleósidos ejemplares incluyen ribonucleósidos, desoxirribonucleósidos, didesoxirribonucleósidos y nucleósidos carbocíclicos.

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

- 15 «Nucleótido purínico» se refiere a un nucleótido que comprende una base de purina, mientras que «nucleótido pirimidínico» se refiere a un nucleótido que comprende una base de pirimidina.

- «Oligonucleótido» se refiere a un polímero de ácido nucleico que incluye al menos dos, pero típicamente 5-50 nucleótidos y más típicamente, entre 15 y 35 nucleótidos. El tamaño exacto de un oligonucleótido generalmente depende de diversos factores, incluyendo el uso o función final del oligonucleótido. Los oligonucleótidos pueden prepararse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, clonación y digestión con enzimas de restricción de secuencias apropiadas, o síntesis química directa mediante un procedimiento tal como el procedimiento del fosfotriéster de Narang et al. (1979) Meth. Enzymol. 68:90-99; el procedimiento del fosfodiéster de Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68:109-151; el procedimiento de la dietilfosforamidita de Beaucage et al. (1981) Tetrahedron Lett. 22:1859-1862; el procedimiento del triéster de Matteucci et al. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103:3185-3191; procedimientos de síntesis automatizados; el procedimiento en un soporte sólido de la patente de EE. UU. n.º 4.458.066 o cualquier otro procedimiento químico conocido en la técnica.
- 20
- 25

- Un «ácido nucleico cebador» o «cebador» es un oligonucleótido que puede hibridar con un ácido nucleico plantilla y permitir la extensión o elongación de la cadena usando un biocatalizador que incorpora nucleótidos. Aunque se utilizan a veces otras longitudes de cebador, los cebadores varían típicamente de 15 a 35 nucleótidos. Los ácidos nucleicos cebadores cortos generalmente requieren temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con los ácidos nucleicos plantilla. Un ácido nucleico cebador que es al menos parcialmente complementario de una subsecuencia de un ácido nucleico plantilla es típicamente suficiente para hibridar con el ácido nucleico plantilla para que se produzca la extensión. Sin embargo, el éxito de la extensión requiere generalmente mayor complementariedad (es decir, menos emparejamientos erróneos con la plantilla) en el extremo 3' del cebador. Un ácido nucleico cebador se puede marcar, si se desea, incorporando un marcador detectable mediante técnicas radiológicas, espectroscópicas, fotoquímicas, bioquímicas, inmunoquímicas o químicas.
- 30
- 35

«Cebador extendido» se refiere a un cebador al que se han añadido uno o más nucleótidos adicionales. La «extensión del cebador» es la acción de la enzima mediante la cual se añaden nucleótidos adicionales al cebador.

- 40 «Ácido nucleico plantilla», «plantilla» o «diana» se refiere a un ácido nucleico con el que un ácido nucleico cebador puede hibridar y extenderse en condiciones adecuadas. En el contexto de la amplificación de ácidos nucleicos, la «diana» es preferentemente una región de ácido nucleico bicatenario, que consiste en las secuencias al menos parcialmente complementarias de al menos dos secuencias cebadoras y la secuencia intermedia. Una diana puede ser también un ácido nucleico monocatenario, que consiste en una secuencia al menos parcialmente complementaria de un cebador y una secuencia parcialmente idéntica al segundo cebador. Los ácidos nucleicos plantilla pueden existir como fragmentos de ácido nucleico aislados o formar parte de un fragmento de ácido nucleico mayor. Los ácidos nucleicos diana pueden derivarse o aislarse de esencialmente cualquier fuente, tales como microorganismos cultivados, microorganismos no cultivados, mezclas biológicas complejas, tejidos, sueros, tejidos o muestras antiguos o conservados, cepas aisladas ambientales o similares. Además, opcionalmente, los ácidos nucleicos plantilla incluyen o se derivan de ADNc, ARN, ADN genómico, ADN genómico clonado, genotecas de ADN genómico, ADN o ARN fragmentado enzimáticamente, ADN o ARN fragmentado químicamente, ADN o ARN fragmentado físicamente o similares. Los ácidos nucleicos plantilla también pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la técnica.
- 45
- 50

- Como se usa en el presente documento, «gen» se refiere a cualquier segmento de ADN asociado a una función biológica. Por tanto, los genes incluyen secuencias codificantes y, opcionalmente, las secuencias reguladoras requeridas para la expresión de las secuencias codificantes.
- 55

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

«Resto» o «grupo» se refiere a una de las porciones en las que se divide algo, tal como una molécula (por ejemplo, un grupo funcional, un grupo sustituyente o similar). Por ejemplo, un nucleótido comprende típicamente un grupo de bases (por ejemplo, adenina, timina, citosina, guanina, uracilo o un análogo), un resto de azúcar y uno o más grupos fosfato.

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

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

15 «Grupo arilo» se refiere a un grupo sustituyente de átomos o resto que se deriva de un compuesto aromático. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, por ejemplo, grupos fenilo o similares. Los grupos arilo opcionalmente incluyen anillos aromáticos múltiples (por ejemplo, grupos difenilo, etc.). Además, un grupo arilo puede estar sustituido o no sustituido.

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

«Grupo alquilarilo» se refiere a un grupo que comprende restos alquilo y arilo. Los ejemplos de los grupos alquilarilo incluyen grupos bencilo, grupos tolilo y grupos xililo.

25 Un «cebador específico de alelo» es un cebador que puede hibridar con varias variantes del ácido nucleico plantilla, pero que permite la elongación por la polimerasa cuando hibrida con solo algunas de las variantes del ácido nucleico plantilla. Con otras variantes del ácido nucleico plantilla, el híbrido de cebador-plantilla no puede extenderse o se extiende de manera menos eficiente por la polimerasa.

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

30 Un ensayo de amplificación es «selectivo» o «selectivo de alelo» si produce un predominio (es decir, una mayoría pero menos del 100 %) de un producto sobre otros posibles productos. Un ensayo se describe como «selectivo de alelo» siempre y cuando la amplificación de la variante no deseada (con emparejamientos erróneos) de la secuencia diana sea detectable. El término «específico» o «específico de alelo» con respecto al ensayo de amplificación se usa si se forma exclusivamente uno de los posibles productos. Un ensayo en el que la amplificación de la diana no deseada sea indetectable se denomina «específico de alelo». Sin embargo, se entiende que a medida que los procedimientos de detección se vuelven más sensibles, algunos ensayos previamente conocidos como específicos de alelo resultan ser selectivos de alelo, es decir, se puede detectar cierta amplificación de variantes no deseadas de la diana. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, el término «específico de alelo» pretende abarcar tanto la amplificación estrictamente específica de alelo como la selectiva de alelo.

40 «Genotipo» se refiere a toda o parte de la constitución genética de una célula o sujeto, o grupo de células o sujetos. Por ejemplo, un genotipo incluye las mutaciones y/o alelos particulares (por ejemplo, polimorfismos, tales como polimorfismos mononucleotídicos [SNP] o similares) presentes en un locus dado o distribuidos en un genoma.

«Polimerasa de ácidos nucleicos» se refiere a una enzima que cataliza la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico. Los ejemplos de polimerasas de ácidos nucleicos incluyen ADN-polimerasas, ARN-polimerasas, transferasas terminales, transcriptasas inversas, telomerasas y similares.

45 «Enzima termoestable» se refiere a una enzima que es estable (es decir, resiste a la degradación o desnaturalización) y retiene suficiente actividad catalítica cuando se somete a temperaturas elevadas durante periodos de tiempo seleccionados. Por ejemplo, una polimerasa termoestable retiene suficiente actividad para efectuar reacciones subsiguientes de extensión del cebador, cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para desnaturalizar ácidos nucleicos bicatenarios. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de ácidos nucleicos son bien conocidas en la técnica, y se ejemplifican en las patentes de EE. UU. n.º 4.683.202 y 4.683.195. Como se usa en el presente documento, una polimerasa termoestable es típicamente adecuada para su uso en una reacción de ciclos de temperatura, tal como la reacción en cadena de la polimerasa («PCR»). Los ejemplos de polimerasas de ácidos nucleicos termoestables incluyen ADN-polimerasa Taq deaislada de *Thermus aquaticus*, polimerasa de *Thermus sp.* Z05, polimerasa aislada de *Thermus flavus*, polimerasas aisladas de *Thermotoga maritima* tales como las polimerasas TMA-25 y TMA-30, ADN-polimerasa Tth y similares.

Enzima «modificada» se refiere a una enzima que comprende un polímero de aminoácidos en el que al menos un monómero difiere de la secuencia de referencia, tal como una forma nativa o natural de la enzima u otra forma modificada de la enzima. Las modificaciones ejemplares incluyen inserciones, deleciones y sustituciones de monómeros. Las enzimas modificadas también incluyen enzimas químicas que tienen secuencias de componentes identificables (por ejemplo, dominios estructurales o funcionales, etc.) derivadas de dos o más enzimas originales. También se incluyen en la definición de enzimas modificadas aquellas que comprenden modificaciones químicas de la secuencia de referencia. Los ejemplos de polimerasas modificadas incluyen ADN-polimerasa G46E E678G CS5, ADN-polimerasa G46E L329A E678G CS5, ADN-polimerasa G46E L329A D640G S671F CS5, ADN-polimerasa G46E L329A D640G S671F E678G CS5, ADN-polimerasa G46E E678G CS6, ADN-polimerasa Z05, polimerasa  $\Delta$ Z05, polimerasa  $\Delta$ Z05-Gold, polimerasa  $\Delta$ Z05R, ADN-polimerasa E615G Taq, polimerasa TMA-25 E678G, polimerasa E678G TMA-30 y similares.

El término «actividad nucleasa 5' a 3'» o «actividad nucleasa 5'-3'» se refiere a una actividad de una polimerasa de ácidos nucleicos, típicamente asociada a la síntesis de las hebras de ácido nucleico, por la que los nucleótidos se eliminan del extremo 5' de la hebra de ácido nucleico; por ejemplo, la ADN polimerasa I aislada de *E. coli* tiene esta actividad, mientras que el fragmento Klenow no la tiene.

Una polimerasa que «carece sustancialmente de la actividad nucleasa 5'-3'» se refiere a una polimerasa que tiene una actividad nucleasa 5'-3' del 50 % o menos (por ejemplo, <25 %, <20 %, <15 %, <10 % que la ADN polimerasa Taq. Los procedimientos de medición de la actividad nucleasa 5'-3' y las condiciones para la medición son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.466.591. Los ejemplos de ADN-polimerasas que carecen sustancialmente de actividad nucleasa 5' a 3' incluyen el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I aislada de *E. coli*; una ADN -polimerasa aislada de *Thermus aquaticus* (Taq) que carece de los 235 aminoácidos N-terminales (por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.616.494 y comúnmente conocida en la técnica como el «fragmento Stoffel»). Otros ejemplos incluyen una ADN-polimerasa termoestable que tiene suficientes deleciones (por ejemplo, deleciones N-terminales), mutaciones o modificaciones para eliminar o inactivar el dominio responsable de la actividad nucleasa 5'-3'. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.795.762.

El término «actividad nucleasa 3' a 5'» o «actividad nucleasa 3'-5'» o «actividad de corrección» se refiere a una actividad de una polimerasa de ácidos nucleicos por la que los nucleótidos se eliminan del extremo 3' de la hebra de ácido nucleico. Por ejemplo, la ADN polimerasa III aislada de *E. coli* tiene esta actividad, mientras que la ADN polimerasa aislada de *Thermus aquaticus* (Taq) no la tiene.

«Fidelidad» o «fidelidad de replicación» es la capacidad de una polimerasa de ácidos nucleicos de incorporar un nucleótido correcto durante la polimerización dependiente de plantilla. En el contexto de la fidelidad de replicación, el «nucleótido correcto» en la hebra nucleotídica naciente es el nucleótido apareado con el nucleótido plantilla a través del apareamiento de bases de Watson-Crick. La fidelidad de replicación de una polimerasa particular es el resultado de una combinación de incorporar nucleótidos correctos y eliminar nucleótidos incorrectos del extremo 3' de la hebra de nucleótidos naciente a través de la actividad nucleasa 3'-5' de la polimerasa. Se revisan diversos procedimientos para medir la fidelidad de una polimerasa de nucleótidos en Tindall et al. (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27:6008-6013. Típicamente, las polimerasas con capacidad nucleasa 3'-5' (con actividad de corrección) tienen mayor fidelidad que las polimerasas sin la actividad de corrección.

«Marcador» se refiere a un resto unido (covalentemente o no covalentemente) a una molécula y capaz de proporcionar información sobre la molécula. Los marcadores ejemplares incluyen marcadores fluorescentes, marcadores colorimétricos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, marcadores radioactivos, grupos modificadores de masa, anticuerpos, antígenos, biotina, haptenos y enzimas (incluyendo peroxidasa, fosfatasa, etc.).

«Inicio en caliente», en el contexto de una reacción de amplificación de ácido nucleico, se refiere a un protocolo en el que al menos un reactivo crítico se retiene de la mezcla de reacción (o, si está presente en la mezcla de reacción, el reactivo permanece inactivo) hasta que la temperatura se eleva suficientemente para proporcionar la especificidad de hibridación necesaria del cebador o cebadores. Una «enzima de inicio en caliente» es una enzima, típicamente una polimerasa de ácidos nucleicos, capaz de actuar como el reactivo «retenido» o inactivo en un protocolo de inicio en caliente.

«Apareamiento de bases de Watson-Crick» o simplemente «apareamiento de bases» se refiere a enlaces de hidrógeno «convencionales» dentro de una molécula de ácido nucleico bicatenario. El apareamiento de bases de Watson-Crick es el enlace de hidrógeno entre la adenina y la timina, entre la guanina y la citosina, entre la adenina y el uracilo, y entre los análogos de estas bases.

Un «nucleótido selectivo» es un nucleótido en un cebador específico de alelo que confiere selectividad por el alelo al cebador. El nucleótido selectivo es complementario de un nucleótido correspondiente en la variante deseada de los ácidos nucleicos diana, pero no complementario del nucleótido correspondiente en las variantes no deseadas del ácido nucleico diana. En un cebador, más de un nucleótido puede ser complementario de un nucleótido en las variantes deseadas de los ácidos nucleicos diana, pero no complementario del nucleótido correspondiente en las variantes no deseadas del ácido nucleico diana. Sin embargo, el nucleótido selectivo se localiza en una posición



dentro del cebador que afecta a la especificidad del cebador. El nucleótido selectivo permite una amplificación eficiente o ineficiente del ácido nucleico diana, dependiendo de si encuentra o no encuentra un nucleótido complementario en el ácido nucleico diana. Un cebador puede contener más de un nucleótido selectivo.

5 La expresión «en la que dicha polimerasa es capaz de extender eficientemente dicho segundo oligonucleótido cuando dicho segundo oligonucleótido hibrida con una variante de la secuencia diana que es complementaria de al menos un nucleótido selectivo, y sustancialmente menos eficientemente cuando dicho segundo oligonucleótido hibrida con una variante de la secuencia diana que no es complementaria de al menos un nucleótido selectivo» significa que la extensión del segundo oligonucleótido por la polimerasa es más eficiente cuando el nucleótido selectivo forma un par de bases con la diana que cuando dicho nucleótido selectivo no forma un par de bases con la  
10 diana.

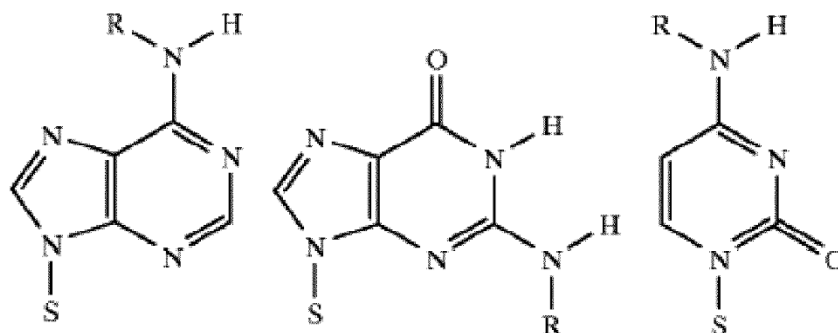
Como se ha mencionado anteriormente, en un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de amplificación específica de alelo que comprende (a) proporcionar una muestra, que posiblemente contiene al menos una variante de una secuencia diana; (b) proporcionar un primer oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de más de una variante de la secuencia diana; (c) proporcionar un segundo oligonucleótido, al  
15 menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana, que tiene un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana; en el que dicho segundo oligonucleótido comprende tanto un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico como un fosfato modificado; (d) proporcionar condiciones adecuadas para la hibridación de dichos oligonucleótidos primero y segundo con al menos una variante de la secuencia diana; (e) proporcionar condiciones adecuadas para la  
20 extensión de los oligonucleótidos mediante una polimerasa de ácidos nucleicos; en el que dicha polimerasa es capaz de extender dicho segundo oligonucleótido cuando hibrida con la variante de la secuencia diana para la que tiene dicho nucleótido selectivo complementario y sustancialmente menos cuando dicho segundo oligonucleótido hibrida con la variante de la secuencia diana para la que tiene un nucleótido selectivo no complementario.

El segundo oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana, que tiene un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana, se conoce como  
25 «oligonucleótido selectivo», «cebador selectivo» o «cebador selectivo de alelo». El oligonucleótido selectivo de la presente invención comprende 10-50, más preferentemente 15-35 nucleótidos, la mayoría de ellos complementarios de una secuencia en más de una variante de la secuencia diana. El nucleótido selectivo del oligonucleótido es complementario de una variante de la secuencia diana que ha de ser amplificada y no complementario de otras  
30 variantes. En un modo de realización, el nucleótido selectivo es el nucleótido del extremo 3'. El oligonucleótido selectivo de la presente invención incluye uno o más nucleótidos con una base, modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico. En algunos modos de realización, el nucleótido con una base modificada aparece entre 1 y 5 nucleótidos en dirección 5' del nucleótido del extremo 3' (también designado como posiciones -1, -2, -3, -4, -5 o N-1, N-2, N-3, N-4, N-5 en el presente documento). En otros modos de realización, el nucleótido con una base  
35 modificada es el nucleótido del extremo 3'. En algunos modos de realización, el nucleótido con una base modificada aparece tanto en el extremo 3' como al menos una vez más, en otra parte del oligonucleótido.

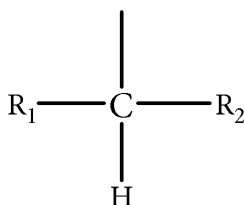
Los nucleótidos con modificaciones covalentes de los grupos amino exocíclicos se han descrito en la patente de EE. UU. n.º 6.001.611, ('611). La síntesis de dichos nucleótidos y los oligonucleótidos que incorporan dichos nucleótidos se describen también en la patente '611.

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

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



en las que S representa el resto azúcar y R representa el grupo modificador. Se prevé una variedad de grupos modificadores que posean las cuatro propiedades resumidas anteriormente. En ciertos modos de realización, los grupos modificadores tienen la estructura:



5

en la que  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alcoxi, arilo y fenoxi no sustituidos o sustituidos.

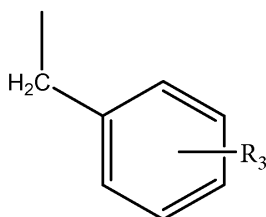
Los grupos alquilo pueden ser ramificados o no ramificados

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

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

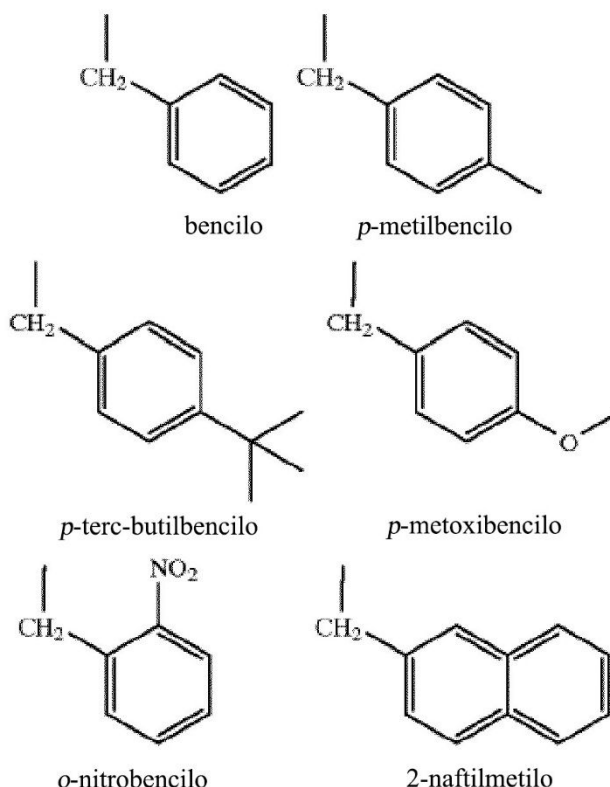
Arilo puede ser fenilo o naftilo no sustituido o sustituido.

En un modo de realización, R es un grupo bencilo o un grupo bencilo sustituido. En ciertos modos de realización, los grupos bencilo sustituidos pueden tener la siguiente estructura:



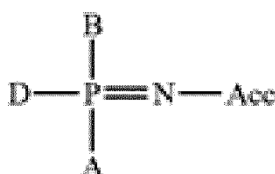
15 en la que  $R_3$  representa un grupo alquilo  $C_1$ - $C_6$  ramificado o no ramificado, más preferentemente un grupo alquilo  $C_1$ - $C_4$  ramificado o no ramificado, un grupo alcoxi o un grupo nitro. Preferentemente,  $R_3$  está unido en la posición para.

En algunos modos de realización, los grupos modificadores están representados por estructuras mostradas a continuación:



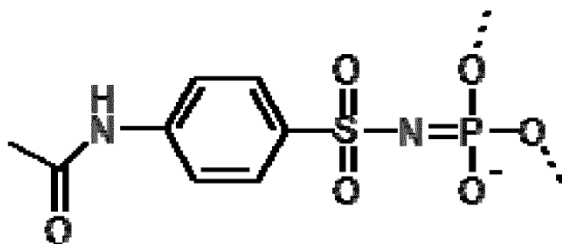
5 En general, la selección empírica de un grupo modificador adecuado particular de la clase de compuestos descritos en el presente documento puede llevarse a cabo rutinariamente por un experto en la técnica, basándose en la presencia de las cuatro propiedades enumeradas anteriormente. Preferentemente, la idoneidad de un grupo particular se determina empíricamente usando los cebadores con nucleótidos modificados en una reacción de amplificación específica de alelo. La idoneidad de la modificación se indica por el aumento de la selectividad de la reacción utilizando un cebador con la modificación de las bases, cuando se compara con una reacción idéntica con un cebador no modificado.

10 La síntesis y el uso de residuos de fosfato modificados se han descrito en la patente de EE. UU. n.º 7.741.472 ('472). Un átomo de fósforo que contiene al menos un residuo hidroxilo se hace reaccionar con una azida que tiene la estructura N=N-N-Acc, en la que Acc es un aceptor de electrones o un aceptor de electrones sustituido con un residuo R y R es cualquier sustituyente orgánico. En el ejemplo de un fosfato modificado tiene la estructura:



15 en la que A y B representan una cadena de nucleótidos, D es OH o CH<sub>3</sub> y Acc se selecciona del grupo que consiste en CN, SO<sub>2</sub>-R', en el que R' comprende al menos un alquilo aminosustituido, un arilo opcionalmente sustituido o un heterociclo opcionalmente sustituido y un heterociclo N<sup>+</sup> de seis miembros con al menos un átomo de N alquilado en posición orto o para, estando dicho heterociclo seleccionado del grupo que consiste en piridinio, pirimidinio y quinolinio.

20 Los oligonucleótidos que contienen dichos residuos de fosfato modificados se pueden usar para hibridar con ADN y ARN naturales y funcionan como sondas o cebadores en reacciones de amplificación tales como PCR en tiempo real. Un modo de realización de un fosfato modificado tiene la estructura:



y se cita en la patente '472 como P(=NSO<sub>2</sub>PhNHAc) o pABSA. Otros modos de realización de fosfatos modificados descritos en la patente '472 incluyen P=pPh-NAC, P(=N-SO<sub>2</sub>-Ph-p-N=N-Ph-p-NMe<sub>2</sub>) y P=NS(O)<sub>2</sub>-rodamina B. La PCR en tiempo real y el análisis de la curva de fusión sobre el uso de cebadores de oligonucleótidos que incorporan estos fosfatos modificados también se han descrito en la patente '472.

El cebador específico de alelo de la presente invención puede incorporar diversos aspectos del diseño de cebadores conocidos en la técnica. Por ejemplo, el cebador puede adoptar la forma de una combinación de cebador-sonda unimolecular denominada « Scorpions» y descrita en Whitcombe et al., (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence, Nature Biotech. 17:804-807. El cebador Scorpions diseñado de acuerdo con la presente invención incorpora los elementos típicos del Scorpions, a saber, una porción de sonda, una porción de horquilla y una porción de cebador. Además, en un Scorpions diseñado de acuerdo con la presente invención, la porción de cebador tiene un extremo 3' complementario de la posición de la variante. La porción de cebador en un Scorpions diseñado de acuerdo con la presente invención contiene uno o más nucleótidos de bases modificadas y uno o más fosfatos modificados como se describe en el presente documento.

En algunos modos de realización de la invención, la amplificación implica la reacción en cadena de la polimerasa, es decir, ciclos repetidos de desnaturalización de la plantilla, reasociación (hibridación) del cebador oligonucleotídico con la plantilla y extensión del cebador por la polimerasa de ácidos nucleicos. En algunos modos de realización, la reasociación y la extensión ocurren en la misma etapa de temperatura.

En algunos modos de realización, la reacción de amplificación implica un protocolo de inicio en caliente. En el contexto de la amplificación específica de alelo, la selectividad de los cebadores específicos de alelo con respecto a la diana con emparejamientos erróneos se puede potenciar mediante el uso de un protocolo de inicio en caliente. Se conocen en la técnica muchos protocolos de inicio en caliente, por ejemplo, el uso de cera, la separación de los reactivos críticos del resto de la mezcla de reacción (patente de EE. UU. n.º 5.411.876), el uso de una polimerasa de ácidos nucleicos inactivada reversiblemente por un anticuerpo (patente de EE.UU. n.º 5.338.671), una polimerasa de ácidos nucleicos inactivada reversiblemente por un oligonucleótido que está diseñado para unirse específicamente a su sitio activo (patente de EE. UU. n.º 5.840.867) o el uso de una polimerasa de ácidos nucleicos con modificaciones químicas reversibles como se describe, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.677.152 y 5.773.528.

En algunos modos de realización de la invención, el ensayo de amplificación específico de alelo es el ensayo de PCR en tiempo real. En un ensayo de PCR en tiempo real, la medida de amplificación es los «ciclos hasta el umbral» o valor de Ct. Un valor de Ct más temprano refleja la consecución rápida del nivel umbral y, por tanto, una amplificación más eficiente. El valor de Ct tardío puede reflejar una amplificación ineficiente o inhibida. En el contexto de un ensayo de PCR en tiempo real específico de alelo, la diferencia en los valores de Ct entre las plantillas con emparejamientos correctos y con emparejamientos erróneos es una medida de la discriminación entre los alelos o la selectividad del ensayo.

El ensayo de amplificación específico de alelo puede emplear cualquier polimerasa de ácidos nucleicos adecuada conocida en la técnica. Para un ensayo de PCR específico de alelo, se puede usar cualquier polimerasa de ácidos nucleicos termoestable. A veces es deseable usar una enzima sin la actividad de corrección (3'-5'-exonucleasa), tal como, por ejemplo, la ADN-polimerasa Taq. También puede ser deseable usar enzimas, sustancial o totalmente carentes de la actividad nucleasa 5'-3', tal como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.795.762. Un ejemplo de dicha enzima es la polimerasa ΔZ05. A veces puede ser deseable tener una enzima con capacidad de «inicio en caliente», tal como las enzimas modificadas de forma reversible descritas en las patentes de EE. UU. n.º 5.677.152 y 5.773.528. Un ejemplo de una enzima de inicio en caliente es la polimerasa ΔZ05-Gold.

La detección de los productos de amplificación puede realizarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Estos procedimientos incluyen el uso de cebadores y sondas marcados, así como diversos colorantes de unión a ácidos nucleicos. Los medios de detección pueden ser específicos de una variante de la secuencia diana, o pueden ser genéricos para todas las variantes de la secuencia diana o incluso para todos los ADN bicatenarios. Pueden usarse los procedimientos de detección inespecíficos cuando la amplificación de las variantes no deseadas de la diana sea mínima y se espera que caiga por debajo del límite de detección del procedimiento.

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. De forma alternativa, los productos de amplificación pueden llevar un marcador radioactivo o químico, ya sea en virtud de incorporación durante la síntesis o en virtud de ser los productos de extensión de un cebador marcado. Después de la electroforesis o durante la misma, los productos de amplificación marcados pueden detectarse con herramientas radiológicas o químicas adecuadas conocidas en la técnica. Después de la electroforesis, el producto también puede detectarse con una sonda específica de la diana marcada por cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica. La sonda marcada también se puede aplicar a la diana sin electroforesis, es decir, en un ensayo de «transferencia puntiforme» o similar.

En otros modos de realización, la presencia del producto de amplificación puede detectarse en un ensayo homogéneo, es decir, un ensayo en el que el producto naciente se detecta durante los ciclos de amplificación, o al menos en el mismo tubo sin abrir, y no se requiere manipulación posterior a la amplificación. Un ensayo de amplificación homogéneo se ha descrito, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.210.015. El ensayo de amplificación homogéneo usando colorantes intercalantes de ácidos nucleicos se ha descrito, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.871.908 y 6.569.627. El ensayo homogéneo también puede emplear sondas fluorescentes marcadas con dos fluoróforos que interactúan, tales como sondas de tipo «baliza molecular» (Tyagi et al., (1996) *Nat. Biotechnol.*, 14:303-308) o sondas de nucleasa marcadas con fluorescencia (Livak et al., (1995) *PCR Meth. Appl.*, 4:357-362). En ciertas variaciones de estas tecnologías, también se puede identificar un producto de amplificación en virtud de su temperatura de fusión distintiva; véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.871.908 y 6.569.627. Los productos de amplificación también pueden detectarse usando una combinación de cebador-sonda unimolecular denominada «Scorpions». Whitcombe et al., (1999) *Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence*, *Nature Biotech.* 17:804-807. La porción de cebador del oligonucleótido de Scorpions puede ser un cebador específico de alelo diseñado de acuerdo con la presente invención.

En otro aspecto, la invención proporciona una mezcla de reacción que se usará para amplificar de forma específica o selectiva una variante seleccionada de la secuencia diana, que comprende un primer oligonucleótido al menos parcialmente complementario de más de una variante de la secuencia diana, un segundo oligonucleótido al menos parcialmente complementario de más de una variante de la secuencia diana, pero que tiene un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana, en la que dicho segundo oligonucleótido incluye tanto al menos un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico como al menos un fosfato modificado, y también un ácido nucleico diana, que se sabe que existe en más de una variante de secuencia. En algunos modos de realización, la mezcla de reacción comprende, además, los reactivos y soluciones generalmente necesarios para la amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo una polimerasa de ácidos nucleicos, precursores de ácidos nucleicos, es decir, trifosfatos de nucleósidos, e iones orgánicos e inorgánicos, adecuados para el soporte de la actividad de la polimerasa de ácidos nucleicos.

En otro aspecto, la invención proporciona kits que se usarán para llevar a cabo la amplificación específica de alelo de acuerdo con la invención. El kit generalmente incluye componentes específicos del ensayo, así como componentes generalmente requeridos para realizar ensayos de amplificación de ADN. Como componentes específicos del ensayo, el kit de amplificación específico de alelo de la presente invención incluye típicamente un primer oligonucleótido al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y un segundo oligonucleótido al menos parcialmente complementario de más de una variante de la secuencia diana, que tiene un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana y que tiene también tanto al menos un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico como al menos un fosfato modificado, y opcionalmente una secuencia de ácidos nucleicos de control que comprende una cantidad de al menos una variante de la secuencia diana de control, al menos parcialmente complementaria de los oligonucleótidos incluidos en el kit. En algunos modos de realización, puede incluirse más de una variante de la secuencia de ácidos nucleicos de control. En ciertos modos de realización, entre las varias variantes de la secuencia de ácidos nucleicos de control incluidas en el kit, al menos una variante es complementaria del nucleótido selectivo del oligonucleótido selectivo de alelo. Como componentes generalmente requeridos para la amplificación de ácidos nucleicos, el kit de la presente invención incluye típicamente uno o más de una polimerasa de ácidos nucleicos, precursores de ácidos nucleicos tales como trifosfatos de nucleósidos (trifosfatos de desoxirribonucleósidos o trifosfatos de ribonucleósidos), opcionalmente, una pirofosfatasa, para minimizar la pirofosforólisis de ácidos nucleicos, una uracilo N-glicosilasa (UNG) para la protección frente a la contaminación por arrastre de las reacciones de amplificación, reactivos y tampones previamente preparados necesarios para la reacción de amplificación y la detección, y un conjunto de instrucciones para llevar a cabo la amplificación específica de alelo de la presente invención.

En otro aspecto más, la invención proporciona un oligonucleótido para uso en la PCR específica de alelo. Un oligonucleótido típico para uso en la PCR específica de alelo de la presente invención comprende 10-50, más preferentemente 15-35 nucleótidos, la mayoría de ellos complementarios de una secuencia en más de una variante de la secuencia diana. Sin embargo, el nucleótido selectivo del oligonucleótido es complementario de una variante de la secuencia diana y no complementario de otras variantes. Además, el oligonucleótido de la presente invención incluye tanto al menos un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico como un fosfato modificado. En algunos modos de realización, el nucleótido con una base modificada aparece en el nucleótido del extremo 3'. En otros modos de realización, el nucleótido con una base modificada aparece entre las

posiciones 1 y 5, o por ejemplo 1, 2 o 3 nucleótidos en dirección 5' del nucleótido del extremo 3'. En algunos modos de realización, el nucleótido con una base modificada aparece tanto en el extremo 3' como en otras partes del oligonucleótido.

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

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

#### Cebadores para detectar la mutación G719S en el gen EGFR humano

10 Las reacciones de amplificación mostradas a continuación se llevaron a cabo usando una sonda de detección (SEQ ID NO: 2) y un cebador directo (SEQ ID NO: 1) comunes a dianas tanto naturales como mutantes. El cebador inverso en cada reacción se muestra en la tabla 1 como: SEQ ID NO: 3, un cebador común a la diana tanto mutante como natural; o SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, cebadores que se están emparejados correctamente con la secuencia diana mutante G719S y emparejados erróneamente con la diana natural en la posición de la base del extremo 3'.

15 Las dianas usadas en estas reacciones son o bien la mezcla de ADN genómico natural humano (proporcionada por Clontech) o una construcción plasmídica mutante que contiene un inserto de la secuencia G719S de 500 pb en un vector plasmídico pUC19 (proporcionada por IDT como un minigen).

20 El ADN mutante o natural se amplificó en reacciones que consistieron en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), cloruro de potasio 80 mM, dATP 160 μM, dCTP 160 μM, dGTP 160 μM, dUTP 320 μM, 0,1 μM tanto de cebador selectivo como del común, sonda 0,05 μM, aptámero NTQ21-46A 200 nM, polimerasa mutante Z05-D 40 nM, 10 unidades de Z05 y EDTA 0,1 mM, DMSO al 1,25 %, glicerol al 2,11 % y acetato de magnesio 2,5 mM. Las dianas mutantes o naturales estaban presentes a concentraciones iniciales de aproximadamente 40 000 copias por reacción.

25 La amplificación y el análisis se realizaron usando el instrumento LightCycler 480. Las reacciones se sometieron a termociclación usando el siguiente perfil: los 5 minutos iniciales se mantienen a 50 °C, seguidos por 2 ciclos de 95 °C (10 segundos) a 62 °C (30 segundos) y 80 ciclos de 93 °C (10 segundos) a 62 °C (30 segundos). Los datos de fluorescencia se recogieron al inicio de cada etapa de reasociación a 62 °C durante la PCR de 80 ciclos.

30 Se demostró que los cebadores modificados con pABSA, de SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, son más discriminantes que el cebador no modificado con pABSA (SEQ ID NO: 4). Además, el cebador que contiene tanto N<sup>4</sup>-para-*terc*-butilbencilcitosina (tbbdC) como pABSA, SEQ ID NO: 7, mostró la mayor discriminación. La discriminación se mide como una función del delta de Ct entre la amplificación de la diana mutante frente a la natural de igual número de copias (40 000 c). Un mayor delta de Ct se interpreta como una mayor discriminación de la amplificación entre los alelos mutante y natural.

Tabla 1

SEQ ID NO:	Secuencia	MUT Ct	WT Ct	Delta Ct
1	AGCCTCTTACACCCAGTGGAGAA Cebador común directo			
2	EAGCTCTCTTGQAGGATCTTGAAGGAACTGAATTP E = Treoninol-Hex, Q = BHQ-2, P = fosfato Sonda de detección común			
3	CCAGACCATGAGAGGCCCTG Cebador común inverso	33,7	30,3	-3,4
4	TGTCGAACGCACCGGAGCT Cebador mutante inverso no modificado con introducción de emparejamiento erróneo de T:G cerca del extremo 5'	21,6	30,5	8,9
5	GTGCCGAACGCACCGGA-GCT Cebador mutante inverso modificado con pABSA Modificación con pABSA entre el 3. <sup>er</sup> y el 4. <sup>o</sup> nucleótido desde el extremo 3'	22	32,2	10,2
6	GTGCCGAACGCACCGGA-GIT Cebador mutante inverso modificado con pABSA con introducción de emparejamiento erróneo de T:G cerca del extremo 3' Modificación con pABSA entre el 3. <sup>er</sup> y el 4. <sup>o</sup> nucleótido desde el extremo 3'	24,8	42,0	17,2

7	GTGCCGAACGCACCGGFGC-T Cebador mutante inverso modificado con pABSA F = tbbdC (también un emparejamiento erróneo de C:T introducido) Modificación con pABSA entre el 1. <sup>er</sup> y el 2. <sup>o</sup> nucleótido desde el extremo 3'	34,9	61,5	26,6
8	GTGCCGAACGCACCGGAGC-T Cebador mutante inverso modificado con pABSA Modificación con pABSA entre el 1. <sup>er</sup> y el 2. <sup>o</sup> nucleótido desde el extremo 3'	22,6	36,6	14,0

**Ejemplo 2**Cebadores para detectar la mutación L858R en el gen EGFR humano

Las reacciones de amplificación mostradas a continuación se llevaron a cabo usando una sonda de detección (SEQ ID NO: 10) y un cebador directo (SEQ ID NO: 9) comunes a dianas tanto naturales como mutantes. El cebador inverso en cada reacción es: SEQ ID NO: 11, un cebador común a la diana tanto mutante como natural, o SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16, 17, cebadores que están emparejados correctamente con la secuencia diana mutante L858R y emparejados erróneamente con la diana natural en la posición de la base del extremo 3'.

Las dianas usadas en estas reacciones son o bien la mezcla de ADN genómico natural humano (proporcionada por Clontech) o una construcción plasmídica mutante que contiene un inserto de la secuencia L858R de 500 pb en un vector plasmídico pUC19 (proporcionada por IDT como un minigen).

El ADN mutante o natural se amplificó en reacciones que consistieron en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), cloruro de potasio 80 mM, dATP 160 μM, dCTP 160 μM, dGTP 160 μM, dUTP 320 μM, 0,1 μM tanto de cebador selectivo como del común, sonda 0,05 μM, aptámero NTQ21-46A 200 nM, polimerasa mutante Z05-D 40 nM, 10 unidades de Z05 y EDTA 0,1 mM, DMSO al 1,25 %, glicerol al 2,11 % y acetato de magnesio 2,5 mM. Las dianas mutantes o naturales estaban presentes a concentraciones iniciales de aproximadamente 40 000 copias por reacción.

La amplificación y el análisis se realizaron usando el instrumento LightCycler 480. Las reacciones se sometieron a termociclación usando el siguiente perfil: los 5 minutos iniciales se mantienen a 50 °C, seguidos por 2 ciclos de 95 °C (10 segundos) a 62 °C (30 segundos) y 80 ciclos de 93 °C (10 segundos) a 62 °C (30 segundos). Los datos de fluorescencia se recogieron al inicio de cada etapa de reasociación a 62 °C durante la PCR de 80 ciclos.

Se demostró que los cebadores modificados con pABSA, de SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17 son más discriminantes que el cebador no modificado con pABSA (SEQ ID NO: 12). Además, los cebadores que contienen tanto N4-etil-citosina como pABSA (SEQ ID NO: 13, 14) mostraron la mayor discriminación. La discriminación se mide como una función del delta de Ct entre la amplificación de la diana mutante frente a la natural de igual número de copias (40 000 c). Un mayor delta de Ct se interpreta como una mayor discriminación entre los alelos mutante y natural.

Tabla 2

SEQ ID NO:	Secuencia	MUT Ct	WT Ct	Delta Ct
9	GTCTTCTCTGTTTCAGGGCATGAAC Cebador directo común			
10	FTACTGGTGAAQAACACCGCAGCATGTP Sonda de detección común F = treoninol Fam, Q = BHQ-2, P = fosfato			
11	CTGGTCCCTGGTGTTCAGGAAAA Cebador común inverso	22,9	23	0,1
12	GCGCCAGCAGTTTGGCCC Cebador mutante inverso Con emparejamiento erróneo de G:T introducido cerca del extremo 5'	22,2	26,3	4,1
13	GCACCCAGCAGTTTG-GJAC Modificación con pABSA entre el 4. <sup>o</sup> y el 5. <sup>o</sup> nucleótido desde el extremo 3' J = N4-etil-dC, con emparejamiento erróneo de AG introducido cerca del extremo 3'	28,7	41	12,3
14	GCACCCAGCAGTTTGGJA-C Modificación con pABSA entre la 1. <sup>a</sup> y 2. <sup>a</sup> base, J = N4-etil-dC, con emparejamiento erróneo de AG introducido cerca del extremo 3'	32,7	41,5	8,8

15	GCACCCAGCAGTTTGG-CCC Modificación con pABSA entre el 3. <sup>er</sup> y el 4. <sup>o</sup> nucleótido desde el extremo 3'	22,7	28,5	5,8
16	GCACCCAGCAGTTTGGC-CC Modificación con pABSA entre el 2. <sup>o</sup> y el 3. <sup>er</sup> nucleótido desde el extremo 3'	22,8	30,5	7,7
17	GCACCCAGCAGTTTGGCC-C Modificación con pABSA entre el 1. <sup>er</sup> y 2. <sup>o</sup> nucleótido desde el extremo 3'	23,8	34,6	10,8

### Ejemplo 3

#### Cebadores para detectar la mutación T790M en el gen EGFR humano

5 Las reacciones de amplificación mostradas a continuación se llevaron a cabo usando una sonda de detección (SEQ ID NO: 19) y un cebador directo (SEQ ID NO: 18), comunes a dianas tanto naturales como mutantes. El cebador inverso en cada reacción es: SEQ ID NO: 20, un cebador común a la diana tanto mutante como natural, o SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, 25, cebadores que están emparejados correctamente con la secuencia diana mutante T790M y emparejados erróneamente con la diana natural en la posición de la base del extremo 3'.

10 Las dianas usadas en estas reacciones son o bien la mezcla de ADN genómico natural humano (proporcionada por Clontech) o una construcción plasmídica mutante que contiene un inserto de la secuencia de T790M de 500 pb en un vector plasmídico pUC19 (proporcionada por IDT como un minigen).

15 El ADN mutante o natural se amplificó en reacciones que consistieron en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), cloruro de potasio 80 mM, dATP 160 μM, dCTP 160 μM, dGTP 160 μM, dUTP 320 μM, 0,1 μM tanto de cebador selectivo como del común, sonda 0,05 μM, aptámero NTQ21-46A 200 nM, polimerasa mutante Z05-D 40 nM, 10 unidades de Z05 y EDTA 0,1 mM, DMSO al 1,25 %, glicerol al 2,11 % y acetato de magnesio 2,5 mM. Las dianas mutantes o naturales estaban presentes a concentraciones iniciales de aproximadamente 40 000 copias por reacción.

La amplificación y el análisis se realizaron usando el instrumento LightCycler 480. Las reacciones se sometieron a termociclación usando el siguiente perfil: los 5 minutos iniciales se mantienen a 50 °C, seguidos por 2 ciclos de 95 °C (10 segundos) a 62 °C (30 segundos) y 80 ciclos de 93 °C (10 segundos) a 62 °C (30 segundos). Los datos de fluorescencia se recogieron al inicio de cada etapa de reasociación a 62 °C durante la PCR de 80 ciclos.

20 Se demostró que los cebadores modificados con pABSA, de SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, son más discriminantes que el cebador no modificado con pABSA (SEQ ID NO: 21). Además, el cebador que contenía tanto tbbdC como pABSA (SEQ ID NO: 22) mostró la mayor discriminación. La discriminación se mide como una función del delta de Ct entre la amplificación de la diana mutante frente a la natural de igual número de copias (40 000 c). Un mayor delta de Ct se interpreta como una mayor discriminación entre los alelos mutante y natural.

#### 25 Tabla 3

Seq No.	Secuencia	MUT Ct	WT Ct	Delta Ct
18	CCTCCCTCCAGGAAGCCTACGTGA Cebador directo común			
19	ITGCACGGTGGAGGTQGAGGCAGP Sonda de detección común J = Ja-270, Q = BHQ-2, P = fosfato			
20	TGCGATCTGCACACACCAGTTGA Cebador inverso común	24,12	25,99	1,87
21	CAGTCGAAGGGCATGAGCTGCA Cebador mutante inverso Emparejamiento erróneo de T:G introducido cerca del extremo 5'	23,5	30,75	7,25
22	CAGCCGAAGGGCATGAGC-TGEA Modificación con pABSA entre el 4. <sup>o</sup> y el 5. <sup>o</sup> nucleótido desde el extremo 3' E = tbbdC	30,36	51,1	20,74
23	CAGCCGAAGGGCATGAGC-TGCA Modificación con pABSA entre el 4. <sup>o</sup> y el 5. <sup>o</sup> nucleótido desde el extremo 3'	24,62	34,98	10,36



ES 2 627 523 T3

24	CAGCCGAAGGGCATGAGCTGC-A Modificación con pABSA entre el 1. <sup>er</sup> y 2. <sup>o</sup> nucleótido desde el extremo 3'	26,14	41,39	15,25
25	CAGCCGAAGGGCATGAGCGGC-A Modificación con pABSA entre el 1. <sup>er</sup> y 2. <sup>o</sup> nucleótido desde el extremo 3' con emparejamiento erróneo de G:A introducido cerca del extremo 3'	29,23	45,65	16,42

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH

5 F. Hoffmann-La Roche AG

<120> CEBADORES CON FOSFATO Y BASE MODIFICADOS EN PCR ESPECÍFICA DE ALELO

<130> 31353 WO-KOE

10

<150> 61/736.742

<151> 13-12-2012

<160> 25

15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 23

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

25

<400> 1

agcctcttac acccagtgga gaa

<210> 2

<211> 33

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda sintética

10

<220>

<221> misc\_feature

<223> 5' HEX

15 <220>

<221> misc\_feature

<223> Fosfato 3'

<220>

20 <221> misc\_feature

<222> (10)..(11)

<223> Colorante BHQ-2 entre bases

<400> 2

25 agctctcttg aggatcttga aggaaactga att

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

5

<400> 3

ccagaccatg agaggccctg

<210> 4

10 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador sintético

<400> 4

tgtcgaacgc accggagct

20 <210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Cebador sintético

<220>

<221> misc\_feature

<222> (17).. (18)

<223> Modificación con pABSA entre bases

<400> 5

5 gtgccgaacg caccggagct

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

15 <220>

<221> misc\_feature

<222> (17).. (18)

<223> Modificación con pABSA entre bases

20 <400> 6

gtgccgaacg caccggagtt

<210> 7

<211> 20

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<220>

<221> modified\_base

<222> (17)..(17)

5 <223> tbbdC

<220>

<221> misc\_feature

<222> (19)..(20)

10 <223> Modificación con pABSA entre bases

<400> 7

gtgccgaacg caccggcgct

15 <210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cebador sintético

<220>

<221> misc\_feature

25 <222> (19)..(20)

<223> Modificación con pABSA entre bases

<400> 8

gtgccgaacg caccggagct

<210> 9

<211> 25

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

10 <400> 9

gtctttctctg tttcagggca tgaac

<210> 10

<211> 25

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda sintética

20

<220>

<221> misc\_feature

<223> 5' FAM

25 <220>

<221> misc\_feature

<223> fosfato 3'

<220>

<221> misc\_feature

<222> 10.. (11)

<223> BHQ-2 entre bases

5 <220>

<221> misc\_feature

<222> 10.. (11)

<223> Colorante BHQ-2 entre bases

10 <400> 10

tactggtgaa aacaccgcag catgt

<210> 11

<211> 22

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

20

<400> 11

ctggtccctg gtgtcaggaa aa

<210> 12

25 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 12

gcgcccagca gtttggccc

5

<210> 13

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador sintético

<220>

15 <221> misc\_feature

<222> (15)..(16)

<223> Modificación con pABSA entre bases

<220>

20 <221> modified\_base

<222> (17)..(17)

<223> N4-etil-dC

<400> 13

25 gcacccagca gtttggcac

<210> 14

<211> 18

<212> ADN



<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

5

<220>

<221> modified\_base

<222> (17)..(17)

<223> N4-etil-dC

10

<220>

<221> misc\_feature

<222> (18)..(19)

<223> Modificación con pABSA entre bases

15

<400> 14

gcacccagca gtttggac

<210> 15

20

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Cebador sintético

<220>

<221> misc\_feature

<222> (16)..(17)

<223> Modificación con pABSA entre bases

<400> 15

gcacccagca gtttggccc

5

<210> 16

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador sintético

<220>

15 <221> misc\_feature

<222> (17).. (18)

<223> Modificación con pABSA entre bases

<400> 16

20 gcacccagca gtttggccc

<210> 17

<211> 19

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<220>

<221> misc\_feature

<222> (18)..(19)

5 <223> Modificación con pABSA entre bases

<400> 17

gcaccagca gtttgccc

10 <210> 18

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Cebador sintético

<400> 18

cctccctcca ggaagcctac gtga

20

<210> 19

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Sonda sintética

<220>

<221> misc\_feature

<223> 5' JA-270

<220>

5 <221> misc\_feature

<223> fosfato 3'

<220>

<221> misc\_feature

10 <222> (14)..(15)

<223> Colorante BHQ-2 entre bases

<400> 19

tgcacggtgg aggtgaggca g

15

<210> 20

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 20

25 tgcgatctgc acacaccagt tga

<210> 21

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

5

<400> 21

cagtcgaagg gcatgagctg ca

<210> 22

10 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador sintético

<220>

<221> misc\_feature

<222> (18)..(19)

20 <223> Modificación con pABSA entre bases

<220>

<221> modified\_base

<222> (21)..(21)

25 <223> tbbdC

<400> 22

cagccgaagg gcatgagctg ca

<210> 23

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Cebador sintético

<220>

10 <221> misc\_feature

<222> (18)..(19)

<223> Modificación con pABSA entre bases

<400> 23

15 cagccgaagg gcatgagctg ca

<210> 24

<211> 22

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

25 <220>

<221> misc\_feature

<222> (21)..(22)

<223> Modificación con pABSA entre bases

<400> 24

cagccgaagg gcatgagctg ca

<210> 25

5 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador sintético

<220>

<221> misc\_feature

<222> (21)..(22)

15 <223> Modificación con pABSA entre bases

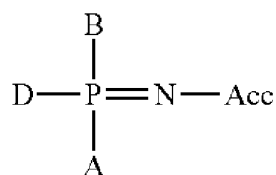
<400> 25

cagccgaagg gcatgagcgg ca

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de amplificación específica de alelo de una variante de una secuencia diana, existiendo la diana en forma de varias secuencias variantes, comprendiendo el procedimiento:

- 5 (a) hibridar un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido con al menos una variante de la secuencia diana; en el que el primer oligonucleótido es al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y el segundo oligonucleótido es al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y tiene al menos un nucleótido selectivo complementario de una única variante de la secuencia diana; en el que dicho segundo oligonucleótido comprende tanto un nucleótido con una base modificada  
10 covalentemente en el grupo amino exocíclico como un fosfato modificado que tiene una estructura:



en la que A y B representan una cadena de nucleótidos, D es OH o CH<sub>3</sub> y Acc es un aceptor de electrones o un aceptor de electrones sustituido con un residuo R en el que R es un sustituyente orgánico, en la que Acc se  
15 selecciona del grupo que consiste en CN, SO<sub>2</sub>-R', en el que R' comprende al menos un alquilo aminosustituido, un arilo opcionalmente sustituido o un heterociclo opcionalmente sustituido y un heterociclo N<sup>+</sup> de seis miembros con al menos un átomo de N alquilado en posición orto o para, estando dicho heterociclo seleccionado del grupo que consiste en piridinio, pirimidinio y quinolinio;

- (b) proporcionar condiciones adecuadas para la extensión de oligonucleótidos por una polimerasa de ácidos nucleicos;
- 20 (c) extender dicho primer oligonucleótido y dicho segundo oligonucleótido por dicha polimerasa de ácidos nucleicos, en el que dicha polimerasa de ácidos nucleicos es capaz de extender dicho segundo oligonucleótido eficientemente cuando dicho oligonucleótido hibrida con una variante de la secuencia diana que es complementaria de al menos dicho nucleótido selectivo y sustancialmente menos eficientemente cuando dicho segundo oligonucleótido hibrida con una variante de la secuencia diana que no es complementaria de al menos dicho nucleótido selectivo.

25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos dicho nucleótido selectivo está en el nucleótido del extremo 3'.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho nucleótido con dicha base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico aparece en las posiciones -5, -4, -3, -2 o -1 con respecto al nucleótido del extremo 3'.

30 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico se selecciona de un grupo que consiste en N<sup>6</sup>-benciladenina, N<sup>6</sup>- para-*terc*-butilbenciladenina, N<sup>4</sup>-para-*terc*-butilbencilitosina, N<sup>4</sup>-etilcitosina y N<sup>4</sup>-bencilitosina.

35 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho fosfato modificado aparece entre los nucleótidos en las posiciones -5 y -4 con respecto al nucleótido del extremo 3', las posiciones -4 y -3 con respecto al nucleótido del extremo 3', las posiciones -3 y -2 con respecto al nucleótido del extremo 3', las posiciones -2 y -1 con respecto al nucleótido del extremo 3' y la posición -1 con respecto al nucleótido del extremo 3' y el nucleótido del extremo 3'.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho fosfato modificado se selecciona de un grupo que consiste en P(=NSO<sub>2</sub>PhNHAc), P=pPh-NAc, P(=N-SO<sub>2</sub>-Ph-p-N=N-Ph-p-NMe<sub>2</sub>) y P=NS(O)<sub>2</sub>-rodamina-B.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicho fosfato modificado es P(=NSO<sub>2</sub>PhNHAc).

40 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha variante de la secuencia diana es una mutación del gen *EGFR* humano.

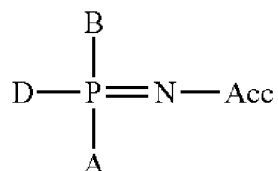
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicho segundo oligonucleótido se selecciona de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 13, 14, 22.

10. Un procedimiento para detectar una variante de una secuencia diana, existiendo la diana en forma de varias secuencias variantes, comprendiendo el procedimiento:

- 45 (a) hibridar un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido con al menos una variante de la secuencia diana;



- 5 en el que el primer oligonucleótido es al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y el segundo oligonucleótido es al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y tiene al menos un nucleótido selectivo complementario de una única variante de la secuencia diana; en el que dicho segundo oligonucleótido comprende tanto un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico como un fosfato modificado que tiene una estructura:

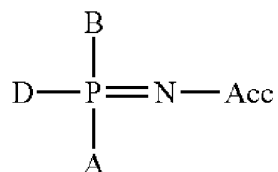


- 10 en la que A y B representan una cadena de nucleótidos, D es OH o CH<sub>3</sub> y Acc es un aceptor de electrones o un aceptor de electrones sustituido con un residuo R en el que R es un sustituyente orgánico, en la que Acc se selecciona del grupo que consiste en CN, SO<sub>2</sub>-R', en el que R' comprende al menos un alquilo aminosustituido, un arilo opcionalmente sustituido o un heterociclo opcionalmente sustituido y un heterociclo N<sup>+</sup> de seis miembros con al menos un átomo de N alquilado en posición orto o para, estando dicho heterociclo seleccionado del grupo que consiste en piridinio, pirimidinio y quinolinio;

- (b) proporcionar condiciones adecuadas para la extensión de oligonucleótidos por una polimerasa de ácidos nucleicos;
- 15 (c) extender dicho primer oligonucleótido y dicho segundo oligonucleótido por dicha polimerasa de ácidos nucleicos, en el que dicha polimerasa de ácidos nucleicos es capaz de extender dicho segundo oligonucleótido eficientemente cuando dicho oligonucleótido hibrida con una variante de la secuencia diana que es complementaria de al menos dicho nucleótido selectivo y sustancialmente menos eficientemente cuando dicho segundo oligonucleótido hibrida con una variante de la secuencia diana que no es complementaria de al menos dicho nucleótido selectivo;
- 20 (d) detectar productos de dicha extensión de oligonucleótidos, en el que dicha extensión significa la presencia de la variante de dicha secuencia diana con la que dicho segundo oligonucleótido tiene un nucleótido selectivo complementario.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicho fosfato modificado se selecciona de un grupo que consiste en P(=NSO<sub>2</sub>PhNHAc), P=pPh-NAc, P(=N-SO<sub>2</sub>-Ph-p-N=N-Ph-p-NMe<sub>2</sub>) y P=NS(O)<sub>2</sub>-rodamina-B.

- 25 12. Uso de un kit para un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, comprendiendo el kit:
- (a) un primer oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana; y
- 30 (b) un segundo oligonucleótido al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana, y que tiene al menos un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana; en el que dicho segundo oligonucleótido comprende tanto un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico como un fosfato modificado que tiene una estructura:

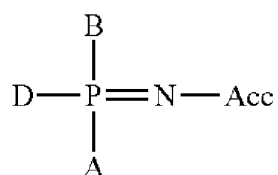


- 35 en la que A y B representan una cadena de nucleótidos, D es OH o CH<sub>3</sub> y Acc es un aceptor de electrones o un aceptor de electrones sustituido con un residuo R en el que R es un sustituyente orgánico, en la que Acc se selecciona del grupo que consiste en CN, SO<sub>2</sub>-R', en el que R' comprende al menos un alquilo aminosustituido, un arilo opcionalmente sustituido o un heterociclo opcionalmente sustituido y un heterociclo N<sup>+</sup> de seis miembros con al menos un átomo de N alquilado en posición orto o para, estando dicho heterociclo seleccionado del grupo que consiste en piridinio, pirimidinio y quinolinio.
- 40 13. Uso del kit de la reivindicación 12, comprendiendo, además, el kit una polimerasa de ácidos nucleicos, trifosfatos de nucleósidos, tampón adecuado para la extensión de ácidos nucleicos por la polimerasa de ácidos nucleicos y un

conjunto de instrucciones para realizar la amplificación específica de alelo.

14. Uso de un oligonucleótido para un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, comprendiendo el oligonucleótido:

- 5 (a) una secuencia al menos parcialmente complementaria de una porción de una o más variantes de dicha secuencia diana;
- (b) al menos un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana;
- (c) un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico;
- (d) un fosfato modificado que tiene una estructura:

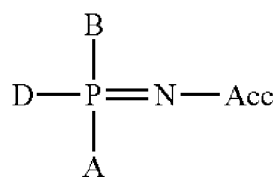


- 10 en la que A y B representan una cadena de nucleótidos, D es OH o CH<sub>3</sub> y Acc es un aceptor de electrones o un aceptor de electrones sustituido con un residuo R en el que R es un sustituyente orgánico, en la que Acc se selecciona del grupo que consiste en CN, SO<sub>2</sub>-R', en el que R' comprende al menos un alquilo aminosustituido, un arilo opcionalmente sustituido o un heterociclo opcionalmente sustituido y un heterociclo N<sup>+</sup> de seis miembros con al menos un átomo de N alquilado en posición orto o para, estando dicho heterociclo seleccionado del grupo que
- 15 consiste en piridinio, pirimidinio y quinolinio.

15. Uso del oligonucleótido de la reivindicación 14, con una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 13, 14, 22.

16. Uso de una mezcla de reacción para un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, comprendiendo la mezcla de reacción:

- 20 (a) un primer oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana; y
- (b) un segundo oligonucleótido al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana, y que tiene al menos un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana; en el que dicho segundo oligonucleótido comprende tanto un nucleótido con una base modificada covalentemente en el
- 25 grupo amino exocíclico como un fosfato modificado que tiene una estructura:



- en la que A y B representan una cadena de nucleótidos, D es OH o CH<sub>3</sub> y Acc es un aceptor de electrones o un aceptor de electrones sustituido con un residuo R en el que R es un sustituyente orgánico, en la que Acc se selecciona del grupo que consiste en CN, SO<sub>2</sub>-R', en el que R' comprende al menos un alquilo aminosustituido, un arilo opcionalmente sustituido o un heterociclo opcionalmente sustituido y un heterociclo N<sup>+</sup> de seis miembros con al menos un átomo de N alquilado en posición orto o para, estando dicho heterociclo seleccionado del grupo que
- 30 consiste en piridinio, pirimidinio y quinolinio.

- (c) una polimerasa de ácidos nucleicos;
- (d) trifosfatos de nucleósidos; y
- 35 (e) un tampón adecuado para la extensión de ácidos nucleicos por la polimerasa de ácidos nucleicos.