

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 428**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2010 PCT/EP2010/000030**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.07.2010 WO10079127**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2010 E 10700205 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2385991**

54 Título: **Amplificación de ácido nucleico con supresión específica de alelo de variantes de secuencia**

30 Prioridad:

**07.01.2009 US 143113 P**

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

**27.09.2017**

73 Titular/es:

**ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (50.0%)  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim, DE y  
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GROW, MICHAEL y  
BROPHY, VICTORIA**

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 2 634 428 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Amplificación de ácido nucleico con supresión específica de alelo de variantes de secuencia

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de los diagnósticos moleculares basados en ácidos nucleicos y, más específicamente, a un procedimiento mejorado de amplificación de secuencias de ácidos nucleicos con supresión específica de alelo de amplificación de variantes de secuencia no deseadas.

10

**Antecedentes de la invención**

Las pruebas de diagnóstico basadas en ácidos nucleicos se usan ampliamente en medicina, medicina forense y aplicaciones ambientales. La detección de variaciones en una secuencia de ácido nucleico en particular proporciona información sobre polimorfismos y mutaciones, incluyendo mutaciones causantes de enfermedades. Por ejemplo, la detección del genotipo mutante de un individuo proporciona el estatus de portador de enfermedad para el asesoramiento genético. Una tarea más difícil es detectar las mutaciones somáticas que surgen en los tejidos y causan enfermedad o progresión de la enfermedad. Por ejemplo, muchos cánceres son causados por una mutación particular. Después, en las células cancerosas se acumulan mutaciones adicionales durante la progresión tumoral. Véase Lea *et al.* (2007) *Genetic pathways and mutation profiles of human cancers: site and exposure-specific patterns*, *Carcinogenesis*, 28(9):1851-1858. Downward, J. (2003) *Targeting RAS signaling pathways in cancer therapy* (2005), *Nature Rev. Cancer*, 3: 11-22. Estas mutaciones son predictivas del resultado de la enfermedad y de la respuesta a la terapia. Véase Ikediobi *et al.* (2008) *Somatic pharmacogenomics in cancer*, *Pharmacogenomics J.*, 8:305-314, Pao *et al.* (2005) *KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib and or erlotinib*, *PLoS Medicine*, 2(1), e17. La capacidad de detectar dichas mutaciones es extremadamente útil en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Sin embargo, la detección de las mutaciones, especialmente la detección precoz, se enfrenta a muchos desafíos técnicos.

15

20

25

30

35

40

Un desafío importante en la detección de una mutación relacionada con el cáncer es la naturaleza rara de la mutación, especialmente cuando surge por primera vez en una sola célula durante la carcinogénesis. Inicialmente, solo una subpoblación de células lleva la mutación, mientras que las células circundantes todavía llevan la secuencia natural. Por lo tanto, en un aislado de ácido nucleico, el ácido nucleico recién mutado queda oculto por el exceso de ácido nucleico natural. Muchos procedimientos de detección específicos de alelos (tales como la PCR específica de alelo) implican la amplificación preferente de la secuencia de interés (secuencia mutante) sobre la secuencia indeseada (secuencia natural). Desafortunadamente, en la mayoría de los casos, la selectividad del ensayo no es perfecta, es decir, la secuencia indeseada también se amplifica, pero mucho menos eficientemente que la secuencia deseada. Debido a que la secuencia no deseada (natural) está presente en gran exceso molar en relación a la secuencia mutante, la desventaja se elimina y la secuencia natural se amplifica predominantemente, ocultando la presencia de la secuencia mutante.

45

50

En respuesta a este desafío se han desarrollado algunos procedimientos. Por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.849.497 y la publicación de solicitud n.º 2009/0053720, presentada el 5 de agosto de 2008, enseñan el uso de un bloqueador de amplificación que evitaría la amplificación de la secuencia indeseada competidora. En esta estrategia, el bloqueador es un oligonucleótido no extensible que forma un híbrido estable con la secuencia indeseada (pero no con la secuencia deseada) hacia el extremo 3' de uno de los cebadores de amplificación. Cuando el bloqueador se hibrida establemente, una ADN polimerasa deficiente en la actividad 5'-3'-nucleasa es incapaz de completar la extensión del cebador. El éxito de esta estrategia depende de la divergencia de secuencias entre las secuencias deseadas y las no deseadas. La estrategia funciona mejor cuando hay múltiples diferencias entre las secuencias, asegurando que el híbrido entre el bloqueador y la secuencia que se desea suprimir es estable, mientras que el híbrido entre el bloqueador y la secuencia que se desea amplificar es inestable.

55

60

El documento US 2008/0176226, por ejemplo, usa dos oligonucleótidos que se unen a más de una variante de la secuencia diana, una sonda que se une con una afinidad más alta a una de las variantes e inhibe la amplificación de la otra variante. La sonda contiene una base modificada en su extremo 3' como una marca detectable. Otro procedimiento de amplificación selectiva de una variante deseada de una secuencia diana se describe por Yu *et al.* (1997), *Specific inhibition of PCR by non-extendable oligonucleotides using a 5' to 3' exonuclease-deficient DNA polymerase*, *BioTechniques*, 23(4): 714-720. La secuencia diana existe en forma de más de una variante, que comprende las etapas de proporcionar una muestra que comprende la secuencia diana y una variante, proporcionando dos oligonucleótidos que se unen a la molécula diana y variante y un tercer oligonucleótido que se une con una afinidad más alta a la variante en una distancia de menos de 60 nucleótidos respecto al sitio de unión de uno de los cebadores. El tercer oligonucleótido inhibe específicamente la amplificación de la variante no deseada. La sonda de bloqueo (tercer oligonucleótido) también se utiliza como sonda de detección.

65

El procedimiento anterior tiene varias limitaciones técnicas. Un oligonucleótido bloqueador más largo es más eficiente en el bloqueo, pero puede ser incapaz de discriminar, bloqueando así la amplificación de todas las variantes de la secuencia. Un bloqueador más corto puede ser incapaz de bloquear cualquier amplificación

eficientemente. En algunos contextos de secuencia, puede haber tan pocas diferencias que un bloqueador tenga una capacidad de discriminación muy débil. Por lo tanto, en algunos loci de interés clínico, el bloqueador por sí solo es insuficiente para resolver los problemas técnicos de la amplificación específica de alelo.

## 5 Sumario de la invención

La presente invención es un procedimiento mejorado de amplificación selectiva de una variante deseada de una secuencia diana, para la cual dicha secuencia diana existe en forma de más de una variante, comprendiendo el procedimiento las etapas de: proporcionar una muestra que comprende posiblemente al menos una variante de la secuencia diana en una mezcla de reacción; proporcionar un primer oligonucleótido, capaz de hibridarse con más de una variante de la secuencia diana; proporcionar un segundo oligonucleótido, capaz de hibridarse con más de una variante de la secuencia diana, en el que al menos una fracción de dicho segundo oligonucleótido contiene una base modificada en uno o más nucleótidos en o cerca del extremo 3'; dicha base modificada se modifica en el grupo amino exocíclico; proporcionar un tercer oligonucleótido capaz de hibridarse con la variante deseada de la secuencia diana con menor afinidad que con las variantes no deseadas de la secuencia diana y diseñado para hibridarse con la misma cadena y entre 0 y 60 nucleótidos hacia el extremo 3' de dicho segundo oligonucleótido; proporcionar una polimerasa de ácido nucleico que carece sustancialmente de actividad nucleasa 5'-3' y que posee capacidad de inicio en caliente; someter dicha mezcla de reacción a reacción en cadena de la polimerasa, en la que las cantidades de dichos oligonucleótidos primero y segundo son desiguales, de manera que el primer oligonucleótido está presente en exceso y dicho tercer oligonucleótido inhibe sustancialmente la extensión de dicho segundo oligonucleótido por dicha polimerasa de ácido nucleico cuando dicho tercer oligonucleótido se hibrida con la variante no deseada de la secuencia diana, pero no inhibe sustancialmente la extensión de dicho segundo oligonucleótido por dicha polimerasa de ácido nucleico cuando dicho tercer oligonucleótido se hibrida con la variante deseada de la secuencia diana.

25

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación esquemática del procedimiento de la presente invención.

30 La figura 2 muestra los resultados del análisis de amplificación y fusión de una diana natural y mutante KRAS por separado, de acuerdo con el ejemplo 1 de la presente invención.

35 Las figuras 3-8 muestran los resultados de la amplificación específica de alelo y la detección de mutaciones KRAS en una mezcla de muestras natural y mutantes, de acuerdo con el ejemplo 2 de la presente invención.

La figura 9 muestra los resultados de la amplificación específica de alelo y la detección de mutaciones de KRAS en muestras de tejidos embebidos en parafina fijados con formalina derivados de pacientes (FFPET), de acuerdo con el ejemplo 3 de la presente invención.

40 La figura 10 muestra la secuencia de ácido nucleico diana usada en los ejemplos de la presente invención.

### Descripción detallada de la invención

45 La presente invención es un procedimiento mejorado de amplificación selectiva de ciertas variantes de la secuencia diana, potenciado por supresión específica de alelo de amplificación de una o más de las otras variantes de la secuencia diana.

### Definiciones

50 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado según 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.

55 Una "muestra biológica" o "muestra" se refiere a cualquier sustancia que contenga posiblemente un ácido nucleico de interés. La muestra puede obtenerse por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Dicha muestra puede ser una cantidad de tejido o fluido, o una fracción purificada del mismo, aislada de un ser humano u otro animal, incluyendo, pero sin limitarse a: fluido corporal, tal como plasma, suero, fluido espinal, saliva, fluido peritoneal, fluido linfático, humor acuoso o vítreo, líquido sinovial, orina, lágrimas, fluido seminal, fluidos vaginales, derrame pulmonar, líquido seroso; tejidos, incluyendo sangre, tejidos normales, tumores y tejidos embebidos en parafina. Las muestras también pueden ser (o derivarse de) cultivos celulares *in vitro*. Las muestras pueden incluir medio condicionado, células y componentes celulares. El ácido nucleico puede obtenerse a partir de una muestra biológica mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

65 Un "oligonucleótido bloqueador" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un oligonucleótido que: (1) forma un dúplex con algunas variantes de la secuencia diana a una temperatura de fusión suficientemente baja para permitir que una polimerasa que carezca significativamente de actividad nucleasa 5'-3' desplace el

oligonucleótido bloqueador y que replique las variantes de la secuencia diana; y

(2) forma un dúplex con otras variantes de la secuencia diana, a una temperatura de fusión suficientemente alta para evitar que una polimerasa que carece significativamente de actividad nucleasa 5' - 3' replique las variantes de la secuencia diana.

5 El oligonucleótido bloqueador incluye típicamente una modificación en el extremo 3' para evitar la extensión del oligonucleótido bloqueador por una polimerasa.

10 Una "secuencia diana" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se ha de detectar en una muestra biológica. La secuencia diana puede ser una porción de una secuencia más grande o un ácido nucleico aislado.

15 La frase "evitar la amplificación" se refiere a la eliminación o reducción (detectable) de la amplificación de una secuencia. Tal como se describe en el presente documento, un oligonucleótido bloqueador puede evitar la amplificación de una o más variantes de la secuencia diana, de modo que la amplificación de tales variantes sea indetectable, o sea menos detectable, en comparación con una reacción de control que carece del oligonucleótido bloqueador.

20 Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente, y se refieren a un polímero de ARN, ADN, así como formas modificadas de los mismos, tales como ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y similares. No existe una diferencia de longitud entre el término "ácido nucleico" y "polinucleótido". Un "oligonucleótido" es un ácido nucleico generalmente más corto, que es comúnmente monocatenario.

25 Un ácido nucleico es 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; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800; Sprinzl *et al.* (1977) *Eur. J. Biochem.* 81:579; Letsinger *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:3487; Sawai *et al.* (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; y Pauwels *et al.* (1986) *Chemica Scripta* 26:1419), fosforoditioato (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), O-methylphosphoramidite linkages (Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press (1992)), y cadenas principales y enlaces de ácidos peptidonucleicos (Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895; Meier *et al.* (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008; Nielsen (1993) *Nature* 365:566; y Carlsson *et al.* 1996, *Nature*, 380:207). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con cadenas principales cargadas positivamente (Denpcy *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097); cadenas principales no iónicas (patentes de EE. UU. n.º 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Angew (1991) *Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; Letsinger *et al.* (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597; capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. YS Sanghvi y P. Dan Cook; Mesmaeker *et al.* (1994) *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 4:395; Jeffs *et al.* (1994) *J. Biomolecular NMR* 34:17; *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) y cadenas principales sin ribosa, incluyendo las descritas en las patentes de EE. UU. n.º 5.235.033 y 5.034.506 y capítulos 6 y 7, *ASC Symposium Series* 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Ed. Y.S. Sanghvi y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos están también incluidos dentro de la definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins *et al.* (1995) *Chem. Soc. Rev.* págs. 169-176). Varios análogos de ácidos nucleicos se describen también 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 restos marcadores, o para alterar la estabilidad y la semivida de dichas moléculas en entornos fisiológicos.

50 Los ácidos nucleicos contienen generalmente las bases nitrogenadas típicas (adenina, guanina, citosina, timina y uracilo). Sin embargo, los ácidos nucleicos también pueden contener heterocíclicos no naturales u otras bases modificadas. En particular, dichas bases se describen en Seela *et al.* (1991) *Helv. Chim. Acta* 74:1790, Grein *et al.* (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:971-976, and Seela *et al.* (1999) *Helv. Chim. Acta* 82:1640. Otras bases incluyen 7-deazapurinas (por ejemplo, 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, 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. Aún otras bases heterocíclicas representativas incluyen, hipoxantina, inosina, xantina; derivados 8-aza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, derivados 7-deaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitidina; 5-fluorocitidina; 5-clorocitidina; 5-yodocitidina; 5-bromocitidina; 5-metilcitidina; 5-propinilcitidina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluorouracilo; 5-clorouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracilo, 4-acetilcitidina, 5-(carboxi-hidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenosina, 1-metilguanosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 7-deazaadenosina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, 3-metilcitidina, 5-metilcitidina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosina, 7-deazaguanosina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N-6-isopenteniladenosina, ácido uracil-5-oxiacético (v), vibutoxosina, pseoudouracilo, queosina, 2-tiocitidina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-

carboxipropil) uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina y 5-propinil pirimidina, y similares.

Ejemplos adicionales de bases y nucleótidos no naturales son las 5-propinil pirimidinas, descritas en la patente de EE. UU. n.º 5.484.908; y otras pirimidinas modificadas descritas en la patente de EE. UU. n.º 5.645.985 y 5.830.653. los [2.2.1] biclonucleótidos se describen en la patente de EE. UU. n.º 6.639.059. Otras purinas y pirimidinas modificadas utilizadas en cebadores para aumentar la especificidad de una reacción de amplificación se describieron en la patente de EE. UU. n.º 6.011.611.

Un término "extensión de cebador" se refiere a la capacidad de un biocatalizador que incorpora nucleótidos, tal como una polimerasa, de añadir uno o más nucleótidos al extremo 3' de un cebador.

"Condiciones adecuadas para la extensión del cebador" se refiere a las condiciones en las que los cebadores que se hibridan con un ácido nucleico molde son extendidos por un biocatalizador que incorpora nucleótidos, tal como una polimerasa. Por ejemplo, dichas condiciones ocurren durante el paso de apareamiento y extensión de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los expertos en la técnica apreciarán que dichas condiciones pueden variar y que generalmente están influenciadas por la concentración iónica de la solución, la temperatura y la secuencia del ácido nucleico molde particular y de los cebadores. Varias condiciones de PCR se describen en *PCR Strategies* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, and J. J. Sninsky eds., 1995, Academic Press, San Diego, Calif.) en el capítulo 14; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White eds., 1990 Academic Press, N.Y.).

Un ácido nucleico es "complementario" en relación con otro ácido nucleico cuando al menos una subsecuencia del ácido nucleico puede combinarse en una asociación antiparalela con al menos una subsecuencia del otro ácido nucleico para formar un dúplex. En el contexto de la presente invención, en un oligonucleótido que es "totalmente complementario" respecto a una secuencia de ácido nucleico particular, cada base del oligonucleótido es complementaria a la base correspondiente en la secuencia particular. Un oligonucleótido es "parcialmente complementario" respecto a una secuencia de ácido nucleico particular cuando una o más de las bases en el oligonucleótido no son complementarias ("emparejadas erróneamente") con las bases correspondientes en el otro ácido nucleico. Las bases modificadas se consideran generalmente complementarias a la misma base que sus precursores no modificados. Por ejemplo, la 7-deazaguanina se considera complementaria a la citosina y se considera que la N6-bencil-adenina es complementaria a la timina.

Un "ácido nucleico cebador" o "cebador" es un oligonucleótido que puede hibridarse con un ácido nucleico diana (a veces llamado ácido nucleico molde) y permitir la extensión o elongación de la cadena por un biocatalizador que incorpora nucleótidos, tal como una polimerasa, bajo condiciones de reacción apropiadas. Un ácido nucleico cebador es típicamente un oligonucleótido natural o sintético, que varía de aproximadamente 6 hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, aunque la mayoría de los cebadores tienen una longitud entre 15 y 35 nucleótidos. Los ácidos nucleicos cebadores cortos generalmente requieren temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con los ácidos nucleicos molde. Un cebador que es al menos parcialmente complementario al ácido nucleico molde es típicamente suficiente para que se produzca la extensión. El diseño de cebadores adecuados para la amplificación de una secuencia diana dada es bien conocido en la técnica y se describe en la bibliografía citada en el presente documento. Un cebador se puede marcar, si se desea, incorporando una marca detectable mediante técnicas espectroscópicas, fotoquímicas, bioquímicas, inmunoquímicas, químicas u otras técnicas. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen radioisótopos, colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (usadas comúnmente en ensayos ELISA), haptenos y proteínas para los que están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales. Muchos de estos y otros marcadores se describen en el presente documento o son conocidos en la técnica.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido (u otra secuencia de ácido nucleico) que, en condiciones adecuadas, puede formar una estructura dúplex con una región de un ácido nucleico diana, debido a una complementariedad parcial o completa con al menos una subsecuencia en el ácido nucleico diana. Como se discute en el presente documento, la sonda está típicamente marcada para permitir la detección del ácido nucleico diana. El extremo 3' de la sonda está típicamente diseñado para impedir la extensión de la sonda por un biocatalizador que incorpora nucleótidos. Esto puede conseguirse utilizando bases no complementarias o añadiendo un resto químico, tal como biotina o un grupo fosfato, al grupo 3'-hidroxilo del nucleótido 3' - terminal. Estos restos químicos en el extremo 3' pueden servir con un doble propósito actuando también como un marcador para la subsiguiente detección o captura del ácido nucleico con el que la sonda ha hibridado. La inhibición de la extensión también puede conseguirse eliminando el 3'-OH o utilizando un nucleótido que carezca de un 3'-OH tal como un didesoxinucleótido, o añadiendo un grupo voluminoso que bloquee la extensión por impedimento estérico. Como se discute más adelante en el presente documento, los oligonucleótidos bloqueadores de la invención pueden funcionar opcionalmente como sondas.

El término "actividad nucleasa 5' a 3'" o "actividad nucleasa 5'-3'" se refiere a una actividad de una polimerasa de ácido nucleico, típicamente asociada 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.

Los términos "polimerasa de ácido nucleico que carece sustancialmente de actividad 5'-3' nucleasa" o "enzima deficiente en actividad nucleasa 5'-3' ", o para simplificar, "enzima deficiente en actividad nucleasa" se refieren a una polimerasa que tiene un 50 % o menos de la actividad 5'-3' que la Taq ADN polimerasa. Los procedimientos de medición de la actividad nucleasa 5'-3' y las condiciones para la medición se han descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.466.591. Los ejemplos de polimerasas que carecen de la actividad nucleasa 5'-3' incluyen el fragmento Stoffel de la Taq ADN polimerasa (patente de EE. UU. n.º 5.466.591), mutantes de ADN polimerasa de *Thermus africanus* (patente de EE. UU. n.º 5.968.799), mutantes de ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* patentes de EE. UU. n.º 5.624.833 y 5.420.029), mutantes de *Thermus species* sps17 y ADN polimerasas Z05 de *Thermus species* (patentes de EE. UU. n.º 5.466.591 y 5.405.774). Las enzimas deficientes en actividad nucleasa 5'-3' también pueden ser quimeras, es decir, proteínas quiméricas, compuestas por dominios derivados de más de una especie y que tienen mutaciones que eliminan la actividad nucleasa 5'-3' (patentes de EE. UU. n.º 5.795.762 y 6.228.628).

Ejemplos de ADN polimerasas termoestables incluyen las de *Thermus thermophilus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus sp. Z05* (véase, por ejemplo, patente de EE. UU. n.º 5.674.738), *Thermus aquaticus*, *Thermus flavum*, *Thermus filiformis*, *Thermus sp. Sps17*, *Deinococcus radiopure*, familia B / clon 7, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldotenax*, *Escherichia coli*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana* y *Thermosiphon africanus*. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos completas para numerosas ADN polimerasas termoestables están disponibles en las bases de datos públicas.

Como se usa en el presente documento, el término "T<sub>m</sub>" se refiere a la «temperatura de fusión». La temperatura de fusión es la temperatura a la que la mitad de una población de moléculas de ácido nucleico bicatenario (es decir, dúplex de ácido nucleico que son completamente o parcialmente complementarios), se disocia en hebras individuales. La predicción de una T<sub>m</sub> de un polinucleótido dúplex tiene en cuenta la secuencia de bases, así como otros factores, incluyendo características estructurales y de secuencia, el grado de complementariedad, la naturaleza de los enlaces oligoméricos y la concentración iónica de la solución. Los procedimientos para predecir y determinar experimentalmente la T<sub>m</sub> son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la T<sub>m</sub> se determina tradicionalmente mediante un análisis de la curva de fusión, en el que una molécula de ácido nucleico dúplex se calienta gradualmente y se controla el estado de asociación/disociación del dúplex midiendo un cambio en un parámetro detectable que se correlaciona con la fusión del dúplex. El cambio en el parámetro se representa en función del cambio de temperatura. La T<sub>m</sub> se determina a partir de esta curva de fusión.

Un término "inicio en caliente", en el contexto de una reacción de amplificación de ácido nucleico, es 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 ácido nucleico, capaz de actuar como reactivo "retenido" o inactivo en un protocolo de inicio en caliente.

La presente invención es una mejora de la amplificación selectiva de ácidos nucleicos, que utiliza la supresión específica de alelo de la amplificación de las variantes no deseadas de la secuencia diana. En la figura 1 se muestra un diagrama esquemático del procedimiento de la presente invención. El diagrama muestra una diana de ácido nucleico bicatenario y un oligonucleótido bloqueador, capaz de aparearse con la diana hacia el extremo 3' de uno de los cebadores (flechas). El extremo 3' del cebador situado hacia el extremo 5' del bloqueador se modifica químicamente. F representa un resto indicador fluorescente y Q representa un extintor de fluorescencia, conjugado con el oligonucleótido bloqueador.

La mejora de la presente invención se basa en el descubrimiento de que la proximidad relativa del cebador y el oligonucleótido bloqueador, así como ciertas modificaciones químicas del cebador y la polimerasa, mejoran en gran medida la amplificación selectiva.

El procedimiento general de supresión de la amplificación de las variantes no deseadas de la secuencia diana se describe en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2009/0053720, presentada el 5 de agosto de 2008.

El éxito de la supresión específica de alelo de la amplificación por el oligonucleótido bloqueador depende de la estabilidad del híbrido entre el oligonucleótido bloqueador y la diana. Cuando el híbrido con el bloqueador es más estable (como en el caso de las secuencias indeseables), la amplificación es suprimida por el bloqueador. Cuando el híbrido con el bloqueador es menos estable (como en el caso de la secuencia que se desea amplificar), tiene lugar la amplificación. Una forma tradicional de aumentar la estabilidad de un híbrido de ácido nucleico es aumentar la longitud de los ácidos nucleicos que se hibridan. Sin embargo, el aumento de la longitud del oligonucleótido bloqueador perjudicará la discriminación. La amplificación de todas las variantes de la secuencia diana se suprimirá. Por lo tanto, para cualquier secuencia diana dada, la capacidad para optimizar el oligonucleótido bloqueador es limitada.

Como se describe en la publicación de solicitud de EE. UU. n.º 2009/0053720, el oligonucleótido bloqueador está típicamente diseñado para hibridarse en cualquier lugar entre los dos oligonucleótidos cebadores. El bloqueador o

bloqueadores pueden hibridar con una o ambas cadenas del ácido nucleico diana. El único requisito conocido era que el bloqueador debía hibridar hacia el extremo 3' y con la misma cadena que el cebador cuya extensión se suprime. Sin embargo, en el contexto de la presente invención, se descubrió que la distancia entre el extremo 3' del cebador y el extremo 5' del oligonucleótido bloqueador afecta a la eficacia del bloqueo. Generalmente, la distancia  
5 óptima entre los extremos respectivos del cebador y del bloqueador está entre 0 y 60 nucleótidos. Para cada secuencia diana particular, la distancia óptima dentro de ese intervalo puede determinarse empíricamente, utilizando la directriz proporcionada en el presente documento.

De acuerdo con la presente invención, el extremo 3' del cebador, situado hacia el extremo 5' del oligonucleótido bloqueador y que se hibrida con la misma hebra, se modifica químicamente para mejorar el grado de bloqueo. Tradicionalmente, las modificaciones químicas se encuentran en cebadores específicos de alelos, es decir, cebadores que coinciden con una variante de secuencia deseada pero que tienen emparejamientos erróneos con las variantes de secuencia no deseadas. Los ejemplos de modificaciones químicas que afectan a la especificidad de los cebadores de amplificación se describen en la patente de EE. UU. n.º 6.011.611. Estas modificaciones incluyen uniones covalentes en los grupos amino exocíclicos de ciertas bases nitrogenadas. Las modificaciones, que se producen en uno o más nucleótidos situados dentro de aproximadamente cinco nucleótidos 3' - terminales del cebador, se sabe que generalmente aumentan la especificidad de la amplificación. Según la técnica anterior, la modificación química del cebador no es necesaria cuando el cebador es igualmente complementario a las variantes de secuencia deseadas y no deseadas.  
10  
15  
20

Sorprendentemente, los autores de la presente invención encontraron que la modificación química del cebador desempeña un papel en el éxito de la supresión específica de alelo de la amplificación por el oligonucleótido bloqueador. El efecto es especialmente sorprendente porque los propios cebadores no son específicos de los alelos como requeriría la técnica anterior. Los cebadores son igualmente complementarios tanto para las variantes de secuencia deseadas como para las no deseadas.  
25

En algunos modos de realización, la presente invención es un ensayo de amplificación selectiva con supresión específica de alelo de la amplificación de la variante de secuencia no deseada, que se realiza en presencia de una pequeña cantidad de la variante de secuencia deseada y un exceso molar de la variante de secuencia no deseada.  
30 En algunos modos de realización, la proporción de la variante de secuencia deseada frente a la de la secuencia no deseada es 1:1, 1:20, 1:100, 1:1000 o más alta.

El oligonucleótido bloqueador de la presente invención está diseñado para aparearse e hibridarse con la porción de la secuencia diana localizada entre los sitios de unión del cebador. El bloqueador o los bloqueadores pueden diseñarse para hibridar con una o ambas cadenas del ácido nucleico diana. El oligonucleótido bloqueador está diseñado para formar un híbrido con una temperatura de fusión más alta con las versiones no deseadas de la secuencia diana que con la versión deseada. El diseño del oligonucleótido bloqueador para la supresión de la amplificación de las variantes de secuencia no deseadas se ha descrito en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2009/0053720, presentada el 5 de agosto de 2008.  
35  
40

Generalmente, el bloqueador está diseñado para incorporar uno o más emparejamientos erróneos con la variante deseada de la secuencia diana. Con las otras variantes de la secuencia diana, el bloqueador tiene menos emparejamientos erróneos o ninguno en absoluto. Debido a que el grado de complementariedad afecta a la temperatura de fusión del híbrido de ácido nucleico, la  $T_m$  del híbrido formado entre el oligonucleótido bloqueador y la variante deseada de la secuencia diana sería preferentemente la más baja entre todos los híbridos formados por el oligonucleótido bloqueador. Además del grado de complementariedad, la temperatura de fusión del oligonucleótido también se ve afectada por la presencia y número de bases no convencionales, que pueden ser "estabilizantes" (por ejemplo 5-metilcitosina y propiniluridina) o "desestabilizantes" (por ejemplo, N<sup>6</sup>-benciladenosina) como se conoce en la técnica. Opcionalmente, dichas bases pueden incorporarse en el oligonucleótido bloqueador para modular adicionalmente su temperatura de fusión.  
45  
50

Generalmente, la técnica anterior enseña que el oligonucleótido bloqueador debe estar situado entre los dos cebadores de amplificación e hibridarse hacia el extremo 3' con la misma cadena que el cebador cuya extensión ha de suprimirse. En el ámbito de la presente invención, se descubrió que la posición relativa del bloqueador y los oligonucleótidos cebadores afecta en gran medida a la capacidad del bloqueador de suprimir la amplificación. Por ejemplo, el bloqueador puede estar situado entre 0 y 60, por ejemplo 0, 1, 2, 3 o más nucleótidos hacia el extremo 3' del extremo 3' de uno de los cebadores, e hibrida con la misma cadena que el cebador hacia el extremo 5'.  
55

El oligonucleótido bloqueador puede diseñarse "manualmente" o usando cualquiera de los programas de software de diseño de oligos conocidos por los profesionales de la técnica, incluyendo Visual OMP (DNA Software, Inc., Ann Arbor, Mich.), Oligo 6 (Stratagene, La Jolla, Calif.), Sequencher (Gene Codes, Ann Arbor, Mich.) and DNASTar (DNASTar, Inc., Madison, Wis.). El objetivo del proceso de diseño es crear un oligonucleótido bloqueador con una estabilidad termodinámica diferente entre los híbridos de las distintas variantes de la secuencia diana y el bloqueador bajo las temperaturas y condiciones de un ensayo de amplificación particular.  
60  
65

En algunos modos de realización, el oligonucleótido bloqueador tiene una doble función, como sonda para la

detección de la amplificación de la secuencia diana. Para usarse como sonda, el oligonucleótido bloqueador puede marcarse con cualquier tipo de marcador detectable conocido en la técnica. Por ejemplo, el marcador puede ser fluorescente, quimioluminiscente, radiactivo, enzimático, etc. Dicho oligonucleótido sonda-bloqueador se puede usar en cualquier número de procedimientos de detección, como la detección de amplificación ("curva de crecimiento") así como un ensayo de fusión posterior a la amplificación.

En una reacción de amplificación de acuerdo con la presente invención, se pueden usar uno o más oligonucleótidos bloqueadores. Los oligonucleótidos bloqueadores pueden diseñarse para hibridarse con una cadena de ácido nucleico que se desea amplificar, o pueden diseñarse bloqueadores independientes para hibridar con ambas cadenas. En el caso de que se diseñe más de un oligonucleótido para hibridarse con la misma cadena de ácido nucleico, los oligonucleótidos pueden usarse en la misma o diferentes rondas de la reacción de amplificación. Por ejemplo, cuando la segunda ronda de amplificación implica un cebador ubicado internamente respecto al cebador usado en la primera ronda, se puede usar un bloqueador ubicado internamente a dicho cebador de segunda ronda en la segunda o subsiguientes rondas de amplificación. Todos o al menos uno de los oligonucleótidos bloqueadores debe diseñarse de acuerdo con las directrices de la presente invención.

Los cebadores de amplificación de la presente invención son oligonucleótidos al menos parcialmente complementarios con al menos una de las variantes existentes de la secuencia diana. La longitud del cebador puede oscilar entre 6 y 100 nucleótidos, aunque la mayoría de los cebadores varían típicamente entre 15 y 35 nucleótidos. Se han descrito los procedimientos de optimización de los cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos; por ejemplo en *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis *et al.*, eds, 1990. Típicamente, los cebadores son oligonucleótidos sintéticos, compuestos por nucleótidos A, C, G y T. Sin embargo, también pueden usarse nucleótidos de bases no convencionales, que no se encuentran normalmente en los ácidos nucleicos. Por ejemplo, se sabe que ciertas bases modificadas aumentan la especificidad de la amplificación, véase la patente de EE. UU. n.º 6.001.011. Estas modificaciones incluyen grupos alquilo, arilo o alquilarilo unidos covalentemente a un grupo amino exocíclico de la nucleobase. El uso tradicional de estas bases modificadas en cebadores de amplificación es reducir la amplificación no específica. Sin embargo, en un aspecto de la presente invención, se encontró que los nucleótidos con bases modificadas covalentemente en los grupos amino exocíclicos también aumentan el grado de supresión de la amplificación usando el oligonucleótido bloqueador.

Diversos biocatalizadores que incorporan nucleótidos, como ADN polimerasas, son conocidos en la técnica. En la presente invención se puede usar cualquier polimerasa termoestable que carezca de la actividad nucleasa 5' - 3'. A veces es deseable usar una enzima sin la actividad correctora (3'-5'-exonucleasa).

Un ejemplo de una enzima adecuada es la polimerasa  $\Delta Z05$ . 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  $\Delta Z05$ -Gold.

La detección de los productos de amplificación de acuerdo con la presente invención puede realizarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Estos procedimientos de detección 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 tener 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, y no se requiere manipulación posterior a la amplificación. Un ensayo de amplificación homogéneo usando una sonda nucleasa 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 una sonda fluorescente o sondas marcadas con dos fluoróforos que interactúan. Los ejemplos de dichas sondas incluyen sondas tipo "baliza molecular" (Tyagi *et al.*, (1996) *Nat. Biotechnol.*, 14: 303-308) o sondas nucleasa marcadas fluorescentemente (Livak *et al.*, (1995) *PCR Meth. Appl.*, 4:357-362).

Aún otro modo de realización de la presente invención es un procedimiento en el que los productos de amplificación se detectan e identifican determinando sus temperaturas de fusión únicas ( $T_m$ ). En una variación del ensayo de fusión, se controla la fusión de un amplicón entero usando un compuesto fluorescente que se une específicamente a ácidos nucleicos dúplex. Específicamente, la medición del cambio de fluorescencia dependiente de la temperatura de los colorantes de intercalación dúplex se ha descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.871.908. La disminución de la fluorescencia refleja la fusión del amplicón, permitiendo determinar la  $T_m$  del amplicón.

En otro modo de realización de la presente invención, el híbrido se forma entre el ADN diana y una o más sondas marcadas fluorescentemente. Típicamente, las sondas están marcadas con al menos dos restos fluoróforos, formando un par FRET. En algunos modos de realización, uno de los restos que forman el par FRET es un extintor no fluorescente. Los restos que forman el par FRET pueden conjugarse con las mismas moléculas de sonda o con moléculas de sonda independientes. El cambio de temperatura que da lugar a la fusión o a la formación del híbrido molde-sonda se acompaña de un cambio medible en la fluorescencia, debido al cambio en la distancia física entre los miembros del par FRET. La medición del cambio dependiente de la temperatura en la fluorescencia de un colorante o colorantes conjugados con un par de sondas o con una sonda única se ha descrito en la patente de EE. UU. n.º 6.174.670. La identificación de un genotipo particular por su único  $T_m$  con un par de sondas marcadas se ha descrito en De Silva *et al.*, (1998) "Rapid genotyping and quantification on the LightCycler™ with hybridization probes," *Biochemica*, 2: 12-15.

La presente invención implica una PCR asimétrica. En una mezcla de PCR asimétrica, uno de los cebadores de amplificación está presente en mayor cantidad que el otro cebador. Los cebadores se denominan "cebador en exceso" y "cebador limitante", respectivamente. Las cadenas de ácido nucleico resultantes de la extensión de estos cebadores se denominan "cadena en exceso" y "cadena limitante", respectivamente. La proporción entre el cebador en exceso y el cebador limitante puede manipularse selectivamente y estar entre 200:1 y 2:1, pero típicamente entre aproximadamente 9:1 y 5:1. Debido a un exceso del cebador, la hebra en exceso se acumula de forma lineal en forma de hebra monocatenaria. Este exceso de cadena simple es útil para ciertos procedimientos de análisis post-PCR.

En algunos modos de realización, la presente invención implica una PCR asimétrica, seguida de una caracterización post-PCR de los amplicones a través del análisis de la temperatura de fusión. La PCR asimétrica seguida de un análisis de la  $T_m$  se ha descrito en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2007/0072211. En una reacción típica, la PCR asimétrica se lleva a cabo en presencia de una o más sondas marcadas. La fusión y apareamiento de las sondas se asocia con un cambio medible en la fluorescencia, que es reflejo de la formación o fusión del dúplex de ácido nucleico. Típicamente, en el contexto de la PCR asimétrica, las sondas de fusión están diseñadas para hibridarse con la "cadena en exceso", es decir, la hebra de amplicón que resulta de la extensión del cebador en exceso, y se acumula en una forma monocatenaria.

El diseño de sondas de hibridación es conocido en la técnica. Ya sea que la sonda sirva como una sonda nucleasa, una sola sonda de hibridación o un miembro de un par de sondas de hibridación, el diseño del oligonucleótido sonda se guía por los mismos principios, conocidos en la técnica y descritos en el presente documento y aplicados manualmente o con la ayuda de un software.

En algunos modos de realización de la presente invención, el oligonucleótido bloqueador, uniéndose adyacentemente a uno de los cebadores con el fin de suprimir la amplificación de la variante no deseada de la secuencia, también puede servir como sonda de hibridación o una sonda de fusión o ambas. Un experto en la técnica reconocerá inmediatamente los criterios de diseño aplicables a dichos oligonucleótidos de doble función. Específicamente, el oligonucleótido debe tener una temperatura de fusión híbrida diferente con las diferentes variantes de la secuencia diana, pero cada una de las temperaturas de fusión debe caer dentro del intervalo detectable en un sistema particular. En la mayoría de los casos, esto implicaría temperaturas de fusión que son sensiblemente distintas, pero relativamente próximas. En otros modos de realización de la invención, la sonda o sondas son oligonucleótidos independientes del oligonucleótido bloqueador.

Los oligonucleótidos sonda se pueden marcar mediante la incorporación de restos detectables por diversos procedimientos, incluyendo radiológicos, espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos o químicos. Para la detección basada en fluorescencia, los marcadores pueden incluir colorantes, por ejemplo de la familia de la fluoresceína (FAM, HEX, TET, JOE, NAN y ZOE), de la familia de la rodamina (Texas Red, ROX, R110, R6G y TAMRA), de la familia de la cianina Cy2, Cy3, Cy5 y Cy7), de la familia de las oxazinas, de la familia de la tiazina, de la familia de la escargotina y otras familias de colorantes fluorescentes adecuadas para el marcaje y la detección de ácidos nucleicos. Además, un colorante fluorescente puede emparejarse con un resto extintor no fluorescente, ejemplificado por Black Hole Quenchers™ (Biosearch Tech., Novato, CA), Eclipse Dark Quenchers™ (Epoch Biosciences, Bothell, Wash.) e Iowa Black (Integrated DNA Tech., Coralville, Iowa).

En algunos modos de realización, la presente invención implica la detección de mutaciones relacionadas con la enfermedad, incluyendo mutaciones relacionadas con el cáncer en presencia de las secuencias de ácido nucleico natural, es decir, no mutadas. Se sabe generalmente que durante la progresión del cáncer, las células tumorales acumulan mutaciones que confieren ventajas selectivas a las células mutantes, véase Downward, J. (2003)

*Targeting RAS signaling pathways in cancer therapy* (2005), Nature Rev. Cancer, 3:11 -22. A menudo, las mutaciones confieren resistencia a agentes antitumorales utilizados en terapia, véase Pao *et al.* (2005) *KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib and or erlotinib*, PLoS Medicine, 2(1), e17. La detección de dichas mutaciones evitará a los pacientes el problema y el riesgo innecesario asociado con tomar un medicamento ineficaz con efectos secundarios desagradables. Más ampliamente, la detección de las mutaciones relacionadas con el cáncer es informativo para el pronóstico de la enfermedad existente, así como para el diagnóstico precoz del cáncer.

En un modo de realización, la presente invención puede aplicarse a la detección de mutaciones somáticas que surgen en una subpoblación de células. Para amplificar y detectar con éxito la secuencia de ácido nucleico mutante, los cebadores de amplificación pueden diseñarse para hibridarse con las secuencias que flanquean el sitio de mutación sospechado. Para suprimir la amplificación de la secuencia natural, se puede diseñar un oligonucleótido bloqueador para que sea perfectamente (o casi perfectamente) complementario a la secuencia natural pero que tenga uno o más emparejamientos erróneos con la secuencia mutante. El diseño del oligonucleótido bloqueador debe asegurar que forma un híbrido estable con la secuencia natural pero que forma un híbrido inestable (o significativamente menos estable) con la secuencia mutante bajo las condiciones en las que se realizará el apareamiento y la extensión de los cebadores específicos. Por ejemplo, utilizando las herramientas disponibles de diseño de oligonucleótidos, se podría diseñar un oligonucleótido bloqueador, de tal manera que bajo las condiciones típicas de una reacción de amplificación, la temperatura de fusión del híbrido formado por el bloqueador y la secuencia natural fuera más alta a la temperatura de apareamiento utilizada durante el termociclado. Al mismo tiempo, la temperatura de fusión del híbrido formado por el bloqueador y la secuencia mutante sería menor que la temperatura de apareamiento utilizada durante el termociclado.

Los cebadores oligonucleotídicos, de acuerdo con la presente invención, pueden diseñarse para flanquear cualquier número de sitios de mutación sospechados de interés para una enfermedad o condición particular, como por ejemplo, mutaciones enumeradas en Downward, J. (2003), *supra*. La muestra de ácido nucleico, de acuerdo con la presente invención, se puede obtener a partir de tejidos de pacientes, frescos o conservados, y tejidos de control no enfermos, incluyendo tejidos embebidos en parafina fijados en formalina (FFPET).

A modo de ilustración solamente y no para limitar el alcance de la invención, el procedimiento se aplicó para detectar mutaciones en el gen KRAS, conocido por estar asociado con muchos tumores sólidos humanos. Se han encontrado mutaciones KRAS en el 20-30 % de los cánceres pulmonares no microcíticos, en el 30-40 % de los cánceres colorrectales y hasta en el 90 % de los cánceres de páncreas, Yeang *et al.*, (2008) *Combinatorial pattern of somatic gene mutations in cancer*, FASEB J, 22:2605-2622. Las mutaciones KRAS confieren resistencia a los fármacos dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La resistencia parece aplicarse a los fármacos dirigidos contra el EGFR independientemente del mecanismo de acción: tanto los inhibidores de la tirosina cinasa como los anticuerpos anti-EGFR pierden su eficacia frente a las células mutantes KRAS.

El gen KRAS es un objetivo especialmente adecuado para un ensayo de detección de mutaciones: aproximadamente el 99 % de todas las mutaciones ocurren en solo tres codones: codón 12 (88 %), codón 13 (10 %) y codón 61 (1-3 %). Dicho agrupamiento de mutaciones permite el diseño de un pequeño número de cebadores o sondas específicas de alelos que cubrirían todo el espectro de mutaciones clínicamente relevantes.

En otro aspecto, la invención proporciona una mezcla de reacción para la amplificación selectiva de ácidos nucleicos con la supresión específica de alelo de la amplificación de las variantes de secuencia no deseadas. La mezcla de reacción comprende un primer y un segundo oligonucleótidos, capaces de hibridarse con más de una variante de la secuencia diana, en al que al menos una fracción del segundo oligonucleótido contiene una base modificada en uno o más nucleótidos en o cerca del extremo 3' ; en la que dicha base modificada se modifica en el grupo amino exocíclico; un tercer oligonucleótido, capaz de hibridarse con la variante deseada de la secuencia diana con menor afinidad que con las variantes no deseadas de la secuencia diana y diseñado para hibridar entre 0 y 60 nucleótidos hacia el extremo 3' de dicho segundo oligonucleótido; una polimerasa de ácido nucleico que carece sustancialmente de actividad 5' - 3' nucleasa y que tiene capacidad de inicio en caliente; y opcionalmente, 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, y opcionalmente la detección, de ácidos nucleicos, incluyendo precursores de ácidos nucleicos, es decir, trifosfatos de nucleósidos, e iones orgánicos e inorgánicos, adecuados para el soporte de la actividad de la polimerasa, y opcionalmente un marcador detectable. De acuerdo con la presente invención, las cantidades del primer y segundo oligonucleótidos en la mezcla son desiguales, de manera que el primer oligonucleótido está presente en exceso. En algunos modos de realización, dicho tercer oligonucleótido está marcado. En algunos modos de realización de la invención, el ácido nucleico diana comprende toda o parte de la secuencia del gen KRAS. En algunos modos de realización, la secuencia diana incluye uno o más de los codones KRAS 12, 13 y 61.

En otro aspecto, la invención proporciona kits para llevar a cabo la amplificación selectiva de ácidos nucleicos con la supresión específica de alelo de la amplificación de las variantes de secuencia no deseadas. El kit generalmente incluye componentes específicos del ensayo, así como componentes generalmente requeridos para realizar ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. Como los componentes específicos del ensayo, el kit de la presente invención

incluye típicamente un primer y un segundo oligonucleótidos, capaces de hibridarse con más de una variante de la secuencia diana, en el que al menos una fracción del segundo oligonucleótido contiene una base modificada en uno o más nucleótidos en o cerca del extremo 3' ; En el que dicha base modificada se modifica en el grupo amino exocíclico; un tercer oligonucleótido, capaz de hibridarse con la variante deseada de la secuencia diana con menor afinidad que con las variantes no deseadas de la secuencia diana y diseñado para hibridar entre 0 y 60 nucleótidos hacia el extremo 3' de dicho segundo oligonucleótido; una polimerasa de ácido nucleico que carece sustancialmente de la actividad 5' - 3' nucleasa y que tiene capacidad de inicio en caliente; y opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico de control que comprende una cantidad de al menos una versión de la secuencia diana. De acuerdo con la presente invención, las cantidades del primer y segundo oligonucleótidos contenidos en el kit son desiguales, de manera que el primer oligonucleótido está presente en exceso. En algunos modos de realización, puede incluirse más de una versión de la secuencia de ácidos nucleicos de control. En algunos modos de realización, dicho tercer oligonucleótido está marcado. Como componentes generalmente requeridos para la amplificación, y opcionalmente la detección, de ácidos nucleicos, el kit de la presente invención incluye típicamente uno o más de 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 opcionalmente la detección, y un conjunto de instrucciones para llevar a cabo la amplificación específica de alelo de la presente invención.

### Ejemplos

Los ejemplos siguientes utilizan un fragmento del gen KRAS, exón 2 (SEQ ID NO: 1), figura 10, como la secuencia diana. Las secuencias mutantes contienen varias mutaciones de aminoácido tanto en el codón 12 como en el codón 13 del exón 2. Los codones 12 y 13 son las bases subrayadas en la SEQ ID NO: 1 que se muestra en la figura 10. La sonda (SEQ ID NO: 5) es totalmente complementaria con la secuencia natural. Las secuencias mutantes tienen uno o más emparejamientos erróneos con la sonda. En los ejemplos siguientes, la misma sonda (SEQ. ID NO: 5) se utiliza como sonda de detección de amplificación y como sonda de fusión. Además, la sonda sirve como supresor de la amplificación de la secuencia natural. Las secuencias del exón 3 se coamplificaron en la misma reacción con las secuencias del exón 2 de KRAS utilizando el cebador hacia el extremo 5' SEQ ID NO. 6, cebadores hacia el extremo 3' SEQ ID NO: 7 y la sonda de detección SEQ ID NO. 8. Por simplicidad, no se muestran los resultados de la amplificación de las secuencias del exón 3, detectadas en un canal de longitud de onda independiente. Las secuencias de los cebadores y de la sonda se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Secuencias de los cebadores y de la sonda KRAS

<b>Cebador en dirección 5' para exón 2</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
SEQ ID NO: 2	GGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGT
<b>Cebador en dirección 3' para exón 2</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
SEQ ID NO: 3	GAAUUAGEUGUAUEGUEAAGGEACTC
SEQ ID NO: 4	GAAUUAGEUGUAUEGUEAAGGEACTM
<b>Sonda para exón 2</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
SEQ ID NO: 5	FUGEEUAEIEEIEEAGEUEQp
<b>Cebador en dirección 5' para exón 3</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
SEQ ID NO: 6	GAGAAAEUEGUEUEEGGAUUAUUCTC
<b>Cebador en dirección 3' para exón 3</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
SEQ ID NO: 7	TCATGTACTGGTCCCTCATTGCAM
<b>Sonda para exón 3</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
(continuación)	
SEQ ID NO: 8	LAEUEEUCTTGACEUEGUQp

E = 5-metil dC  
U = 5-propinil dU

M = N<sup>4</sup>-bencil dC

I = dl (desoxiinosina)

F = fluoróforo donador cx-FAM (fluoresceína)

Q = extintor BHQ-2 Black Hole™

5 L = fluoróforo donador cx- EX (colorante HEX)

P = 3'fosfato

### Ejemplo 1

#### 10 **Análisis de amplificación y fusión de una diana natural y un mutante KRAS por separado**

Cada reacción de 50 µl contenía 10<sup>4</sup> copias de la secuencia diana natural o mutante, 0,7 µM del cebador hacia el extremo 5' (exceso) del exón 2 (SEQ ID NO: 2), 0,025 µM del cebador (limitante) hacia el extremo 3' del primer exón 2 (SEQ ID NO: 3, sin la modificación química) y 0,075 µM del cebador hacia el extremo 3' (limitante) del segundo exón 2 (SEQ. ID NO: 4 con la modificación química), 0,3 µM de la sonda de fusión del exón 2 (SEQ ID NO: 5), 0,7 µM del cebador (exceso) hacia el extremo 3' del exón (SEQ ID NO: 6), 0,1 µM del cebador hacia el extremo 3' (limitante) del exón 3 (SEQ ID NO: 7), 0,3 µM de la sonda de fusión del exón 3 (SEQ ID NO: 8), tricina 50 mM (pH 7,7), acetato de potasio 57 mM (pH 7,5), glicerol 8 %, DMSO 1 %, 200 µM de cada dATP, dCTP y dGTP, 400 µM de dUTP, dTTP 50 µM, Tween-20 0,01 %, 0,04 unidades/µl de uracil-N-glicosilasa (UNG), 0,6 unidades/µl de ADN polimerasa ΔZ05 GOLD y acetato de magnesio 3 mM. Se utilizó una mezcla de dos cebadores limitantes para el exón 2: ¼ del primer cebador (SEQ ID NO: 3) con una citosina 3'-terminal no modificada, y ¾ del segundo cebador (SEQ ID NO: 4) con una citosina 3'-terminal bencilada en N<sup>4</sup>. Esta proporción de dos cebadores limitantes en la reacción permitió un grado óptimo de supresión del tipo natural (véase el ejemplo 2): cuando el ADN mutante estaba ausente, se amplificó el ADN natural. Sin embargo, cuando el ADN mutante también estaba presente, el ADN mutante se amplificó preferentemente sobre el natural (datos no mostrados).

La amplificación y el análisis de fusión se realizaron usando el instrumento Roche LightCycler 480. Las reacciones se sometieron al siguiente perfil de temperatura: 50 °C durante 5 minutos (etapa UNG), 95 °C durante 10 minutos (activación de la polimerasa), seguido de 50 ciclos de 95 °C durante 10 segundos y 61 °C durante 40 segundos. Los datos de fluorescencia se recogieron al final de cada etapa de 61 °C para generar las curvas de amplificación (no mostradas). Las reacciones se sometieron a continuación al análisis de fusión: después del último ciclo de amplificación, la temperatura se elevó a 95 °C durante 1 segundo, se redujo a 40 °C durante 1 minuto, después se aumentó a 95 °C, mientras se medía la fluorescencia para cada aumento de temperatura de 1,0 °C. Finalmente, la temperatura se redujo a 40 °C para terminar el ensayo de fusión.

Los resultados del ensayo de fusión se muestran en la figura 2. Los datos brutos ("curvas de fusión") se muestran como fluorescencia en el intervalo de longitud de onda de 450-500 nm en función del cambio de temperatura. Los datos derivados ("picos de fusión") se muestran como una derivada primera (dF/dT) de la fluorescencia en el mismo intervalo de temperatura. Las dianas mutantes se muestran como líneas continuas y el molde natural se muestra como una línea discontinua. En este ejemplo, la sonda de fusión (SEQ ID NO: 5) emite luz fluorescente de la longitud de onda deseada cuando está unida al ácido nucleico diana en un dúplex. Con el aumento de la temperatura, se observa una disminución de la fluorescencia cuando la sonda se disocia del dúplex. En la forma disociada monocatenaria, la sonda asume una conformación en la que el extintor (BHQ-2) apaga la fluorescencia del fluoróforo (FAM).

Los resultados de la fig. 2 muestran un perfil de fusión distinto para las secuencias mutantes (líneas continuas) y la secuencia natural (línea discontinua). Las muestras mutantes se identifican mediante un pico máximo del punto de fusión (T<sub>m</sub>) inferior al de la muestra natural. La T<sub>m</sub> inferior se debe a un menor grado de complementariedad entre la sonda y la secuencia mutante. Los picos mutantes muestran variación en la T<sub>m</sub> porque las muestras contienen diferentes mutaciones en el codón 12 o codón 13.

### Ejemplo 2

#### 55 **Amplificación y detección específica de alelo de mutaciones KRAS en una mezcla de muestras natural y mutantes**

En este ejemplo, se realizó el análisis de amplificación y fusión sobre una mezcla de diana natural y una diana mutante en el mismo tubo. Cada reacción de 50 µl contenía 8.000 copias de ADN diana que comprende una mezcla de las secuencias silvestres y mutantes. La secuencia mutante comprendía 1 % o 5 % del número total de copias en la reacción, siendo el 99 % o 95 % restante la secuencia natural. El análisis de amplificación y fusión se realizó usando las condiciones y el perfil de temperatura como se describe generalmente para el ejemplo 1, con la modificación indicada para cada experimento particular. Los resultados se muestran en las figuras 3-8. Las dianas mutantes se identifican por un pico máximo de punto de fusión (T<sub>m</sub>) más bajo que el de las dianas natural. Las líneas continuas representan "condiciones supresoras", mientras que las líneas discontinuas representan las "condiciones de control" especificadas para cada experimento.

En la figura 3, las condiciones supresoras son: el cebador limitante es una mezcla de SEQ ID NO: 3 y 4 y la enzima tiene una capacidad de inicio en caliente ( $\Delta Z05$  GOLD). Las condiciones de control son: el cebador limitante es solo SEQ ID NO: 3 (sin la modificación química 3'-terminal) y la enzima no tiene capacidad de inicio en caliente ( $\Delta Z05$ ). Para la enzima  $\Delta Z05$ , el pH se ajustó a 8,3, y la etapa de activación de la polimerasa se eliminó del perfil de ciclo.

5 La figura 4 muestra los resultados de un experimento idéntico al de la figura 3, excepto que tanto las condiciones de supresión como las de control emplean el uso de la enzima de inicio en caliente  $\Delta Z05$  GOLD. La mezcla de SEQ ID NO: 3 y 4 para las condiciones supresoras, y SEQ ID NO: 3 (sin modificación química) para las condiciones de control.

10 La figura 5 muestra los resultados de un experimento idéntico al de la figura 3, excepto que tanto las condiciones de supresión como las de control emplean el uso de la enzima de inicio en caliente  $\Delta Z05$  GOLD. La mezcla de SEQ ID NO: 3 y 4 para las condiciones supresoras y SEQ ID NO: 4 solo (con modificación química) se utilizó para las condiciones de control. Los resultados demuestran que el uso de la combinación de cebadores tempera la cantidad de supresión y asegura que las secuencias natural se amplifican en ausencia de las secuencias mutantes.

15 La figura 6 muestra los resultados de un experimento idéntico al de la figura 3, excepto que tanto las condiciones supresoras como las de control emplean el uso de la mezcla de SEQ NO: 3 y 4. Las condiciones supresoras usan una enzima de inicio en caliente  $\Delta Z05$  GOLD, mientras que las condiciones de control utilizan una enzima  $\Delta Z05$  sin actividad de inicio en caliente.

20 La figura 7 muestra los resultados de un experimento idéntico al de la figura 3, excepto que tanto las condiciones de supresión como las de control emplean el uso de la SEQ NO: 4 solo (con una modificación química). Las condiciones supresoras usan una enzima de inicio en caliente  $\Delta Z05$  GOLD, mientras que las condiciones de control utilizan una enzima  $\Delta Z05$  sin actividad de inicio en caliente.

25 La figura 8 muestra los resultados de un experimento idéntico al de la figura 7, excepto que tanto las condiciones de supresión como las de control emplean el uso de la SEQ NO: 3 solo (sin modificación química). Como en el ejemplo ilustrado en la figura 7, las condiciones supresoras usan una enzima de inicio en caliente  $\Delta Z05$  GOLD, mientras que las condiciones de control usan una enzima  $\Delta Z05$  sin actividad de inicio en caliente. En este experimento, las condiciones "supresoras" no produjeron ninguna supresión.

30 Los resultados demuestran que la supresión de la amplificación natural mejora el rendimiento del amplicón mutante. Cuando la secuencia mutante constituye el 1 % de la secuencia diana total, la secuencia mutante no es detectable sin la supresión natural. A una concentración más alta de la secuencia mutante, el rendimiento de los amplicones mutantes también se mejora notablemente por la supresión natural.

### Ejemplo 3

#### 40 **La amplificación específica de alelo y la detección de mutaciones KRAS en muestras de tejidos embebidos en parafina fijados con formalina (FFPET)**

45 En este ejemplo, se realizaron análisis de amplificación y fusión sobre ADN extraído de siete muestras de FFPET obtenidas comercialmente. Cada reacción de 50  $\mu$ l contenía 25 ng de ADN de FFPET, extraído de secciones de tejido de 3 x 10  $\mu$ m y cuantificado en un espectrofotómetro Nanodrop. Se utilizó una reacción que contenía 5 % de la diana mutante mezclada con un 95 % de diana natural como control (línea discontinua). El análisis de amplificación y fusión se realizó usando las condiciones y el perfil de temperatura descritos en el ejemplo 1, excepto que los cebadores 3 y la sonda del exón no estaban presentes en la mezcla de reacción, la cantidad de polimerasa  $\Delta Z05$  GOLD se redujo a 0,3 unidades/ $\mu$ l y el acetato de magnesio se redujo a 2,5 mM. Los resultados se muestran en la

50 figuras 9 como picos de fusión. Las dianas mutantes se identifican por un pico máximo de punto de fusión ( $T_m$ ) más bajo que el de las dianas natural. Las líneas discontinuas muestran secuencias natural mientras que las líneas continuas muestran muestras de pacientes en las que están presentes las secuencias mutantes. Algunas muestras de pacientes contienen tanto las secuencias natural como las mutantes.

55 Se sabe que el ADN de FFPET está altamente fragmentado y es difícil de amplificar y detectar. Sin embargo, los resultados de la figura 9 muestran claramente la amplificación y detección exitosas del ADN mutante presente en el fondo del ADN natural de la muestra FFPET. La variación entre las  $T_m$  de las dianas mutantes refleja diferentes mutaciones del codón 12 o 13 del gen KRAS como se verifica por secuenciación (datos no presentados).

60 Aunque la invención se ha descrito en detalle con referencia a ejemplos específicos, será evidente para un experto en la técnica que pueden realizarse diversas modificaciones dentro del alcance de esta invención. Por lo tanto, el alcance de la invención no debería estar limitado por ninguno de los ejemplos descritos en el presente documento, sino por las reivindicaciones presentadas a continuación.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> F. Hoffmann-La Roche SA Roche Diagnostics GmbH
- 5 <120> AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO CON SUPRESIÓN ESPECÍFICA DE ALELO DE VARIANTES DE SECUENCIA
- <130> 24874 WO
- 10 <140> desconocido  
<141> desconocido
- <150> 61/143.113  
<151> 07,01/2009
- 15 <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1  
<211> 178  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*
- 25 <400> 1  
 tgacatgttc taatatagtc acattttcat tttttttatt ataaggcctg ctgaaaatga 60  
 ctgaatataa acttgtggta gttggagctg gtggcgtagg caagagtgcc ttgacgatac 120  
 agctaattca gaatcatttt gtggacgaat atgatccaac aatagaggta aatcttgt 178  
 <210> 2  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
- 35 <400> 2  
 ggctgctga aaatgactga atataaactt gt 32  
 <210> 3  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
- 45 <220>  
<223> Descripción de la molécula combinada de ADN/ARN: Cebador sintético
- 50 <400> 3  
 gaauuagcug uaucgucaag gcactc 26  
 <210> 4  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 55 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
- 60 <220>  
<223> Descripción de la molécula combinada de ADN/ARN: Cebador sintético

	<400> 4 <b>gaauuagcug uaucgucaag gcactc</b>	26
5	<210> 5 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética  <220>	
15	<223> Descripción de ADN combinado/molécula de ARN: sonda sintética  <220> <221> base_modificada <222> (8) .. (8)	
20	<223> Desoxiinosina  <220> <221> base_modificada <222> (11) .. (11)	
25	<223> Desoxiinosina  <400> 5 <b>ugccuacncc nccagcuc</b>	18
30	<210> 6 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético  <220> <223> Descripción de la molécula combinada de ADN/ARN: Cebador sintético	
35		
40	<400> 6 <b>gagaaaccug ucucucuugg auauuctc</b>	28
45	<210> 7 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 7 <b>tcatgtactg gtcctcatt gcac</b>	24
55	<210> 8 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética	
60	<220> <223> Descripción de la molécula combinada de ADN/ARN: Sonda sintética  <400> 8 <b>tcatgtactg gtcctcatt gcac</b>	24

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de amplificación selectiva de una variante deseada de una secuencia diana, cuya secuencia diana existe en forma de más de una variante, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 a) proporcionar una muestra que posiblemente comprende al menos una variante de la secuencia diana en una mezcla de reacción;
- b) proporcionar un primer oligonucleótido, capaz de hibridarse con más de una variante de la secuencia diana;
- 10 c) proporcionar un segundo oligonucleótido, capaz de hibridarse con más de una variante de la secuencia diana, en el que al menos una fracción de dicho segundo oligonucleótido contiene una base modificada en uno o más nucleótidos en o cerca del extremo 3' y en el que dicha base modificada está modificada en el grupo amino exocíclico;
- d) proporcionar un tercer oligonucleótido capaz de hibridarse con la variante deseada de la secuencia diana con menor afinidad que con las variantes no deseadas de la secuencia diana y diseñado para hibridarse con la misma cadena y entre 0 y 60 nucleótidos hacia el extremo 3' de dicho segundo oligonucleótido;
- 15 e) proporcionar una polimerasa de ácido nucleico que carece sustancialmente de actividad nucleasa 5'- 3';
- f) someter dicha mezcla de reacción a reacción en cadena de la polimerasa, en el que las cantidades de dichos oligonucleótidos primero y segundo son desiguales, de manera que el primer oligonucleótido está presente en exceso y dicho tercer oligonucleótido inhibe sustancialmente la extensión de dicho segundo oligonucleótido por dicha polimerasa de ácido nucleico cuando dicho tercer oligonucleótido se hibrida con la variante no deseada de la secuencia diana, pero no inhibe sustancialmente la extensión de dicho segundo oligonucleótido por dicha polimerasa de ácido nucleico cuando dicho tercer oligonucleótido se hibrida con la variante deseada de la secuencia diana.
- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha base modificada en dicho segundo oligonucleótido es una N<sup>4</sup>-bencil-2'-desoxicitidina.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos uno de dichos oligonucleótidos primero, segundo y tercero está marcado.
- 30 4. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la detección de la secuencia de ácido nucleico amplificada.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer oligonucleótido tiene la SEQ ID NO: 2, el segundo oligonucleótido tiene la SEQ ID NO: 3 y/o el tercer oligonucleótido tiene la SEQ ID NO: 5.
- 35 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha polimerasa de ácido nucleico posee capacidad de inicio en caliente.
7. Una mezcla de reacción para la amplificación selectiva de una variante deseada de una secuencia diana, cuya secuencia diana existe en forma de más de una variante, comprendiendo la mezcla:
- 40 a) un primer oligonucleótido, capaz de hibridarse con más de una variante de la secuencia diana;
- b) un segundo oligonucleótido, capaz de hibridarse con más de una variante de la secuencia diana, en el que al menos una fracción de dicho segundo oligonucleótido contiene una base modificada en uno o más nucleótidos en o cerca del extremo 3' y en el que dicha base modificada está modificada en el grupo amino exocíclico;
- 45 c) un tercer oligonucleótido, capaz de hibridarse con la variante deseada de la secuencia diana con menor afinidad que con las variantes no deseadas de la secuencia diana;
- d) una polimerasa de ácido nucleico que carece sustancialmente de actividad nucleasa 5'- 3';
- 50 en la que las cantidades de dichos oligonucleótidos primero y segundo son desiguales, de tal manera que el primer oligonucleótido está presente en exceso y dicho tercer oligonucleótido es capaz de inhibir de manera detectable la amplificación de dichas variantes no deseadas de la secuencia diana pero no la amplificación de dicha variante deseada de la secuencia diana.
8. La mezcla de reacción de la reivindicación 7, en la que dicha base modificada en dicho segundo oligonucleótido es una N<sup>4</sup>-bencil-2'-desoxicitidina.
- 55 9. La mezcla de reacción de la reivindicación 7, en la que al menos uno de dichos oligonucleótidos primero, segundo y tercero está marcado.
10. La mezcla de reacción de la reivindicación 7, que comprende además una cantidad de dicho ácido nucleico diana.
- 60 11. La mezcla de reacción de la reivindicación 7, en la que el primer oligonucleótido tiene la SEQ ID NO: 2, el segundo oligonucleótido tiene la SEQ ID NO: 3 y/o el tercer oligonucleótido tiene la SEQ ID NO: 5.
- 65 12. La mezcla de reacción de la reivindicación 7, en la que dicha polimerasa de ácido nucleico posee capacidad de

inicio en caliente.

13. Un kit para la amplificación selectiva de una variante deseada de una secuencia diana, cuya secuencia diana existe en forma de más de una variante, comprendiendo el kit:

- 5 a) un primer oligonucleótido, capaz de hibridarse con más de una variante de la secuencia diana;
- b) un segundo oligonucleótido, capaz de hibridarse con más de una variante de la secuencia diana, en el que al menos una fracción de dicho segundo oligonucleótido contiene una base modificada en uno o más nucleótidos en o cerca del extremo 3' y en el que dicha base modificada está modificada en el grupo amino exocíclico;
- 10 c) un tercer oligonucleótido, capaz de hibridarse con la variante deseada de la secuencia diana con menor afinidad que con las variantes no deseadas de la secuencia diana;
- d) una polimerasa de ácido nucleico que carece sustancialmente de actividad nucleasa 5'-3';
- e) los reactivos y soluciones necesarios para la amplificación de ácidos nucleicos;
- 15 en el que las cantidades de dichos oligonucleótidos primero y segundo son desiguales, de tal manera que el primer oligonucleótido está presente en exceso y dicho tercer oligonucleótido es capaz de inhibir de manera detectable la amplificación de dichas variantes no deseadas de la secuencia diana pero no la amplificación de dicha variante deseada de la secuencia diana.

14. El kit de la reivindicación 13, en el que la base modificada en dicho segundo oligonucleótido es una N<sup>4</sup>-bencil-2'-desoxicitidina.

- 20 15. El kit de las reivindicaciones 13 ó 14, que comprende además uno o más de un reactivo adecuado para minimizar la pirofosforólisis de ácidos nucleicos y un reactivo adecuado para la protección contra la contaminación cruzada de las reacciones de amplificación por ácidos nucleicos.

FIGURA 1

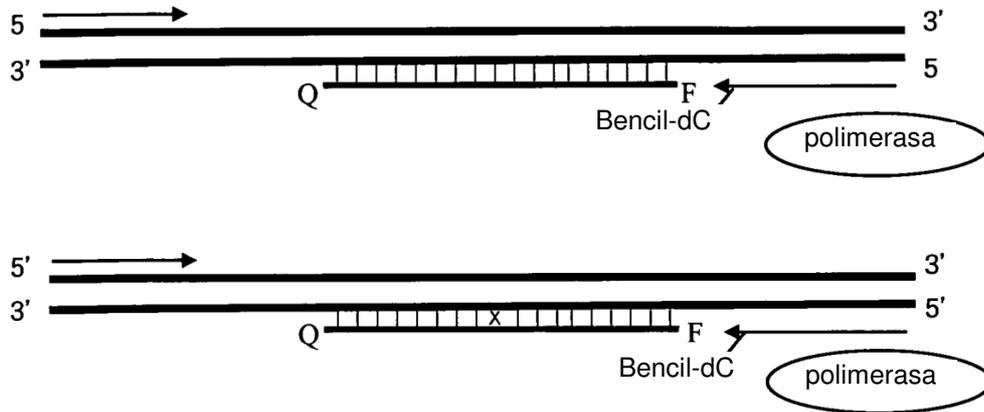


FIGURA 2

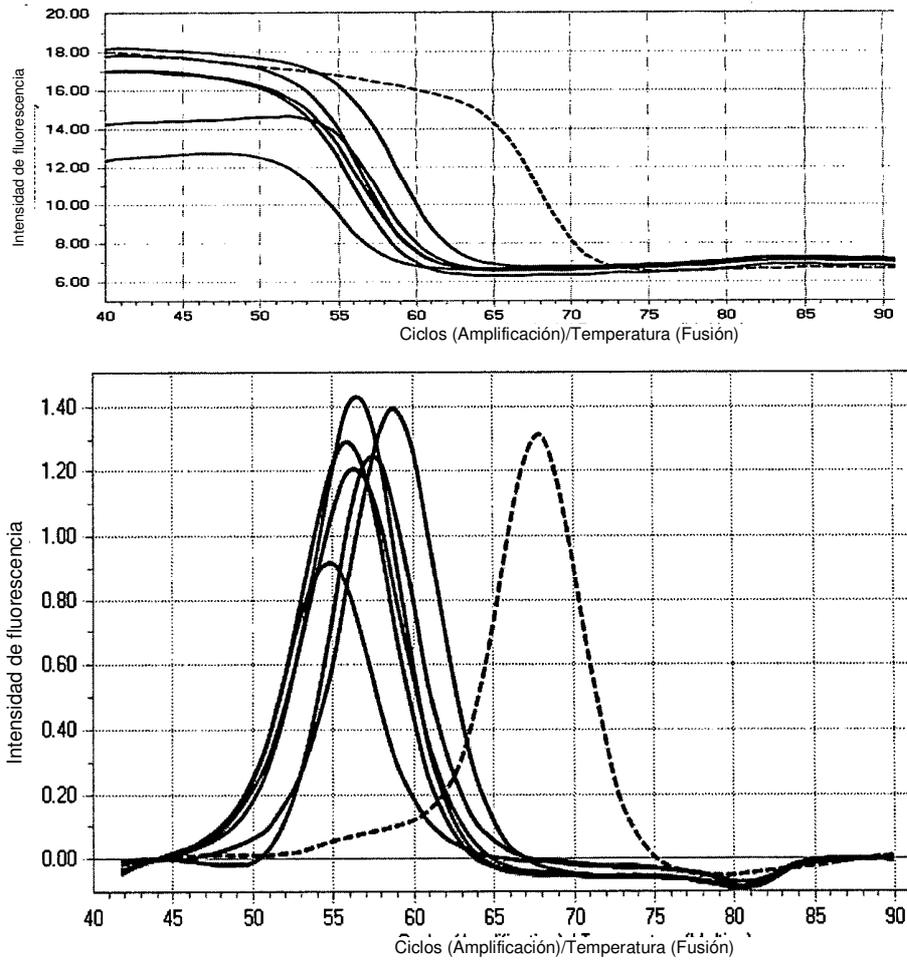


FIGURA 3

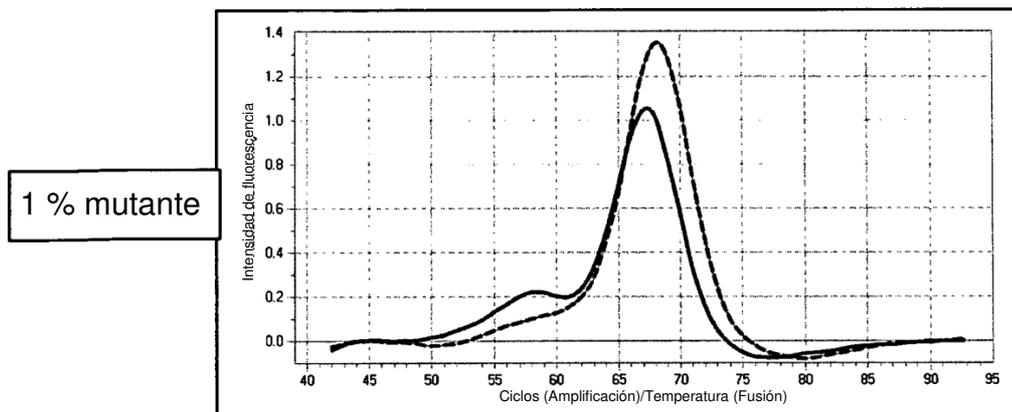
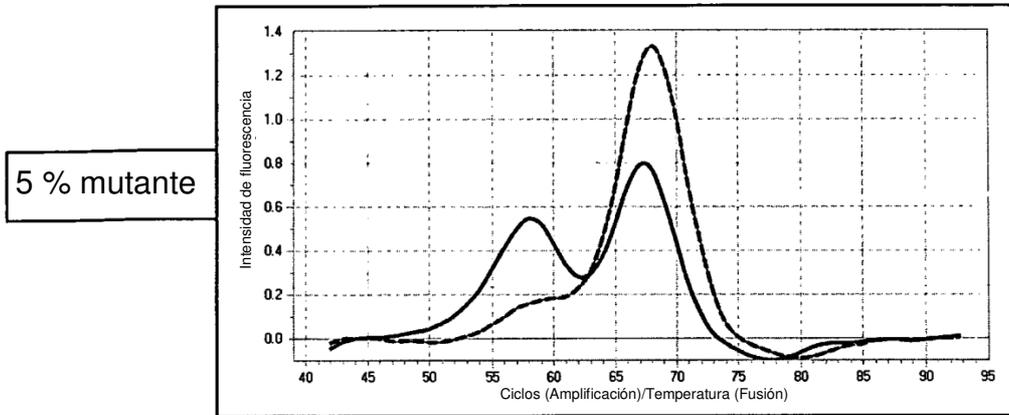


FIGURA 4

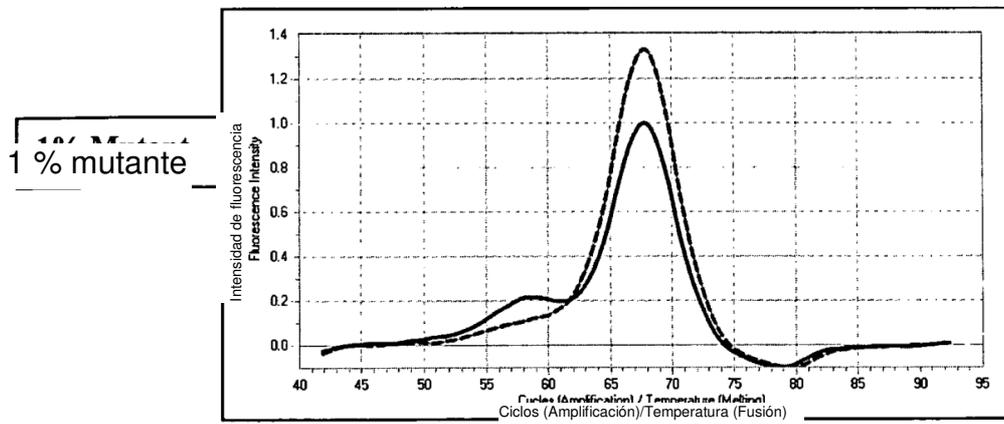
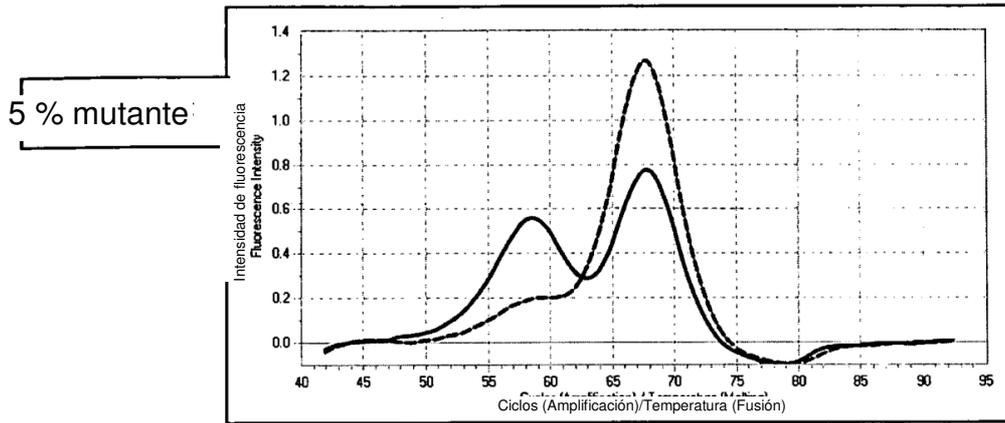


FIGURA 5

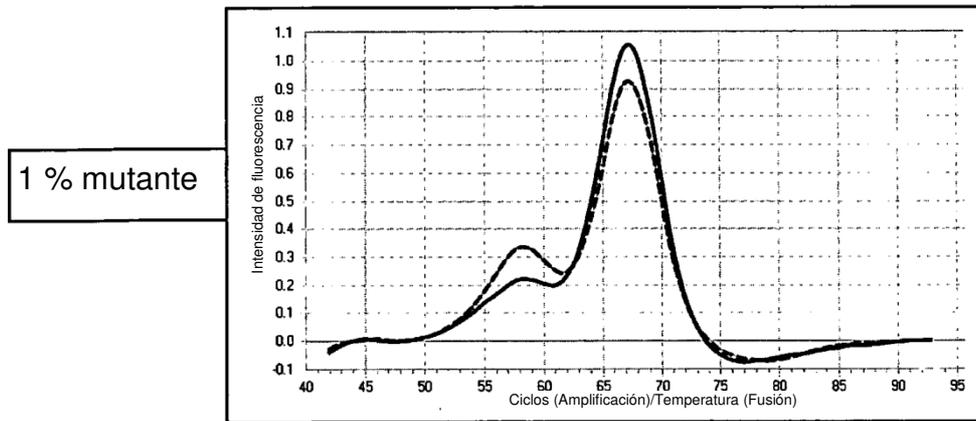
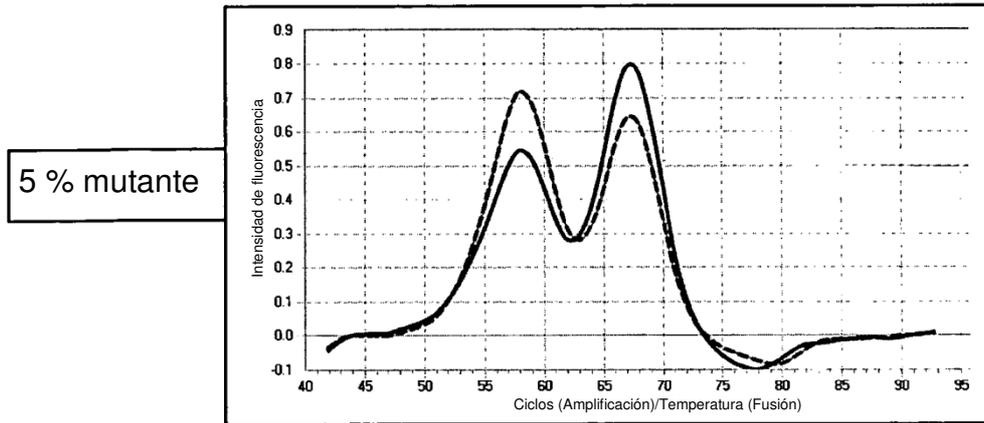


FIGURA 6

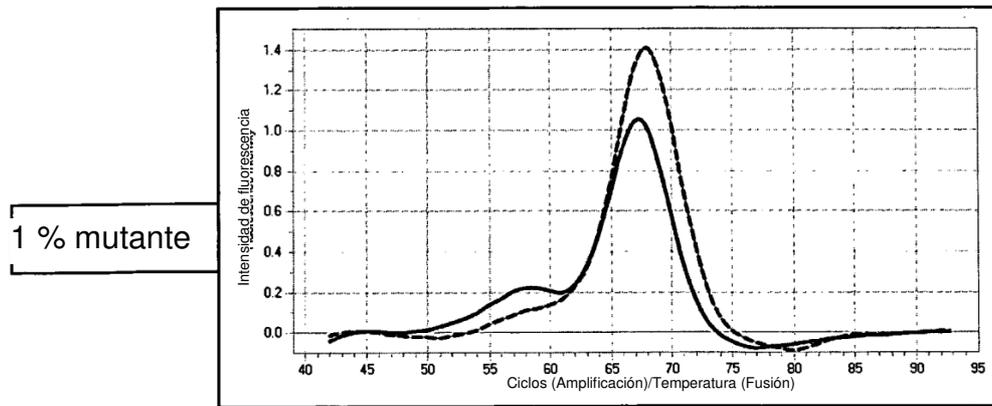
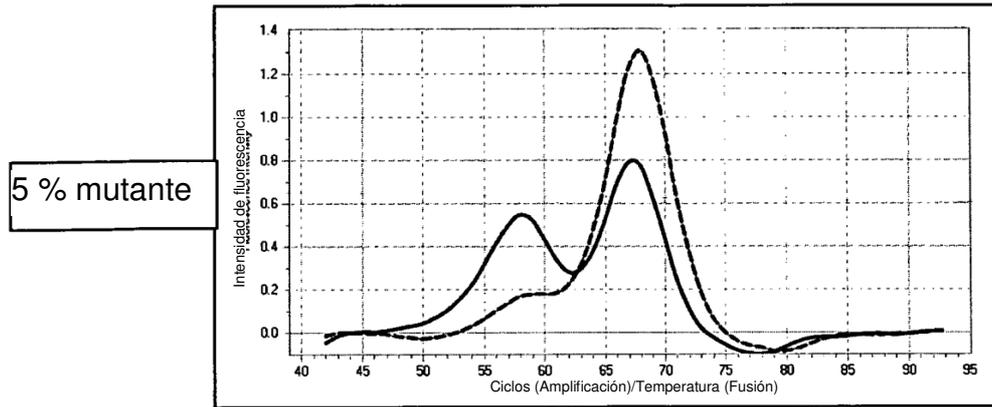


FIGURA 7

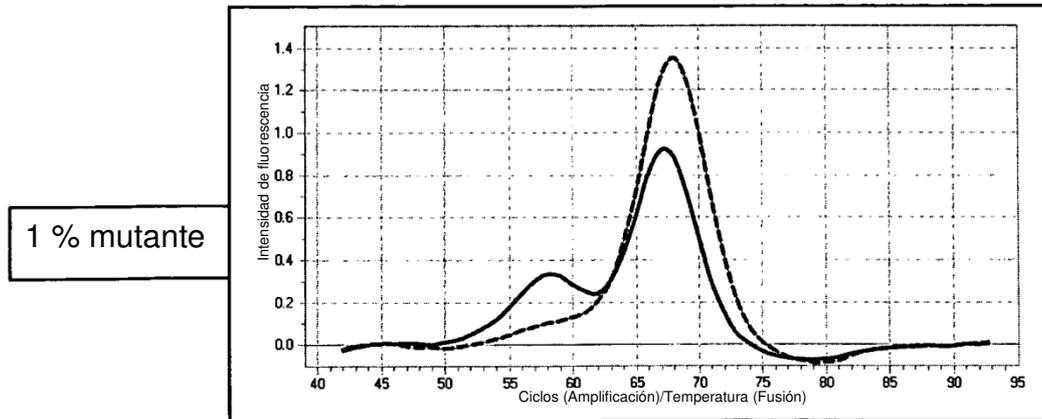
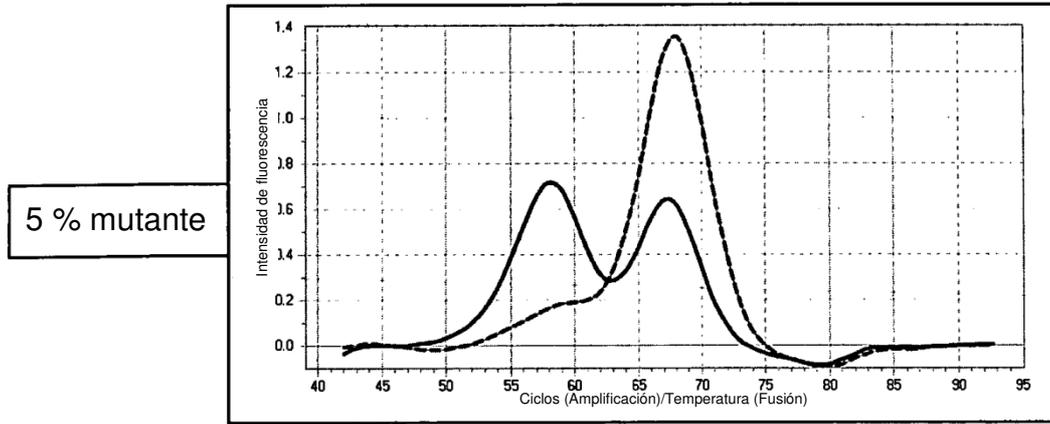


FIGURA 8

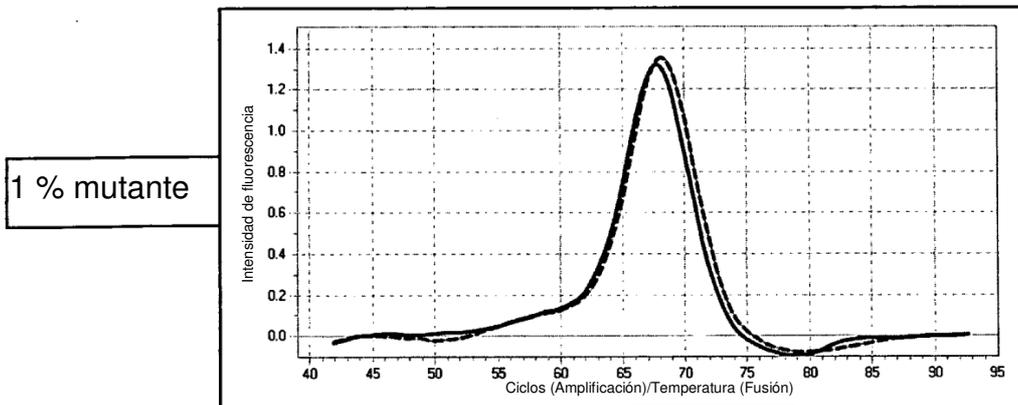
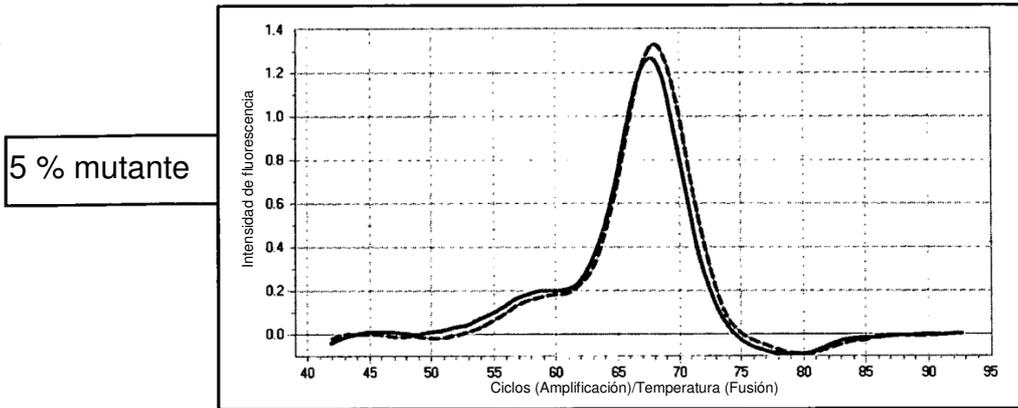


FIGURA 9

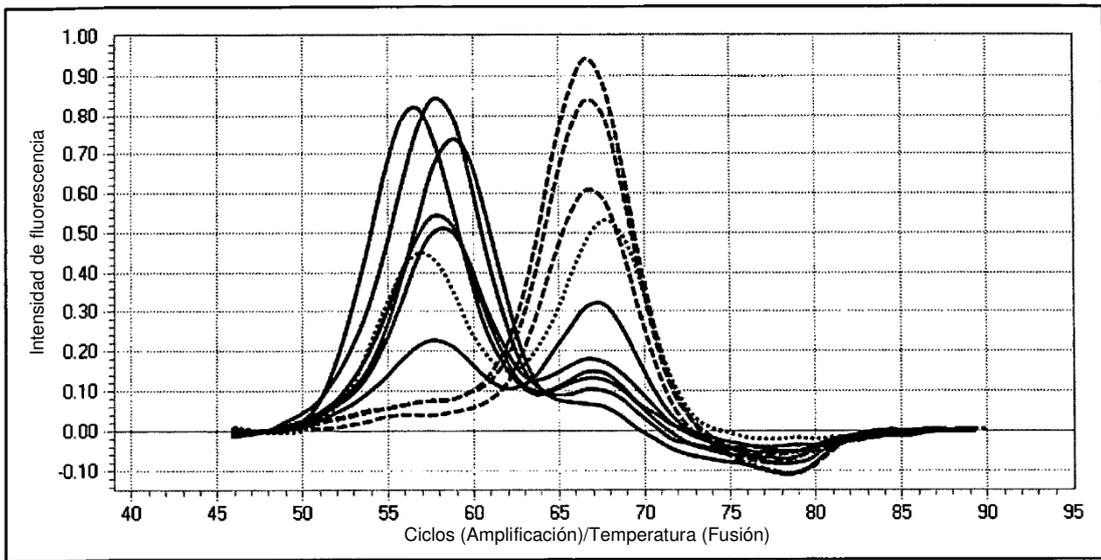


FIGURA 10

Secuencia diana

SEQ ID NO: 1 (amplicón de KRAS natural)

5'-TGACATGTTCTAATATAGTCACATTTTCATTATTTTATTATAAGGCCTGCT  
GAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGC  
CTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTGTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAG  
GTAAATCTTGT-3'