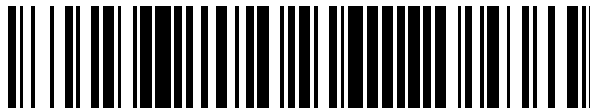


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 557**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2012 PCT/US2012/031527**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12135664**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12764286 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2691541**

54 Título: **Método para enriquecer secuencias mutantes monocatenarias a partir de una mezcla de secuencias naturales y mutantes**

30 Prioridad:

**31.03.2011 US 201161470022 P**

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

**27.02.2018**

73 Titular/es:

**DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.  
(100.0%)  
450 Brookline Avenue  
Boston, MA 02215, US**

72 Inventor/es:

**MAKRIGIORGOS, GERASSIMOS**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 656 557 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

Método para enriquecer secuencias mutantes monocatenarias a partir de una mezcla de secuencias naturales y mutantes

Antecedentes de la invención

5 Existe una demanda creciente de ensayos moleculares rápidos y sensibles para barrer un panel de mutaciones  
génicas de cáncer esenciales para diagnóstico y tratamiento personalizados. Suscitan especial interés determinadas  
mutaciones que sensibilizan a tumores para el tratamiento con fármaco, pronostican la carencia de respuesta o  
10 pronostican la emergencia de la resistencia. La coaparición de mutaciones puede complicar el escenario. Se  
proporciona un ejemplo en relación con el cáncer de pulmón. Mutaciones en el dominio de unión a ATP de EGFR  
pronostican la respuesta a los fármacos inhibidores pequeños de la tirosina cinasa erlotinib y gefitinib. Sin embargo,  
dichas mutaciones no ofrecen un panorama completo. La coaparición de mutaciones en los codones 12 y 13 de  
KRAS pronostican la resistencia a agentes anti-EGFR, incluso en presencia de mutaciones en el dominio de unión a  
ATP de EGFR. Además, las mutaciones de EGFR secundarias, especialmente la mutación T790M (que se presenta  
15 con frecuencia baja), limitan el beneficio del tratamiento dirigido a EGFR debido a resistencia al fármaco tras un  
tratamiento prolongado. Se han identificado mutaciones génicas de cáncer con coaparición en otros tipos de cáncer  
también. Por consiguiente, se desea obtener un perfil de los tumores individuales para identificar posibles  
mutaciones en diversos genes de forma simultánea.

Otro desafío importante en el diagnóstico molecular del cáncer humano es la llamativa heterogeneidad de las  
20 muestras tumorales que se someterán a barrido. Se sabe que el cáncer humano abarca una amplia gama de  
redistribuciones cromosómicas que incluyen grandes supresiones, inserciones y translocaciones, así como grandes  
cantidades de mutaciones somáticas. Quitando las mutaciones clonales, la mayoría de las mutaciones somáticas  
son aleatorias y están presentes solo en una pequeña fracción de las células cancerosas en un tumor. Sin embargo,  
estas mutaciones de bajo nivel podrían contribuir a la progresión del tumor y, en escenarios clínicos, a la rápida  
25 emergencia de resistencia al tratamiento. La contaminación de las células tumorales con exceso de células normales  
complica adicionalmente la detección de la mutación. Aunque se han descrito métodos de barrido de alto  
rendimiento fiables para mutaciones somáticas en líneas germinales o de prevalencia elevada (Thomas, R.K., et al.  
(2007) Nat Genet, 39, 347-351; Chou, L.S., et al. (2005) Am J Clin Pathol, 124; 330-338; Thomas, R.K., et al. (2006)  
Nat Med, 12; 852-855) la detección de mutaciones somáticas de baja prevalencia en tumores con heterogeneidad,  
contaminación estromal o en fluidos corporales todavía es problemática, y existe una gran necesidad de técnicas  
30 eficaces para identificar una porcentaje bajo de secuencias de ADN variantes («secuencias diana») en presencia de  
un gran exceso de secuencias no variantes («secuencias de referencia»).

Para resolver los problemas de detección de mutaciones de nivel bajo en muestras clínicas, recientemente se han  
descrito nuevas formas de PCR (coamplificación a temperatura de desnaturalización más baja o COLD-PCR y  
35 COLD PCR mejorada y con enriquecimiento completo o ice-COLD-PCR) que amplifican preferencialmente las  
secuencias que contienen una mutación con respecto a los alelos naturales (Li J, Wang L, Mamon H, Kulke MH,  
Berbeco R, Makrigiorgos GM. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant ADN sequences and redefines the  
sensitivity of genetic testing. Nat Med 2008;14:579-84; Milbury CA, Li J, Makrigiorgos GM. Ice-COLD-PCR enables  
rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown ADN mutations. Nucleic Acids Res;39:e2). Se  
ha demostrado que el límite de detección de varias técnicas de barrido de mutación y detección de mutación  
40 posterior que incluyen secuenciación, pirosecuenciación, dHPLC, fusión de alta resolución y genotipificación se  
pueden mejorar en gran medida a través de COLD-PCR (Li J, Milbury CA, Li C, Makrigiorgos GM. La secuenciación  
Sanger basada en la coamplificación de dos pasadas con PCR a temperatura de desnaturalización más baja  
(COLD-PCR) identifica un nuevo espectro de mutaciones de nivel bajo en el adenocarcinoma pulmonar. Hum Mutat  
2009;30:1583-90; Milbury CA, Li J, Makrigiorgos GM. COLD-PCR-enhanced high-resolution melting enables rapid  
45 and selective identification of low-level unknown mutations. Clin Chem 2009;55:2130-43; Mancini I, Santucci C,  
Sestini R, Simi L, Pratesi N, Cianchi F, et al. The use of COLD-PCR and high-resolution melting analysis improves  
the limit of detection of KRAS and BRAF mutations in colorectal cancer. J Mol Diagn;12:705-11; Boisselier B, Marie  
Y, Labussiere M, Ciccarino P, Desestret V, Wang X, et al. COLD PCR HRM: a highly sensitive detection method for  
IDH1 mutations. Hum Mutat;31:1360-5).

50 La COLD-PCR distingue entre secuencias mutantes y naturales al amplificar de forma preferencial los amplicones  
que tienen una temperatura de fusión más baja. Por lo tanto, las condiciones de ciclado aplicadas durante la COLD-  
PCR inducen la formación de heterodúplexes mutante:natural durante la amplificación y a continuación  
desnaturalizan de forma selectiva estos heterodúplexes a una temperatura crítica de desnaturalización,  $T_c$ , que  
favorece la desnaturalización de los heterodúplexes con respecto a los homodúplexes, (COLD-PCR completa). El  
55 enriquecimiento satisfactorio durante la COLD-PCR depende de la temperatura crítica de desnaturalización  $T_c$   
aplicada para un amplicón dado. A la  $T_c$ , los dúplexes de secuencias diana-referencia se desnaturalizan  
sustancialmente, mientras que los dúplexes diana-diana y los dúplexes de secuencias de referencia-referencia se  
mantienen sustancialmente no desnaturalizados. El valor de  $T_c$  para un amplicón dado normalmente es apenas  
menor que el valor de la temperatura de fusión  $T_m$  del amplicón. Para una primera aproximación, la  $T_c$  se determina  
60 empíricamente a partir de la temperatura de fusión  $T_m$  de un amplicón según la fórmula  $T_c = T_m - 1$  (Li J,  
Makrigiorgos GM. COLD-PCR: a new platform for highly improved mutation detection in cancer and genetic testing.

Biochem Soc Trans 2009;37:427-32). Para una determinación más precisa de la  $T_c$  óptima, se puede aplicar un procedimiento experimental para titular la temperatura de desnaturalización con respecto a muchas reacciones y determinar la  $T_c$  óptima, según se describe en la presente memoria.

Compendio de la invención

5 La invención se define en las reivindicaciones.

La COLD-PCR múltiple para enriquecer las mutaciones con respecto a múltiples amplicones sería muy valiosa dado que permitiría el barrido simultáneo de un panel de regiones de ADN y garantizaría la identificación de mutaciones de nivel bajo. Sin embargo, presenta una dificultad técnica, debido al hecho de que los amplicones diferentes poseen diferentes propiedades de fusión y, por lo tanto, una  $T_c$  diferente. Para amplificar a través de COLD-PCR diversos fragmentos de ADN de forma simultánea y lograr un enriquecimiento de la mutación sustancial en todas al mismo tiempo, se debe regular la  $T_m$  y/o la  $T_c$  de todos los fragmentos de ADN para que sean sustancialmente iguales, por ejemplo, con alrededor de  $\sim 0,2$  °C entre sí. La formación de dímeros de cebador, cada vez que se incluye más de un conjunto de cebadores, es otro problema que es común en aplicaciones de PCR múltiple. Se describen métodos y composiciones para COLD-PCR/ice-COLD-PCR múltiple para enriquecer de forma simultánea diversos alelos de escasa abundancia (secuencias diana mutantes) de una muestra. Un aspecto se refiere a la amplificación COLD-PCR/ice-COLD-PCR múltiple que se lleva a cabo de forma restringida en el espacio (p. ej., en microgotas, microcámaras, en emulsión en volúmenes de picolitro, sobre microperlas, sobre vidrio o sobre soportes sólidos alternativos). Se prepara de forma simultánea una población de fragmentos de ADN que tiene sustancialmente la misma temperatura de fusión (amplicones de iso- $T_m$  ADN) antes de iniciar la COLD-PCR/ice-COLD-PCR. Los amplicones de iso- $T_m$  ADN, en caso de que existan secuencias mutantes y naturales presentes, típicamente generarán heterodúplexes mutante:natural que tienen sustancialmente la misma temperatura crítica de desnaturalización (amplicones de iso- $T_c$  ADN). Los cebadores se diseñan a fin de que se prepare de forma simultánea una población de amplicones de ADN, en caso de que existan secuencias mutantes y naturales presentes que tienen sustancialmente la misma temperatura crítica de desnaturalización (amplicones de iso- $T_c$  ADN), antes de iniciar la COLD-PCR/ice-COLD-PCR. La amplificación por COLD-PCR/ice-COLD-PCR se lleva a cabo en fragmentos de ADN que tienen diferentes temperaturas de fusión y, por lo tanto, diferentes temperaturas críticas de desnaturalización, en un abordaje con temperatura gradual de manera que el enriquecimiento de la mutación se logre en todos los fragmentos de ADN diversos de forma simultánea (COLD-PCR independiente de la temperatura o TI-COLD-PCR).

30 En un aspecto de la descripción, se proporciona métodos y productos para preparar amplicones iso- $T_m$  y/o iso- $T_c$  a partir de ácidos nucleicos del hospedador.

Un método se refiere a preparar ácidos nucleicos para su procesamiento posterior. El procesamiento posterior, por ejemplo, puede ser secuenciación de última generación. El método implica poner en contacto los ácidos nucleicos del hospedador con al menos dos pares de cebadores de ácido nucleico, donde cada par de cebadores se une a los ácidos nucleicos y generar, en condiciones de amplificación de ácido nucleico, un amplicón que es una copia de una región de interés de los ácidos nucleicos, en donde el amplicón generado por un par de cebadores es diferente del amplicón generado a partir de cualquier otro par de cebadores. Los cebadores se seleccionan de forma tal que los amplicones generados mediante diferentes pares de cebadores tengan sustancialmente la misma  $T_m$  y/o sustancialmente la misma  $T_c$ . Las condiciones de amplificación de ácidos nucleicos se aplican para formar amplicones que tienen sustancialmente la misma  $T_m$  y/o  $T_c$  de los cebadores y ácidos nucleicos. Las condiciones de amplificación de ácidos nucleicos se aplican durante al menos 3 ciclos de amplificación, mediante los cuales se enriquece la presencia de las regiones de interés con respecto a regiones de ADN genómico no amplificadas. Más típicamente, las condiciones de amplificación de ácidos nucleicos se aplican durante al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 ciclos de amplificación, mediante los cuales se enriquece la presencia de las regiones de interés. De esta manera, se proporcionan numerosas copias de amplicones que representan regiones de ácido nucleico de interés, donde los amplicones tienen la misma  $T_m$  y/o  $T_c$ . Los al menos dos pares de cebadores de ácido nucleico son al menos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, 5000, 10.000 o 30.000 pares de cebadores. De esta manera, los amplicones representan al menos 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, 5000, 10.000 o 30.000 regiones de interés diferentes, donde todos los amplicones tienen sustancialmente la misma  $T_m$  y/o  $T_c$ . Las regiones de interés comprenden una secuencia que se sabe que está presente si existe enfermedad, que se sabe que pronostica el desarrollo de la enfermedad o que se sabe que pronostica el tratamiento satisfactorio de la enfermedad con un fármaco. Solo a modo de ejemplo, la enfermedad puede ser cáncer, enfermedad cardiovascular, diabetes, obesidad, trastornos neurológicos o enfermedades que se buscan en la sangre materna para el diagnóstico prenatal. Los amplicones de iso- $T_m$  y/o iso- $T_c$ , luego de preparados, se pueden utilizar en los procedimientos de COLD-PCR o ice-COLD-PCR y posteriormente secuenciación. El procedimiento de COLD-PCR o ice-COLD-PCR se puede llevar a cabo en un fluido con espacio restringido o en un sitio con espacio restringido sobre una superficie sólida. En una realización, el procedimiento se lleva a cabo en microgotas, cada microgota contiene solo un único par de cebadores específicos para generar amplicones de una única región de interés. La gota también contiene al menos la secuencia diana a la cual se une el par de cebadores. Según se describirá en mayor detalle más adelante, la gota se puede producir de diversas formas. Se pueden preparar muchas gotas, las diferentes gotas contienen diferentes pares de cebadores, pero todos los cebadores, según se describió anteriormente, generan amplicones que son iso- $T_m$  e/o iso- $T_c$ . A continuación, se

5 puede llevar a cabo la COLD-PCR o ice-COLD-PCR con cientos, miles o incluso millones de dichas gotas de forma simultánea. El método implica, además, enriquecer ácidos nucleicos para regiones de interés. Esto se puede hacer antes de llevar a cabo un método para preparar amplicones iso- $T_m$  e/o iso- $T_c$ . Esto se puede hacer después de llevar a cabo un método para preparar amplicones iso- $T_m$  e/o iso- $T_c$ . Se describe que las regiones de ácidos nucleicos de interés se enriquecen al poner en contacto los ácidos nucleicos con una pluralidad de oligonucleótidos de captura que se unen a diferentes regiones de interés, lo que permite unir los oligonucleótidos de captura con las regiones de interés y aislar los oligonucleótidos de captura con las regiones de interés unidas a ellos del resto de los ácidos nucleicos. Los oligonucleótidos de captura se pueden biotinilar en un extremo y/o los oligonucleótidos de captura se pueden acoplar a perlas. Los oligonucleótidos de captura se pueden acoplar como una micromatriz a una superficie. El método comprende, además, enriquecer los ácidos nucleicos para las regiones de interés al poner en contacto los ácidos nucleicos con sondas de inversión molecular, circularizar las sondas de inversión molecular de manera que abarquen las regiones de interés, retirar el ADN no circularizado y amplificar las regiones de interés a partir de las sondas de inversión molecular aisladas, circularizadas.

10 De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para enriquecer secuencias diana. El método comprende:

15 capturar secuencias mutantes y secuencias naturales dentro de una pluralidad de gotas, exponer las secuencias mutantes y las secuencias naturales dentro de las gotas a una mezcla de reacción que contiene pares de cebadores de ácido nucleico, cada par de cebadores genera, en condiciones de amplificación de ácido nucleico, un amplicón que es una copia de una región de una secuencia diana, en donde el amplicón generado por un par de cebadores es diferente del amplicón generado a partir de cualquier otro par de cebadores, en donde los amplicones tienen sustancialmente la misma  $T_m$  y/o  $T_c$ , y en donde cada gota se expone a solo un par de cebadores, someter las secuencias mutantes y las secuencias naturales en la mezcla de reacción a una primera temperatura de desnaturalización que es superior a la temperatura de fusión de las secuencias mutantes y las secuencias naturales,

20 reducir la temperatura de la mezcla de reacción para permitir la formación de dúplexes de cadena mutante/cadena natural,

25 someter los dúplexes en la mezcla de reacción a una temperatura crítica de desnaturalización  $T_c$  que es inferior a la  $T_m$  del dúplex formado por las secuencias diana naturales, para permitir la desnaturalización selectiva de los dúplexes que contienen secuencias mutantes, sin la desnaturalización de los dúplexes formados por secuencias diana naturales,

30 reducir la temperatura de la mezcla de reacción en presencia de pares de cebadores de ácido nucleico y permitir que los cebadores se apareen con las secuencias mutantes, y

extender los cebadores para enriquecer las secuencias mutantes.

Según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para enriquecer secuencias diana mutantes. El método comprende:

35 capturar las secuencias diana dentro de una pluralidad de gotas, de tal forma que cada gota contenga solo copias de una única secuencia de referencia y solo copias de la secuencia diana correspondiente,

40 exponer las secuencias diana y de referencia dentro de las gotas a una mezcla de reacción que contiene pares de cebadores de ácido nucleico que corresponden a la diana capturada dentro de cada gota y cada par de cebadores genera, en condiciones de amplificación de ácido nucleico, un amplicón que es una copia de una secuencia diana, en donde el amplicón generado por un par de cebadores es diferente del amplicón generado a partir de cualquier otro par de cebadores, en donde los amplicones tienen sustancialmente la misma  $T_m$  y/o  $T_c$ , y en donde cada gota se expone a solo un par de cebadores, solo la región de interés correspondiente y solo la secuencia de referencia correspondiente a la región de interés, someter las secuencias diana y las secuencias de referencia en la mezcla de reacción a una primera temperatura de desnaturalización que es superior a la temperatura de fusión de las secuencias diana y las secuencias de referencia,

45 reducir la temperatura de la mezcla de reacción para permitir la formación de dúplexes de cadena diana/cadena de referencia,

50 someter los dúplexes en la mezcla de reacción a una temperatura crítica de desnaturalización  $T_c$  que es inferior a la  $T_m$  del dúplex formado por las secuencias diana naturales y las secuencias de referencia, para permitir la desnaturalización selectiva de los dúplexes que contienen variantes de secuencia, sin la desnaturalización de los dúplexes formados por secuencias diana naturales con las secuencias de referencia,

reducir la temperatura de la mezcla de reacción en presencia de pares de cebadores de ácido nucleico y permitir que los cebadores se apareen con las secuencias diana, y extender los cebadores para enriquecer las secuencias diana mutantes.

La secuencia de referencia se forma sintéticamente y corresponde a la secuencia diana. En realizaciones, la secuencia de referencia es una copia de al menos una porción de la secuencia diana natural. En algunas realizaciones, la secuencia de referencia es igual a la secuencia de la secuencia natural diana.

5 En un aspecto de la presente descripción, se proporciona un kit. El kit es un envase que contiene al menos dos pares de cebadores de ácido nucleico. Cada par de cebadores se une a los ácidos nucleicos del hospedador y genera, en condiciones de amplificación de ácido nucleico, un amplicón que es una copia de una región de interés del genoma del hospedador, en donde el amplicón generado por un par de cebadores es diferente del amplicón generado a partir de cualquier otro par de cebadores y en donde los amplicones tienen sustancialmente la misma *Tm* y/o *Tc*. Cada amplicón puede tener al menos 40 nucleótidos de longitud. El hospedador puede ser un humano y cada región de interés se sabe que tiene o se sospecha que tiene una variación de secuencia entre los humanos. En algunos aspectos, el hospedador es un humano y al menos una región de interés se sabe que tiene o se sospecha que tiene una variación en una única posición de nucleótido dentro de la región de interés. En algunos aspectos, el hospedador es una bacteria, parásito o virus y cada región de interés se sabe que tiene o se sospecha que tiene una variación de secuencia.

15 En algunos aspectos, un cebador de cada par de cebadores se acopla a un sustrato sólido, p. ej., una perla. En otros aspectos, ambos cebadores de cada par de cebadores se acoplan a un sustrato. En algunos aspectos, el hospedador es un humano y las regiones de interés comprenden una secuencia que se sabe que está presente cuando se padece una enfermedad, que se sabe que pronostica el desarrollo de la enfermedad o que se sabe que pronostica el tratamiento satisfactorio de la enfermedad con un fármaco. En algunos aspectos, uno o ambos  
20 cebadores de cada par de cebadores tienen extremos en 5' que no se unen a la región de interés, en donde los extremos de los cebadores directos tienen la misma secuencia y los extremos de los cebadores inversos tienen la misma secuencia. En algunos aspectos, los al menos dos pares de cebadores de ácido nucleico son al menos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, 5000, 10.000 o 30.000 pares de cebadores. En algunos aspectos, el kit comprende, además, una polimerasa. En algunos aspectos, el kit comprende, además, al menos dos oligonucleótidos de captura que se unen a diferentes regiones de interés. En algunos aspectos, el kit comprende, además, perlas.

En algunos aspectos, el kit comprende, además, al menos dos oligonucleótidos de referencia diferentes, cada oligonucleótido de referencia diferente tiene una secuencia idéntica a una porción de, o a la totalidad de, una cadena de un amplicón correspondiente. Cada oligonucleótido de referencia diferente puede excluir la secuencia que aparece en los extremos de la cadena de su amplicón correspondiente, y cada oligonucleótido de referencia diferente puede no superponerse sustancialmente con el par de cebadores que genera su amplicón correspondiente. En algunos aspectos, cada oligonucleótido de referencia se biotinila en un extremo. En cualquiera de los aspectos precedentes, la secuencia de referencia puede ser una secuencia de captura. En algunos aspectos, el kit comprende, además, perlas recubiertas con estreptavidina.

30 En algunos aspectos, cada par de cada par de cebadores se acopla a una perla y el kit comprende, además, al menos dos oligonucleótidos de referencia diferentes, cada oligonucleótido de referencia diferente tiene una secuencia idéntica a una porción de una cadena de un amplicón correspondiente. Cada oligonucleótido de referencia diferente puede excluir la secuencia que aparece en los extremos de la cadena de su amplicón correspondiente. Cada oligonucleótido de referencia diferente puede no superponerse sustancialmente con el par de cebadores que genera su amplicón correspondiente. En algunos aspectos, cada oligonucleótido de referencia se biotinila en un extremo. En algunos aspectos, las perlas están recubiertas con estreptavidina.

35 Finalmente, también se sabe que algunas regiones genómicas pueden ser polimórficas (es decir, contienen polimorfismos de un solo nucleótido, SNP (por sus siglas en inglés), y por lo tanto puede haber al menos dos versiones diferentes de cada región de interés en el ADN genómico humano). Por consiguiente, en algunos aspectos, puede haber al menos dos versiones diferentes de cada oligonucleótido de referencia, cada versión representa los diferentes polimorfismos que se sabe que existen para una región de interés en el ADN genómico, p. ej., una versión que tiene una G y otra que tiene una A por un SNP G/A, entre otras).

Según un aspecto de la presente descripción, se proporciona un kit que comprende un par de cebadores de ácido nucleico y un oligonucleótido de referencia. El par de cebadores se une a los ácidos nucleicos del hospedador y genera, en condiciones de amplificación de ácido nucleico, un amplicón que es una copia de una región de interés del genoma del hospedador. El oligonucleótido de referencia diferente tiene una secuencia idéntica a una porción de una cadena del amplicón. El oligonucleótido de referencia puede excluir la secuencia que aparece en los extremos de la cadena del amplicón. El oligonucleótido de referencia puede no superponerse sustancialmente con ninguno de los cebadores. En algunos aspectos, el oligonucleótido de referencia se biotinila en un extremo. En algunos aspectos, el kit comprende, además, perlas recubiertas con estreptavidina.

Según un aspecto de la presente descripción, se proporciona una composición de materia que comprende una perla, un oligonucleótido de referencia acoplado a la perla y un cebador correspondiente acoplado a la perla. El oligonucleótido de referencia acoplado a la perla tiene una secuencia que es una porción de una cadena de un amplicón derivado de los ácidos nucleicos de un hospedador. El oligonucleótido de referencia puede excluir la secuencia que está en los extremos de la cadena del amplicón. El cebador correspondiente acoplado a la perla es el

complemento de la secuencia en un extremo de la cadena del amplicón y no se superpone sustancialmente con la secuencia de referencia. En algunos aspectos, el oligonucleótido de referencia es una pluralidad de oligonucleótidos de referencia que tienen diferentes secuencias, y en donde el cebador es el complemento de la secuencia en un extremo de la cadena de solo un único amplicón y en donde el amplicón corresponde al oligonucleótido de captura unido a la perla. Finalmente, en otro aspecto, ambos cebadores para amplificar una región de interés dada se pueden acoplar a la perla.

Según un aspecto de la presente descripción, se proporciona una mezcla de reacción que comprende al menos dos pares de cebadores de ácido nucleico. Cada par de cebadores se une a los ácidos nucleicos del hospedador y genera, en condiciones de amplificación de ácido nucleico, un amplicón que es una copia de una región de interés del genoma del hospedador, en donde el amplicón generado por un par de cebadores es diferente del amplicón generado a partir de cualquier otro par de cebadores y en donde los amplicones tienen sustancialmente la misma  $T_m$  y/o  $T_c$ . En algunas realizaciones, cada amplicón tiene al menos 40 nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, el hospedador es un humano y cada región de interés se sabe que tiene o se sospecha que tiene una variación de secuencia entre los humanos. En algunos aspectos, el hospedador es un humano y al menos una región de interés se sabe que tiene o se sospecha que tiene una variación en una única posición de nucleótido dentro de la región de interés. En algunos aspectos, el hospedador es una bacteria, parásito o virus y cada región de interés se sabe que tiene o se sospecha que tiene una variación de secuencia.

En algunos aspectos, un cebador de cada par de cebadores se acopla a un sustrato, p. ej., una perla. En algunos aspectos, ambos cebadores de cada par de cebadores se acoplan a un sustrato. En algunos aspectos, el hospedador es un humano y las regiones de interés comprenden una secuencia que se sabe que está asociada con una enfermedad, que se sabe que pronostica el desarrollo de una enfermedad o que se sabe que pronostica el tratamiento satisfactorio con un fármaco. En algunos aspectos, los pares de cebadores tienen extremos que no se unen a la región de interés, en donde los extremos de los cebadores directos tienen la misma secuencia y los extremos de los cebadores inversos tienen la misma secuencia. En algunos aspectos, los al menos dos pares de cebadores de ácido nucleico son al menos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, 5000, 10.000 o 30.000 pares de cebadores. En algunos aspectos, la mezcla de reacción comprende, además, una polimerasa.

En algunos aspectos, la mezcla de reacción comprende los amplicones iso- $T_m$  y/o iso- $T_c$  generados por los pares de cebadores.

Según un aspecto de la presente descripción, se proporciona una mezcla de reacción que comprende al menos cinco amplicones diferentes. Cada amplicón es una copia de una región de interés diferente del genoma del hospedador, en donde cada amplicón está presente en al menos 10 copias y donde los amplicones tienen sustancialmente la misma  $T_m$  y/o  $T_c$ . En algunos aspectos, sustancialmente todos los amplicones en la mezcla de reacción tienen sustancialmente la misma  $T_m$  y/o  $T_c$ .

En algunos aspectos, el hospedador es un humano y cada región de interés se sabe que tiene o se sospecha que tiene una variación de secuencia entre los humanos. En algunos aspectos, el hospedador es un humano y al menos una región de interés se sabe que tiene o se sospecha que tiene una variación en una única posición de nucleótido dentro de la región de interés. En algunos aspectos, el hospedador es una bacteria, parásito o virus y cada región de interés se sabe que tiene o se sospecha que tiene una variación de secuencia.

En algunos aspectos, la mezcla de reacción comprende, además, una perla que se acopla a un ácido nucleico que tiene una secuencia de referencia al menos en parte idéntica a una cadena de un amplicón. En algunos aspectos, el hospedador es un humano y las regiones de interés comprenden una secuencia que se sabe que está asociada con cáncer, que se sabe que pronostica la enfermedad o que se sabe que pronostica el tratamiento satisfactorio con un fármaco. En algunos aspectos, los al menos 5 amplicones diferentes son al menos 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1.000, 5.000, 10.000, 10.000 o 30.000 amplicones diferentes. En algunos aspectos, la mezcla de reacción comprende, además, pares de cebadores de ácido nucleico, cada par de cebadores genera, en condiciones de amplificación de ácido nucleico, uno de los al menos 5 amplicones. En algunos aspectos, la mezcla de reacción comprende, además, heterodúplexes, en donde los heterodúplexes se forman con amplicones que tienen sustancialmente la misma secuencia.

Según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para enriquecer secuencias diana mutantes. El método comprende

(a) exponer una pluralidad de secuencias diana a una mezcla de reacción que contiene pares de cebadores de ácido nucleico, cada par de cebadores genera, en condiciones de amplificación de ácido nucleico, un amplicón que es una copia de una secuencia diana, en donde el amplicón generado por un par de cebadores es el de una diana diferente del amplicón generado a partir de cualquier otro par de cebadores,

(b) someter las secuencias diana en la mezcla de reacción a una temperatura de desnaturalización que es superior a la temperatura de fusión de las secuencias diana naturales,

(c) reducir la temperatura de la mezcla de reacción para permitir la formación de heterodúplexes de cadena diana mutante:natural,

(d) someter los heterodúplexes en la mezcla de reacción a una primera temperatura crítica de desnaturalización  $T_c$  que es inferior a la  $T_m$  más baja del dúplex formado por las secuencias diana naturales y las secuencias de referencia, para permitir la desnaturalización selectiva de los heterodúplexes que contienen variantes de secuencia, sin la desnaturalización de los dúplexes formados por secuencias diana naturales,

5 (e) reducir la temperatura de la mezcla de reacción en presencia de pares de cebadores de ácido nucleico y permitir que los cebadores se apareen con las secuencias diana mutantes,

(f) extender los cebadores para enriquecer las secuencias mutantes, y

10 (g) repetir las etapas (d) a (f) al menos una vez a una segunda temperatura crítica de desnaturalización que es superior a la primera temperatura crítica de desnaturalización para permitir la amplificación de las secuencias diana mutantes que tiene la  $T_c$  natural:mutante a la segunda temperatura crítica de desnaturalización.

En algunos aspectos, la mezcla de reacción comprende una secuencia de referencia que es igual a la secuencia diana natural.

15 En algunos aspectos, las etapas (d) a (f) se repiten al menos 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 veces a temperaturas críticas de desnaturalización crecientes sucesivamente. En algunos aspectos, a cada temperatura crítica de desnaturalización, las etapas (d) a (f) se repiten durante dos o más ciclos. En algunos aspectos, a cada temperatura crítica de desnaturalización, las etapas (d) a (f) se repiten durante 5-40 ciclos. En algunos aspectos, a cada temperatura crítica de desnaturalización, las etapas (d) a (f) se repiten durante 10-30 ciclos.

Según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para enriquecer secuencias diana mutantes. El método comprende

20 (a) exponer las secuencias diana y las secuencias de referencia a una mezcla de reacción que contiene pares de cebadores de ácido nucleico, cada par de cebadores genera, en condiciones de amplificación de ácido nucleico, un amplicón que es una copia de una secuencia diana, en donde el amplicón generado por un par de cebadores es el de una diana diferente del amplicón generado a partir de cualquier otro par de cebadores,

25 (b) someter las secuencias diana y las secuencias de referencia en la mezcla de reacción a una temperatura de desnaturalización que es superior a la temperatura de fusión de las secuencias diana y las secuencias de referencia,

(c) reducir la temperatura de la mezcla de reacción para permitir la formación de dúplexes de cadena diana/cadena de referencia,

30 (d) someter los dúplexes en la mezcla de reacción a una primera temperatura crítica de desnaturalización  $T_c$  que es inferior a la  $T_m$  más baja del dúplex formado por las secuencias diana naturales y las secuencias de referencia, para permitir la desnaturalización selectiva de los dúplexes que contienen variantes de secuencia, sin la desnaturalización de los dúplexes formados por secuencias diana naturales con las secuencias de referencia,

(e) reducir la temperatura de la mezcla de reacción en presencia de pares de cebadores de ácido nucleico y permitir que los cebadores se apareen con las secuencias diana,

(f) extender los cebadores para enriquecer las secuencias diana,

35 (g) repetir las etapas (d) a (f) al menos una vez a una segunda temperatura crítica de desnaturalización que es superior a la primera temperatura crítica de desnaturalización para garantizar la amplificación de todas las secuencias diana con respecto a las secuencias de referencia.

En algunos aspectos, la secuencia de referencia es igual a la secuencia diana natural.

40 En algunos aspectos, las etapas (d) a (f) se repiten al menos 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 veces a temperaturas críticas de desnaturalización crecientes sucesivamente. En algunos aspectos, a cada temperatura crítica de desnaturalización, las etapas (d) a (f) se repiten durante dos o más ciclos. En algunos aspectos, a cada temperatura crítica de desnaturalización, las etapas (d) a (f) se repiten durante 5-40 ciclos. En algunos aspectos, a cada temperatura crítica de desnaturalización, las etapas (d) a (f) se repiten durante 10-30 ciclos.

45 De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para enriquecer secuencias diana. El método comprende

50 (a) exponer las secuencias diana y las secuencias de referencia a una mezcla de reacción que contiene pares de cebadores de ácido nucleico, cada par de cebadores genera, en condiciones de amplificación de ácido nucleico, un amplicón que es una copia de una secuencia diana y una secuencia de referencia, en donde el amplicón generado por un par de cebadores es el de una secuencia diana diferente del amplicón generado a partir de cualquier otro par de cebadores,

(b) someter las secuencias diana y las secuencias de referencia en la mezcla de reacción a una temperatura de desnaturalización que es superior a la temperatura de fusión de las secuencias diana y las secuencias de referencia,

(c) reducir la temperatura de la mezcla de reacción en presencia de pares de cebadores de ácido nucleico y permitir que los cebadores se apareen con las secuencias diana,

5 (d) extender los cebadores para enriquecer las secuencias diana,

(e) someter los dúplexes en la mezcla de reacción a una primera temperatura crítica de desnaturalización  $T_c$  que es inferior a la  $T_m$  más baja del dúplex formado por las secuencias diana naturales y las secuencias de referencia, para permitir la desnaturalización selectiva de los dúplexes que contienen variantes de secuencia, sin la desnaturalización de los dúplexes formados por secuencias diana naturales con las secuencias de referencia,

10 (g) repetir las etapas (c) a (e) al menos una vez a una segunda temperatura crítica de desnaturalización que es superior a la primera temperatura crítica de desnaturalización para garantizar la amplificación selectiva de todas las secuencias diana que contienen variantes de secuencia con respecto a las secuencias naturales.

En algunos aspectos, la secuencia de referencia es igual a la secuencia diana natural.

15 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para preparar una secuencia diana mutante monocatenaria a partir de una mezcla de secuencias diana que se sospecha que contienen la secuencia diana mutante y una secuencia diana natural. El método comprende:

20 (i) someter las secuencias diana a una temperatura de desnaturalización que es superior a la temperatura de fusión de las secuencias diana, formar de esta manera una mezcla que contiene la secuencia mutante monocatenaria y secuencias naturales monocatenarias, la mezcla se caracteriza por una relación de secuencias mutantes monocatenarias con respecto a secuencias naturales monocatenarias,

(ii) poner en contacto la mezcla con un exceso de una secuencia de referencia complementaria a la secuencia natural,

25 (iii) reducir la temperatura para permitir la formación de dúplexes de cadena diana/cadena de referencia, en donde los dúplexes incluyen dúplexes de cadena mutante/cadena de referencia y dúplexes de cadena natural/cadena de referencia,

(iv) someter los dúplexes de cadena diana/cadena de referencia a una temperatura crítica de desnaturalización  $T_c$  que es inferior a la temperatura de fusión de los dúplexes de cadena natural/cadena de referencia, para permitir la desnaturalización selectiva de los dúplexes de cadena mutante/cadena de referencia,

(v) retirar los dúplexes de cadena natural/cadena de referencia,

30 con lo cual aumenta la relación de secuencias diana mutantes monocatenarias con respecto a las secuencias diana naturales monocatenarias.

En algunas realizaciones, el método para preparar una secuencia diana mutante monocatenaria comprende, además,

35 (vi) repetir (iii), (iv) y (v) al menos 1, 2, 3, 5, 10, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 veces para enriquecer adicionalmente las secuencias diana mutantes monocatenarias.

En algunas realizaciones, el método para preparar una secuencia diana mutante monocatenaria comprende, además,

(vi) agregar un exceso adicional de secuencia de referencia,

40 (vii) repetir (iii) - (vi) al menos 1, 2, 3, 5, 10, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 veces para enriquecer adicionalmente las secuencias diana mutantes monocatenarias.

45 En cualquiera de las realizaciones precedentes del método para preparar una secuencia diana mutante monocatenaria, las secuencias de referencia se pueden acoplar a partículas. En cualquiera de las realizaciones precedentes del método para preparar una secuencia diana mutante monocatenaria, las secuencias de referencia se acoplan a partículas magnéticas. En algunas realizaciones, las secuencias diana en (i) se ponen en contacto con un exceso de al menos dos secuencias de referencia diferentes, cada secuencia de referencia diferente es complementaria a una secuencia diana natural diferente, y los dúplexes formados por las secuencias naturales/secuencias de referencia tienen sustancialmente la misma temperatura de fusión, o sustancialmente la misma temperatura crítica de desnaturalización ( $T_c$ ). En algunas realizaciones, las secuencias diana en (i) se ponen en contacto con un exceso de al menos 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500 o 1000 secuencias de referencia diferentes.

50



En cualquiera de las realizaciones precedentes del método para preparar una secuencia diana mutante monocatenaria, el método comprende, además, detectar las secuencias diana mutantes monocatenarias. En cualquiera de las realizaciones precedentes del método para preparar una secuencia diana mutante monocatenaria, el método comprende, además, aislar las secuencias diana mutantes monocatenarias.

- 5 En algunas realizaciones, las secuencias diana mutantes monocatenarias se aíslan al:  
poner en contacto las secuencias diana mutantes monocatenarias con cebadores,  
reducir la temperatura para permitir la unión de los cebadores a las secuencias diana mutantes monocatenarias,  
extender enzimáticamente los cebadores utilizando nucleótidos biotinilados,
- 10 capturar las secuencias biotiniladas sobre una superficie sólida recubierta con estreptavidina, y retirar todas las secuencias no unidas, y  
liberar las secuencias diana mutantes monocatenarias de la superficie sólida.
- En algunas realizaciones, las secuencias diana mutantes monocatenarias se aíslan al:  
agregar un exceso de secuencias de referencia biotiniladas,
- 15 reducir rápidamente la temperatura por debajo de 50-55 °C para permitir la formación de dúplexes de secuencia diana mutante monocatenaria/secuencia de referencia biotinilada,  
tratar con exonucleasa I para eliminar el exceso de secuencia de referencia,  
capturar las secuencias biotiniladas sobre una superficie sólida recubierta con estreptavidina, y retirar todas las secuencias no unidas, y  
liberar las secuencias diana mutantes monocatenarias de la superficie sólida.
- 20 En algunas realizaciones, las secuencias diana mutantes monocatenarias se aíslan al:  
poner en contacto los dúplexes formados con un exceso de adaptador no biotinilado y ligasa termoestable a temperatura crítica de hibridación para permitir la ligación selectiva del adaptador no biotinilado con los dúplexes formados por secuencias diana naturales con las secuencias de referencia,  
agregar un exceso de adaptador biotinilado y ligasa termoestable,
- 25 reducir la temperatura para permitir la formación de dúplexes de cadena diana mutante/cadena de referencia, y posteriormente la unión del adaptador biotinilado con los dúplexes formados,  
capturar las secuencias biotiniladas sobre una superficie sólida recubierta con estreptavidina, y retirar todas las secuencias no unidas, y  
liberar las secuencias diana mutantes monocatenarias de la superficie sólida.
- 30 En algunas realizaciones, las secuencias diana mutantes monocatenarias se aíslan al:  
utilizar secuencias de referencia biotiniladas, y los dúplexes formados mediante la secuencia natural/secuencia de referencia biotinilada se retiran mediante captura sobre la superficie sólida recubierta con estreptavidina, de esta manera se deja la población enriquecida de secuencias diana mutantes monocatenarias.
- 35 En algunas realizaciones, las secuencias diana mutantes monocatenarias se aíslan al: acoplar las secuencias de referencia a perlas magnéticas y los dúplexes formados mediante la secuencia natural/secuencia de referencia se retiran al retirar las perlas magnéticas.
- En cualquiera de las realizaciones precedentes, las secuencias diana se preamplifican utilizando PCR asimétrica antes de ponerlas en contacto con las secuencias de referencia.
- 40 En cualquiera de las realizaciones precedentes, las secuencias diana se ponen en contacto con las secuencias de referencia en presencia de un disolvente orgánico.
- Asimismo, la fraseología y terminología en la presente memoria se utilizan a efectos descriptivos y no deben considerarse como limitantes. El uso de «que incluye», «que comprende», «que tiene», «que contiene», «que implica» y variaciones de los mismos en la presente, pretende abarcar los elementos que se enumeran a continuación y sus equivalentes, así como elementos adicionales.

Estos y otros aspectos del método según la invención y los aspectos relacionados con la descripción solo, así como diversas ventajas y utilidades serán evidentes con referencia a la Descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 muestra la identificación y rastreo de huellas tumorales utilizando COLD-PCR RAINDANCE™. La Figura 1A muestra cómo se posibilita la COLD-PCR paralela masiva por medio de los microfluidos RainDance™, para extraer la porción seleccionada del genoma mientras se enriquecen de forma simultánea las mutaciones. El genoma enriquecido con mutaciones luego se somete a barrido por medio de secuenciación de segunda generación (SGS, por sus siglas en inglés). La Figura 1B muestra el rastreo (o la identificación y el rastreo) de huellas tumores en sangre utilizando ADN de circulación en plasma y la tecnología COLD-PCR-RainDance combinada. La Figura 1C muestra el principio de formación de gotas mediante RainDance: El ADN genómico en gotas se fusiona con gotas que contienen cebadores para regiones específicas. A continuación, se amplifican por PCR millones de nano gotas en un único tubo y posteriormente se someten a secuenciación paralela masiva. La PCR se puede reemplazar por COLD-PCR para facilitar en gran medida la detección de la mutación de escasa abundancia a través de la secuenciación de segunda generación (SGS). La Figura 1D muestra el principio de la COLD-PCR: se forma heterodúplexes mutante-natural a una temperatura intermedia durante la PCR, a continuación, los heterodúplexes se desnaturalizan de forma selectiva y se amplifican de forma preferencial.

La Figura 2 muestra el diseño del soporte sólido de la ice-COLD-PCR (perla).

La Figura 3 muestra una emulsión que contiene perla de ice-COLD-PCR, secuencias diana capturadas, cebador directo libre e ingredientes de PCR (polimerasa, dNTP, etc.) antes de la amplificación por ice-COLD-PCR.

20 La Figura 4 muestra una emulsión que contiene perla de ice-COLD-PCR, secuencias diana capturadas, cebador directo libre e ingredientes de PCR (polimerasa, dNTP, etc.) después de la amplificación por ice-COLD-PCR.

La Figura 5 demuestra que se potenció significativamente la sensibilidad de la detección de la mutación mediante COLD-PCR-rápida tras el aislamiento de la diana mediante la sonda biotinilada. La línea celular utilizada fue SW480, que contiene la mutación c.818 G>A en el exón 8 de *TP53*. Se procesó un ADN natural como testigo, en paralelo. Las flechas indican la posición de la mutación.

La Figura 6 demuestra que la abundancia de mutación más baja detectable fue un ~0,3 % de abundancia utilizando ADN aislado por perla, mientras el límite de detección para reacciones utilizando ADN genómico fue de 1 % de abundancia de mutante.

30 La Figura 7 muestra un abordaje para aplicar COLD-PCR múltiplex. Se amplificaron múltiples genes diana mediante PCR de larga distancia con polimerasa de fidelidad elevada con uno del cebador etiquetado con biotina en su extremo 5' en cada amplicón. El ADN monocatenario etiquetado en 5' se inmovilizó sobre perlas magnéticas con estreptavidina y se apareó con cebadores de anclaje que consistían en regiones genéricas y una secuencia génica diana. Se llevó a cabo la amplificación de mediación de ligación y posteriormente PCR convencional o COLD-PCR utilizando el cebador genérico A y B, para generar copias de regiones diana que tienen la misma  $T_c$  y, por lo tanto, pueden amplificarse en una única reacción de COLD-PCR.

La Figura 8 demuestra la detección simple convencional y por COLD-PCR de una mutación en el exón 8 de *TP53*. Se procesó un 5 % de mutación c.818 G>A en el exón 8 de *TP53* diluida en ADN natural con el abordaje basado en la ligación y posteriormente PCR convencional o COLD-PCR con  $T_c$  a 86 °C. La cadena inversa se secuenció. Se procesó un ADN natural como testigo, en paralelo. Las flechas indican la posición de la mutación.

40 La Figura 9 muestra la detección doble convencional y por COLD-PCR de una mutación en el exón 6 y el exón 9 de *TP53*. Se procesó una mezcla de 10 % de mutación c.580 C>T en el exón 6 de *TP53* y 10% de mutación c.925 C>T en el exón 9 de *TP53* diluida en ADN natural con el abordaje basado en ligación y posteriormente PCR convencional o COLD-PCR con una única  $T_c$  a 84,7 °C o dos temperaturas  $T_c$ , una primera  $T_c$  a 84,5 °C y posteriormente una  $T_c$  a 85 °C. La PCR anidada se llevó a cabo para aislar los exones diana para posibilitar la secuenciación Sanger. Las flechas indican la posición de la mutación.

La Figura 10 muestra la COLD-PCR independiente de la temperatura para una secuencia de codón 12 KRAS en disolución. Las secuencias que contenían mutación se amplificaron de forma preferencial durante la TI-COLD-PCR y se secuenciaron con claridad. En cambio, la secuenciación a partir de PCR convencional solo muestra amplificación cuando se utiliza una temperatura de desnaturalización de 84,7 °C.

50 La Figura 11 muestra el aislamiento de las regiones de ADN diana a través de desnaturalización e hibridación repetidas.

La Figura 12 muestra la captura y aislamiento de secuencias monocatenarias con mutación enriquecida (o ADN dañado) mediante extensión del cebador.

La Figura 13 muestra la captura y aislamiento de secuencias monocatenarias con mutación enriquecida (o ADN dañado) mediante extensión del cebador.

La Figura 14 muestra la captura y biotilación selectiva de secuencias monocatenarias a través de ligación selectiva a temperaturas críticas de desnaturalización.

5 La Figura 15 muestra una ilustración del concepto RE.SE.CT.

La Figura 16 muestra el enriquecimiento RE.SE.CT para una mutación puntual C>A en KRAS. En cada pasada, se enriqueció la secuencia mutada.

La Figura 17 muestra el enriquecimiento RE.SE.CT para una mutación doble CC>AA en KRAS. En cada pasada, se enriqueció la secuencia mutada.

10 La Figura 18 muestra la purificación de perlas de la mutación doble (CC>AA) en KRAS en pacientes TL119.

La Figura 19 muestra el enriquecimiento de la única mutación puntual en KRAS (C>A) a partir de mezclas de ADN mutante SW480.

La Figura 20 muestra el enriquecimiento de la única mutación puntual en KRAS (C>T) a partir de mezclas de ADN mutante A549.

15 La Figura 21 muestra el enriquecimiento de la única mutación puntual en KRAS (C>T) a diversas temperaturas de desnaturalización.

#### Descripción detallada

Una «región diana» o «secuencia diana», que se utilizan de forma intercambiable en la presente memoria, abarca la secuencia mutante y la secuencia natural. En determinados contextos, puede hacer referencia a una o a otra. Según se usa en la presente, una «región de interés» en el ADN genómico es una «región diana». Las secuencias diana no deben tener necesariamente un tamaño exacto, es decir, incluso se puede hacer una fragmentación aleatoria del genoma, o una porción de este, o alguna otra forma de digestión por restricción antes de la hibridación con la secuencia de referencia. La porción diana que es complementaria a la secuencia de referencia se interrogará para determinar la presencia de mutaciones, independientemente de lo que sucede fuera de la porción de la secuencia de referencia. Esto facilita las cosas, p. ej., no hay necesidad de una etapa de preamplificación por PCR para enriquecer las secuencias diana a partir del ADN genómico, lo cual puede inducir a errores. Sin embargo, si se utiliza la fragmentación aleatoria, el tamaño promedio del fragmento deberá ser al menos 10 veces mayor que las secuencias diana (p. ej., los fragmentos grandes de 1kb o mayores se pueden interrogar sobre perlas con una secuencia de referencia de 100 bp).

30 «Enriquecer una secuencia diana mutante» hace referencia a aumentar la cantidad de una secuencia diana mutante y/o aumentar la relación de la secuencia diana mutante con respecto a la secuencia natural correspondiente en una muestra. Por ejemplo, cuando la relación de entre la secuencia mutante y la secuencia natural es inicialmente 5 % a 95 % en una muestra, la secuencia mutante se puede amplificar de forma preferencial en una reacción de amplificación para producir una relación de 70 % de secuencia mutante a 30 % de secuencia natural. Por lo tanto, hay un enriquecimiento de 14 veces de la secuencia mutante con respecto a la secuencia natural en el ejemplo hipotético. En general, el enriquecimiento de una secuencia diana mutante resulta en un aumento de 2 veces a 200 veces de la secuencia diana mutante con respecto a la secuencia natural antes del enriquecimiento. El enriquecimiento de la secuencia diana mutante es de al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces o más. El enriquecimiento de una secuencia diana mutante resulta en una muestra que tiene 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de secuencia diana mutante en comparación con la secuencia natural (p. ej., 10 % de secuencia diana mutante: 90 % de secuencia natural a 95 % de secuencia diana mutante: 5 % de secuencia natural).

45 «Secuencia diana mutante» hace referencia a un ácido nucleico que es menos prevalente en una muestra de ácido nucleico que una secuencia natural correspondiente. La secuencia diana mutante típicamente corresponde a menos del 50 % de la cantidad total de secuencia natural + secuencia mutante en una muestra. La secuencia diana mutante se puede expresar a nivel de ARN y/o ADN 1 :10, 1 :15, 1 :20, 1 :25X, 1 :30, 1 :35, 1 :40, 1 :45, 1 :50, 1 :60, 1 :70, 1 :80, 1 :90, 1 :100, 1 :150, 1 :200 veces o menos que la secuencia natural. Por ejemplo, una muestra (p. ej., una muestra de sangre) puede contener numerosas células normales y unas pocas células cancerosas. Las células normales contienen alelos no mutantes o naturales, mientras que la pequeña cantidad de células cancerosas contiene mutaciones somáticas. En otra realización, la invención se refiere a detectar ADN fetal en una muestra de ácido nucleico obtenida de una madre. En esta realización, la secuencia diana mutante está presente en el ADN fetal, mientras que el ADN de la madre más prevalente contiene la secuencia natural. Según se usa en la presente memoria, una secuencia diana mutante pretende incluir el ADN fetal obtenido de una madre embarazada. En otra

realización, la invención se refiere a detectar uno o más alelos metilados en presencia de un gran exceso de alelos no metilados o viceversa en un análisis epigenético.

La secuencia diana mutante tiene alrededor de 17-2000 nucleótidos de longitud. En una realización, la secuencia diana mutante tiene 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 o más nucleótidos de longitud. Las secuencias diana mutantes comparten al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de homología con la secuencia natural correspondiente, pero difiere en al menos un nucleótido con respecto a la secuencia natural. Las secuencias diana mutantes se pueden amplificar a través de PCR con el mismo par de cebadores que los utilizados para la secuencia natural.

«Secuencia diana natural» hace referencia a un ácido nucleico que es más prevalente en una muestra de ácido nucleico que una secuencia diana mutante correspondiente (p. ej., la misma región del gen, pero una secuencia de ácido nucleico diferente). La secuencia natural corresponde a más del 50 % de la secuencia natural + secuencia mutante total en una muestra. La secuencia natural se puede expresar a nivel de ARN y/o ADN 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces o más que la secuencia mutante. Por ejemplo, una muestra (p. ej., una muestra de sangre) puede contener numerosas células normales y unas pocas células cancerosas. Las células normales contienen alelos no mutantes o naturales, mientras que la pequeña cantidad de células cancerosas contiene mutaciones somáticas. Tal como se usa en la presente, una «cadena natural» hace referencia a una cadena de ácido nucleico simple de una secuencia natural. El término «natural» típicamente hace referencia a la secuencia de polinucleótidos o alelos más comunes para un determinado gen en una población. En general, el alelo natural se obtendrá de células normales.

La secuencia natural tiene alrededor de 17-2000 nucleótidos de longitud. En una realización, la secuencia natural tiene 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 o más nucleótidos de longitud. Las secuencias naturales compartirán al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de homología con la secuencia diana mutante correspondiente, pero difiere en al menos un nucleótido con respecto a la secuencia diana mutante. Las secuencias naturales se pueden amplificar a través de PCR con el mismo par de cebadores que los utilizados para la secuencia mutante.

«Alelo» hace referencia a formas alternativas de un gen, porción de este o región no codificante de ADN que ocupa el mismo locus o posición en cromosomas homólogos que tiene al menos una diferencia en la secuencia nucleotídica. El término alelo se puede utilizar para describir ADN de cualquier organismo incluido, pero sin limitarse a, bacterias, virus, hongos, protozoarios, mohos, levaduras, plantas, humanos, no humanos, animales y arqueobacterias. Los alelos se pueden encontrar en una célula simple (p. ej., dos alelos, uno heredo del padre y uno de la madre) o dentro de una población de células (p. ej., un alelo natural de tejido normal y un alelo mutante somático de tejido enfermo).

Un alelo puede tener 17-2000 nucleótidos de longitud. En una realización, el alelo tiene 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 o más nucleótidos de longitud. Los alelos generalmente compartirán el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 97 %, 98 %, 99 % o más homología entre sí. Los alelos se pueden amplificar a través de PCR con el mismo par de cebadores. La presente invención se utiliza para enriquecer un polimorfismo. Cualquier gen dado puede tener ninguna una o muchas formas alélicas (polimorfismo). Los cambios mutacionales comunes que originan los alelos pueden ser el resultado de supresiones, adiciones o sustituciones naturales o artificiales (p. ej., carcinógenos químicos) de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios se puede producir solo, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

El término «mutante» hace referencia a un cambio nucleotídico (es decir, una sustitución, supresión, inserción o metilación de nucleótido simple o múltiple) en una secuencia de ácido nucleico. Un ácido nucleico con una mutación tiene una secuencia de ácido nucleico (alelo mutante) que es diferente en su secuencia a la de la secuencia polinucleotídica natural correspondiente. Los métodos de la invención son especialmente útiles para enriquecer de forma selectiva varios o numerosos alelos mutantes de forma simultánea. Los alelos mutantes pueden contener entre 1 y 500 cambios de secuencia nucleotídica. Un alelo mutante puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 o 500 cambios de secuencia nucleotídica en comparación con un alelo natural correspondiente. Típicamente, un alelo mutante contendrá entre 1 y 10 cambios de secuencia nucleotídica y, más típicamente, entre 1 y 5 cambios de secuencia nucleotídica. El alelo mutante tendrá 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más homología con el alelo natural. En general, el alelo mutante se obtendrá de tejidos o células enfermos y se asocia con un estado de enfermedad.

Según se usa en la presente memoria, el término «temperatura de fusión» o «*T<sub>m</sub>*» hace referencia a la temperatura en que un polinucleótido se disocia de su secuencia complementaria. En general, la *T<sub>m</sub>* se puede definir como la temperatura en que una mitad de los pares de bases de Watson-Crick en una molécula de ácido nucleico dúplex se rompe o disocia (es decir, se «funde») mientras que la otra mitad de los pares de bases de Watson-Crick permanece

intacta en una conformación bicatenaria. En otras palabras, la  $T_m$  se define como la temperatura en que el 50 % de los nucleótidos de dos secuencias complementarias se aparean (cadenas dobles) y el 50 % de los nucleótidos se desnaturaliza (cadenas simples). Por lo tanto, la  $T_m$  define un punto medio en la transición de moléculas de ácido nucleico bicatenarias a monocatenarias (o, a la inversa, en la transición de moléculas de ácido nucleico monocatenarias a bicatenarias).

La  $T_m$  se puede estimar por medio de diversos métodos, por ejemplo, mediante un cálculo de vecino más próximo según Wetmur 1991 (Wetmur, J. G. 1991. ADN probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. Crit Rev Biochem Mol Biol 26: 227-259) y mediante programas comerciales que incluyen Oligo™ Primer Design y programas disponibles en internet. De manera alternativa, la  $T_m$  se puede determinar a través de experimentación real. Por ejemplo, se puede utilizar unión de ADN bicatenario o tintes intercalantes, tales como bromuro de etidio o SYBR-green (Molecular Probes) en un ensayo de curva de fusión para determinar la verdadera  $T_m$  del ácido nucleico. En la técnica se conocen métodos adicionales para determinar la  $T_m$  de un ácido nucleico y se describen en la presente.

Según se usa en la presente memoria, el término «temperatura crítica de desnaturalización» o « $T_c$ » hace referencia a una temperatura inferior a la  $T_m$  de la secuencia natural, donde a dicha temperatura un dúplex de la secuencia natural y la secuencia mutante se fundirá. (En algunos casos, esta temperatura puede ser una en que un homodúplex de secuencias mutantes también se funde.) La  $T_c$  se aplica para desnaturalizar de forma preferencial las secuencias bicatenarias que contienen mutaciones, mientras se mantienen en forma de dúplex las secuencias naturales, con el fin de posibilitar el enriquecimiento selectivo de la secuencia que contiene una mutación durante una reacción de amplificación. La temperatura de desnaturalización crítica ( $T_c$ ) es la temperatura inferior a la que la eficacia de la PCR disminuye abruptamente para una secuencia de ácido nucleico dada. Por ejemplo, una secuencia homodúplex de 167 bp p53 se amplifica bien si la temperatura de desnaturalización por PCR se fija a 87 °C, se amplifica modestamente a 86,5 °C y no produce un producto detectable si la desnaturalización por PCR se fija a 86 °C o menos. Por lo tanto, en este ejemplo, la  $T_c$  es 86,5 °C. La  $T_c$  es alrededor de 0,1-20 °C más baja que la  $T_m$  de la secuencia natural (y/o la secuencia de referencia en determinados ejemplos en la presente memoria). Más preferiblemente, la  $T_c$  es alrededor de 0,1-10 °C, 0,1-9 °C, 0,1-8 °C, 0,1-7 °C, 0,1-6 °C, 0,2 °C - 5 °C, 0,3 °C - 4,5 °C, 0,4 - 4 °C, 0,5 - 3,5 °C, 0,5 - 3 °C, 0,5- 3 °C, 0,5 - 2,5 °C, 0,5- 2 °C, 0,5 - 1,5 °C, 0,5 - 1 °C más baja que la  $T_m$  de la secuencia natural. En algunas realizaciones, la  $T_c$  es más baja que la  $T_m$  de las secuencias de homodúplex natural y homodúplex diana mutante. Por ejemplo, la  $T_c$  puede ser alrededor de 0,1-10 °C, 0,1-9 °C, 0,1-8 °C, 0,1-7 °C, 0,1-6 °C, 0,2 °C - 5 °C, 0,3 °C - 4,5 °C, 0,4 - 4 °C, 0,5 - 3,5 °C, 0,5 - 3 °C, 0,5- 3 °C, 0,5 - 2,5 °C, 0,5- 2 °C, 0,5 - 1,5 °C, 0,5 - 1 °C más baja que la  $T_m$  de las secuencias de homodúplex natural y homodúplex diana mutante.

Una estrategia para identificar la  $T_c$  óptima para una reacción de COLD-PCR, es someter una secuencia natural a un gradiente que abarca diversas temperaturas de desnaturalización diferentes. En paralelo, se somete un gradiente de secuencias mutantes y/o secuencias de heterodúplex mutante:natural en las mismas condiciones. Una vez que se identifica una temperatura que posibilita la generación reproducible de un producto de PCR sólido para las secuencias mutadas, pero no para las secuencias naturales, esta representa la  $T_c$  óptima que se puede adaptar a continuación para la región de interés específica.

En la práctica, hallamos que en la mayoría de los casos la  $T_c$  óptima para una reacción está 1 grado por debajo de la  $T_m$ . Por consiguiente, una estrategia más fácil para identificar la  $T_c$  de una secuencia es adoptar la regla empírica  $T_c = T_m - 1$  °C para homodúplexes con respecto a heterodúplexes, donde existe apenas una o unas pocas diferencias entre las secuencias naturales y mutantes. Dado que existen métodos experimentales establecidos para identificar la  $T_m$  de una secuencia (p. ej., experimentalmente a través del análisis de curva de fusión; o teóricamente a través de predicción por programa informático), esta estrategia para identificar la  $T_c$  es más práctica. En la mayoría de los casos, la fórmula  $T_c = T_m - 1$  °C proporciona la  $T_c$  óptima. Sin embargo, en algunas realizaciones, la fórmula  $T_c = T_m - 1$  °C puede no proporcionar el valor más óptimo de  $T_c$ . En dichos casos, el método «basado en gradiente» detallado descrito en la presente memoria se puede utilizar para identificar la  $T_c$ .

Según se usa en la presente memoria, el término «temperatura crítica de hibridación» (CHT, por sus siglas en inglés) hace referencia a la temperatura (o intervalo de temperaturas) en que la tasa de hibridación de una cadena diana de ADN natural con la cadena complementaria natural (inmovilizada) es más alta que la tasa de hibridación de una cadena diana de ADN mutante con la cadena complementaria natural (inmovilizada). Cuando hay una diferencia de un único par de bases entre la secuencia diana mutante y la secuencia de referencia, hay una reducción en la eficacia de hibridación con respecto a una secuencia diana natural que se hibrida con una secuencia de referencia completamente coincidente. Por lo tanto, a la temperatura crítica de hibridación, existe una formación selectiva de dúplexes de secuencia diana natural/secuencia de referencia con respecto a la formación de dúplexes de secuencia mutante/secuencia de referencia. La temperatura crítica de hibridación no es igual a la temperatura crítica de desnaturalización.

A diferencia de la temperatura crítica de desnaturalización que generalmente tiene un intervalo limitado (típicamente 0,5-2 °C más baja que la  $T_m$ ), la temperatura crítica de hibridación (CHT) tiene un intervalo amplio. Típicamente, la temperatura crítica de hibridación es varias temperaturas diferentes inferiores a la  $T_m$  de la cadena natural y posibilita la hibridación diferencial de las secuencias diana mutantes y naturales. En algunas realizaciones, la

temperatura crítica de hibridación es 0-20 °C más baja que la  $T_m$ . En algunas realizaciones, la temperatura crítica de hibridación es 1-10 °C, 2-8 °C, o 3-6 °C más baja que la  $T_m$  de la cadena natural.

5 Según se usa en la presente memoria, la «mezcla de reacción» es una mezcla que se sospecha que contiene un dúplex de secuencia mutante que comprende un tampón adecuado para posibilitar la desnaturalización de una secuencia mutante.

10 Las secuencias diana mutantes y las secuencias naturales se obtienen de una muestra biológica, tal como un tejido tumoral resecado, plasma y sangre. En algunas realizaciones, obtener secuencias diana mutantes y secuencias naturales de una muestra implica aislar el ADN en circulación en plasma de una muestra de plasma obtenida de un individuo utilizando el kit QIAamp MinElute virus spin. La obtención de secuencias diana mutantes y secuencias naturales de una muestra también puede implicar aislar ADN genómico de la muestra y posteriormente proceder a la fragmentación del ADN genómico utilizando medios fisicoquímicos o fragmentación impulsada por enzima.

Según se usa en la presente memoria, el «par de cebadores» hace referencia a dos cebadores que se aparean con las cadenas opuestas de una secuencia diana mutante y natural para formar un producto de amplificación durante una reacción PCR. El par de cebadores se diseña para que tenga una  $T_m$  inferior a la  $T_c$  de la reacción.

15 Según un aspecto de la descripción, se proporciona un conjunto de pares de cebadores específicamente diseñados específicos para regiones de interés. Los pares de cebadores se diseñan utilizando programas informáticos disponibles de manera que después de la amplificación se pronostica que los amplicones resultantes tendrán la misma temperatura de fusión (es decir, todos los amplicones resultantes son *iso- $T_m$*  o *iso- $T_c$* ). Existen varios programas informáticos disponibles para el diseño de cebadores y se pueden utilizar para diseñar especialmente  
20 cebadores, tales como Primer3 (Steve Rozen and Helen J. Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386), Primer-Blast (herramientas NCBI), Primer Premier (Premier Biosoft International) y OligoPerfect™ Designer (Invitrogen). En algunos aspectos, los cebadores se diseñan para que tras la amplificación generen amplicones de ADN *iso- $T_m$*  o *iso- $T_c$*  que abarcan un conjunto de  
25 genes que se correlacionan con la respuesta a un tratamiento con fármaco específico o una vía de reparación de ADN.

Según algunos aspectos, se proporciona un método para COLD-PCR/ice-COLD-PCR múltiple para enriquecer de forma simultánea diversos alelos de escasa abundancia (secuencias diana mutantes) de una muestra. El método implica capturar una mezcla de reacción que se sospecha que tiene una secuencia diana mutante y una secuencia  
30 natural dentro de un espacio restringido. Según se usa en la presente memoria, «espacio restringido» incluye, por ejemplo, gotas, microcámaras, volúmenes de picolitro, emulsión, microperlas, cámaras de vidrio o soportes sólidos alternativos tales como una superficie de vidrio o una superficie semiconductor. La COLD-PCR/ice-COLD-PCR incluye una etapa de hibridación cruzada, en la cual las secuencias mutantes se hibridan con secuencias naturales para formar moléculas heterodúplexes que se funden de forma preferencial a una temperatura crítica de  
35 desnaturalización que es inferior a la temperatura de fusión del homodúplex. Dado que la proximidad de las moléculas de ADN aumenta la eficacia de la hibridación sustancialmente, se espera que llevar a cabo la COLD-PCR en volúmenes pequeños en un espacio restringido, (p. ej., como en tecnologías Raindance™, Figura 1, o como en las tecnologías Fluidigm) o sobre un soporte sólido (perlas, o en tecnologías BEAM-ing, vidrio o en cualquier otra nanoplataforma) aumente en gran medida el potencial de enriquecimiento de la mutación. Por lo tanto, los métodos  
40 descritos en la presente memoria se pueden llevar a cabo mediante COLD-PCR basada en disolución o COLD-PCR en espacio restringido para lograr un enriquecimiento de la mutación más eficaz y múltiple.

Las secuencias diana mutantes y naturales se pueden enriquecer de forma preferencial antes de capturar la mezcla de reacción dentro de un espacio restringido. Por ejemplo, se pueden utilizar oligonucleótidos de captura biotinilados diseñados especialmente para capturar fracciones seleccionados de ADN genómico fragmentado antes de capturar  
45 la mezcla de reacción dentro de un espacio restringido. En algunas realizaciones, se pueden utilizar sondas de inversión molecular diseñadas especialmente para capturar fracciones seleccionados de ADN genómico fragmentado antes de capturar la mezcla de reacción dentro de un espacio restringido (véase, p. ej., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechMIP.shtml>; Nilsson M et al. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized ADN detection. Science. 30 de septiembre de 1994;265(5181):2085-8). En algunas realizaciones, se pueden utilizar sondas de captura basadas en micromatriz diseñadas especialmente para capturar fracciones seleccionados de ADN genómico fragmentado antes de capturar la mezcla de reacción dentro de un espacio restringido (Chou et al. ADN sequence capture and enrichment by microarray followed by next-generation sequencing for targeted resquencing: neurofibromatosis type 1 gene as model. Clin. Chem. (2010) 56:1, 62-72). En algunas realizaciones, se lleva a cabo PCR de larga distancia para amplificar de forma selectiva la secuencia diana mutante y la secuencia natural antes de capturar la mezcla de reacción dentro de un espacio restringido. En algunas realizaciones, se lleva a cabo PCR mediada por ligación de fragmentos de ADN reducidos de ADN en circulación en plasma para amplificar de forma preferencial los fragmentos de ADN apoptóticos de tamaño pequeño (Figura 1B). Este tipo de amplificación de Adn en circulación aumenta la proporción de ADN que se origina en un tumor (Mamon H, Hader C, Li J, et al. Preferential amplification of apoptotic ADN from plasma: potential for enhancing detection of minor ADN alterations in circulating ADN. Clin Chem 2008;54(9):1582-4).

COLD-PCR/ice-COLD-PCR en gotas

En algunos aspectos, el método se lleva a cabo en gotas (p. ej., emulsiones de gotas). La emulsión de gotas puede incluir regiones discontinuas o dispersas de un fluido objeto (por ejemplo, gotas) en un fluido continuo, donde estos fluidos se separan opcionalmente mediante uno o más fluidos intermedios. El fluido objeto puede incluir, por ejemplo, una disolución acuosa que contiene uno o más componentes de interés (p. ej., secuencias diana, perlas, ADN fragmentado, dNTPs, cebadores, etc.), y el fluido continuo puede ser un fluido que es inmiscible o ligeramente miscible con el fluido objeto.

La mezcla de reacción junto con los reactivos de PCR se dispensa en gotas. Los pares de cebadores específicamente diseñados para las secuencias diana mutantes y las secuencias naturales que resultan en los amplicones de ADN iso- $T_m$  o iso- $T_c$  tras la amplificación también se dispensan en microgotas. Las gotas que contienen el ADN fragmentado con reactivos de PCR a continuación se fusionan con las gotas que contienen los cebadores especialmente diseñados, de manera que cada microgota contenga la mezcla de reacción, el par de cebadores y los reactivos de PCR. Después, el método incluye someter la mezcla de reacción a PCR convencional utilizando los cebadores diseñados especialmente para posibilitar la formación de amplicones de ADN iso- $T_m$  dentro de todas las gotas. Un protocolo de ciclado térmico de PCR convencional típico comprende 30 ciclos de (a) desnaturalización a un intervalo de 90 ° C a 95 ° C, (b) apareamiento a una temperatura en el intervalo de 50 ° C a 68 ° C y (c) extensión a 68 ° C a 75 ° C. En algunos aspectos, el protocolo de ciclado térmico de PCR convencional comprende 5 ciclos, 10 ciclos, 15 ciclos, 20 ciclos, 25 ciclos, 30 ciclos o 35 ciclos.

En algunos aspectos, en lugar de utilizar pares de cebador diseñados especialmente y amplificación por PCR para generar los amplicones de ADN iso- $T_m$  o iso- $T_c$ , se utilizan oligonucleótidos de anclaje. Los oligos de anclaje se diseñan de manera que las cadenas de ADN resultantes tras la extensión y ligación sean iso- $T_m$  y iso- $T_c$  y en donde todos los amplicones se pueden amplificar utilizando cebadores comunes. Cada oligonucleótido de anclaje comprende una porción que reconoce y se une al ácido nucleico diana y una porción que no se une a la diana (una cola que no se une). Todos los cebadores directos tienen una cola con una secuencia común y todos los cebadores inversos tienen una cola con una secuencia común. Tras fusionar las gotas que contienen la mezcla de reacción con las gotas que contienen los oligonucleótidos de anclaje, los oligonucleótidos de anclaje se hibridan con las secuencias diana mutante y natural. A continuación, se procede a la extensión del cebador utilizando dNTP y polimerasa de ADN Taq y ligación utilizando ligasa de ADN. El resultado es amplicones iso- $T_m$  o iso- $T_c$  con extremos comunes formados por las colas de cebador. Las colas de cebador comunes posibilitan la posterior amplificación COLD de todas las secuencias de ADN diana en una única reacción, utilizando solo un único conjunto de cebadores que provocan la amplificación de todos los amplicones diferentes.

A continuación, el método implica llevar a cabo reacciones COLD-PCR aparte en millones de gotas en paralelo para enriquecer las secuencias que contienen mutación. Las reacciones COLD-PCR se pueden llevar a cabo según los métodos descritos en detalle en la publicación internacional n.º WO 2009/017784. En resumen, la COLD-PCR se lleva a cabo de la siguiente forma:

(i) someter la mezcla de reacción amplificada a una primera temperatura de desnaturalización que es superior a la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de la secuencia natural amplificada con el fin de permitir la desnaturalización de dicha secuencia mutante y dicha secuencia natural, en donde dicha secuencia mutante es al menos 50 % homóloga a dicha secuencia natural y se puede amplificar mediante el mismo par de cebadores que dicha secuencia natural. La primera temperatura de desnaturalización se fija según los procedimientos estándares utilizados en la PCR. Por lo tanto, la primera temperatura de desnaturalización debe ser suficientemente alta para posibilitar la desnaturalización completa de las secuencias mutante y natural (p. ej., 96 °C). En un aspecto, la primera temperatura de desnaturalización es alrededor de 1 °C a 30 °C más alta que la  $T_m$  de la secuencia natural, más preferiblemente, la primera temperatura de desnaturalización es alrededor de 5 °C a 20 °C más alta que la  $T_m$  de la secuencia natural.

(ii) reducir la temperatura de la mezcla de reacción de amplificación para permitir la formación de un dúplex de cadena mutante/cadena natural. En un aspecto preferido, esta temperatura de hibridación o temperatura intermedia (la temperatura que es inferior a la primera temperatura de desnaturalización y la  $T_c$  pero superior a la temperatura de apareamiento/extensión del cebador, p. ej., alrededor de 60°C a 80°C) es superior a la  $T_m$ , del par de cebadores y, por lo tanto, posibilita que las secuencias mutante y natural se hibriden mientras evita la unión del par de cebadores con las secuencias mutante y/o natural. Esta etapa de apareamiento resulta en la formación de dúplexes de hibridación de secuencias bicatenarias mutante-mutante, natural-natural y mutante-natural.

(iii) someter la mezcla de reacción amplificada a una temperatura crítica de desnaturalización ( $T_c$ ) que es inferior a la  $T_m$  de dicha secuencia natural con el fin de permitir la desnaturalización preferencial de dicho dúplex de la etapa (ii) para formar cadenas mutante y natural desnaturalizadas. La  $T_c$  o temperatura crítica de desnaturalización es inferior a la  $T_m$  de la secuencia natural y se puede determinar mediante los métodos descritos en la presente memoria. En una realización, la  $T_c$  es alrededor de 0,3 °C -5 °C más baja y, preferiblemente, alrededor de 0,5 °C a 1,5 °C más baja que la  $T_m$  de la secuencia natural. En general, la  $T_c$  será de alrededor de 70-90 °C. Los dúplexes de hibridación mutante-mutante también se pueden desnaturalizar preferencialmente si la secuencia mutante tiene una secuencia de nucleótidos que resulta en una  $T_m$  más baja en comparación con la secuencia natural. A la  $T_c$ , los dúplexes de secuencias mutante-natural (y los dúplexes de secuencias mutante-mutante solo si tienen una  $T_m$  más baja que la

5 secuencia natural) se desnaturalizan sustancialmente, mientras que los dúplexes mutante-mutante (si tienen una  $T_m$  igual o mayor que la  $T_m$  de la secuencia natural) y los dúplexes de secuencias natural-natural permanecen sustancialmente no desnaturalizados. «Sustancialmente» significa al menos 60 %, preferiblemente, al menos 70 %, más preferiblemente, al menos 80 %, incluso más preferiblemente al menos 90 % y los más preferible al menos 98 % en una forma desnaturalizada o no desnaturalizada dada. La  $T_c$  generalmente se aplica de alrededor de 1 segundo a 5 minutos, más preferiblemente, 2 segundos a 1 minuto y, más preferiblemente, 5 segundos a 30 segundos.

(iv) reducir la temperatura de la mezcla de reacción para permitir que dicho par de cebador se aparee con dichas cadenas mutante y natural, y

10 (v) extender dicho par de cebadores para enriquecer dicha secuencia mutante con respecto a dicha secuencia natural.

Las etapas del método se repiten, en general, durante múltiples ciclos para obtener una amplificación suficiente de las secuencias mutante y natural. En un aspecto, las etapas del método se repiten durante 5-40 ciclos y, más preferiblemente, 10-30 ciclos. Un experto en la técnica puede determinar la cantidad óptima de ciclos.

15 Aunque gran parte de la descripción en la presente memoria incluye llevar a cabo métodos que implican gotas, se entenderá que los métodos se pueden utilizar en el contexto de otras regiones de fluidos aisladas. Por ejemplo, en algunos aspectos, las regiones de fluidos aisladas pueden estar en forma de fluidos objeto posicionados en uno o más pocillos o recipientes (por ejemplo, pocillos o recipientes de tamaño micro, nano o picolitro). Por lo tanto, cuando la descripción en la presente memoria se refiere a «gotas», la descripción podría aplicarse de la misma forma a otras regiones de fluidos aisladas (p. ej., fluidos en «pocillos»). En algunos casos, los fluidos objeto, aunque están posicionados en uno o más pocillos o recipientes, no están rodeados por un fluido inmiscible o ligeramente miscible. En otros casos, los fluidos objeto en forma de gotas se pueden combinar con un sistema de pocillos o recipientes de manera que las gotas estén posicionadas en los pocillos o recipientes durante el uso. También se contempla utilizar otras configuraciones de regiones de fluido aisladas. Además, también se contempla utilizar métodos que implican componentes de interés aislados (p. ej., en espacio restringido) que no implican necesariamente el uso de regiones de fluido aisladas. Por ejemplo, en algunos aspectos, los métodos descritos en la presente memoria se pueden llevar a cabo sobre soportes sólidos (p. ej., sobre vidrio, perlas u otros soportes).

#### Fluidos

30 Con respecto a una región discontinua o dispersa de un fluido objeto (p. ej., una gota) en un fluido continuo, los expertos en la técnica pueden seleccionar estos fluidos esencialmente entre cualesquiera fluidos (líquidos, gases y similares) al considerar la relación entre los fluidos. Por ejemplo, el fluido objeto y el fluido continuo se pueden seleccionar por ser inmiscibles o ligeramente miscibles dentro del marco de tiempo de formación de las porciones dispersas. Cuando las porciones dispersas permanecen líquidas durante un período de tiempo significativo, los fluidos pueden ser significativamente inmiscibles. En otros casos, no es necesario que los fluidos sean inmiscibles (p. ej., pueden ser ligeramente miscibles). Los expertos en la técnica pueden seleccionar fluidos inmiscibles o ligeramente miscibles adecuados utilizando mediciones de ángulo de contacto o similares, para llevar a cabo los métodos descritos en la presente memoria.

40 Se pueden utilizar diversos tipos de fluidos en los aspectos descritos en la presente memoria. Típicamente, un fluido objeto que contiene uno o más componentes de interés (p. ej., ácidos nucleicos, dNTP, cebadores, etc.) es acuoso, aunque se pueden utilizar fluidos no acuosos como fluidos objeto en determinadas realizaciones. Si el fluido objeto está en forma de una gota en un fluido continuo, el fluido continuo puede ser inmiscible o ligeramente miscible con el fluido objeto. Los ejemplos no limitantes de fluidos continuos adecuados incluyen aceites (p. ej., aceite de silicona, aceite mineral), fluorocarburos, hidrocarburos y disolventes no polares. A veces, un fluido continuo, que puede ser inmiscible con el fluido acuoso que define la gota, es ligeramente soluble en agua. Por ejemplo, los aceites tales como poli(dimetilsiloxano) (PDMS) y poli(trifluoropropilmetilsiloxano) son ligeramente solubles en agua. Los gases tales como el aire también se pueden utilizar como fluidos continuos.

#### Gotas

50 Se pueden utilizar gotas de volúmenes y tamaños variables en los aspectos descritos en la presente memoria. En algunos casos, un método puede implicar el uso de una pluralidad de gotas que tienen el mismo o sustancialmente el mismo volumen. En otros casos, puede ser adecuado generar una pluralidad de gotas que tienen volúmenes diferentes para uso en un método descrito en la presente memoria. Los volúmenes de las gotas se pueden elegir dependiente de la aplicación específica. En general, una gota puede tener un volumen entre 10 pL y 1  $\mu$ L, aunque también se contemplan otros volúmenes. En determinados aspectos, las gotas pueden tener volúmenes, por ejemplo, menores que 1  $\mu$ L, menores que 0,1  $\mu$ L, menores que 10 nL, menores que 1 nL, menores que 0,1  $\mu$ L o menores que 10  $\mu$ L. En otros aspectos, las gotas pueden tener volúmenes, por ejemplo, mayores que 10 pL, mayores que 0,1 nL, mayores que 1 nL, mayores que 10 nL, mayores que 0,1  $\mu$ L o mayores que 1,0  $\mu$ L. También se contemplan otros intervalos de volúmenes de gota.



En general, una gota puede tener un tamaño ente 0,1  $\mu\text{m}$  y 1000  $\mu\text{m}$ , aunque también se contemplan otros tamaños. En algunos aspectos, una gota tiene una dimensión transversal mayor (p. ej., un diámetro), por ejemplo, menor que 1000  $\mu\text{m}$ , menor que 750  $\mu\text{m}$ , menor que 500  $\mu\text{m}$ , menor que 100  $\mu\text{m}$ , menor que 75  $\mu\text{m}$ , menor que 50  $\mu\text{m}$ , menor que 25  $\mu\text{m}$ , menor que 10  $\mu\text{m}$ , menor que 5  $\mu\text{m}$ , menor que 1  $\mu\text{m}$  o menor que 0,1  $\mu\text{m}$ . En otros aspectos, una gota

5 tiene una dimensión transversal mayor (p. ej., un diámetro), por ejemplo, mayor que 0,1  $\mu\text{m}$ , mayor que 1  $\mu\text{m}$ , mayor que 5  $\mu\text{m}$ , mayor que 10  $\mu\text{m}$ , mayor que 25  $\mu\text{m}$ , mayor que 50  $\mu\text{m}$ , mayor que 75  $\mu\text{m}$ , mayor que 100  $\mu\text{m}$ , mayor que 500  $\mu\text{m}$ , mayor que 750  $\mu\text{m}$  o mayor que 1000  $\mu\text{m}$ . También se contemplan otros tamaños.

En algunos aspectos, una pluralidad de gotas es sustancialmente monodispersa en tamaño. Una pluralidad de gotas puede tener una polidispersidad, por ejemplo, menor que 5 %, menor que 4 %, menor que 3 %, menor que 2 %, menor que 1,5 % o menor que 1 %. En otras realizaciones, los tamaños de una pluralidad de gotas pueden variar y las gotas no están sustancialmente monodispersas.

10

Las gotas típicamente tienen forma esférica, pero pueden ser no esféricas, dependiente del ambiente que rodea a la gota. Por ejemplo, una gota colocada en un pocillo o un canal puede tomar la forma del pocillo o canal en algunas realizaciones.

### 15 Formación de gotas

Las gotas descritas en la presente memoria se pueden formar utilizando cualquier técnica adecuada. En algunos aspectos, las gotas se forman mediante una técnica de enfoque de flujo. El enfoque de flujo puede implicar enfocar el flujo de un fluido objeto al exponer el fluido objeto a dos corrientes separadas de un fluido continuo, y permitir que las corrientes separadas se unan y que rodeen circunferencialmente por completo la corriente de fluido objeto para formar una gota del fluido objeto. En algunos casos, las gotas se forman al hacer fluir un fluido objeto a través de una boquilla. El fluido objeto puede proyectarse a través de la boquilla y la proyección puede crecer a medida que se inyecta fluido objeto adicional. De manera simultánea, se puede inyectar un fluido continuo para cizallar la superficie externa del fluido objeto que se proyecta, a medida que se enfocan por un canal. Cuando el cizallamiento sobre el fluido objeto debido al fluido continuo supera la tensión superficial que mantiene la proyección de fluido objeto en la boquilla, se desprende una gota de fluido objeto y se dispersa en el fluido continuo. Este proceso se repite y se pueden formar gotas del mismo tamaño o tamaños diferentes, dependiendo de la mono o polidispersidad deseada de las gotas. Se describen ejemplos no limitantes de métodos para formar gotas en mayor detalle en la patente estadounidense n.º 7.708.949, presentada el 28 de diciembre de 2004, titulada «Method and Apparatus for Fluid Dispersion» [Harvard]; la publicación internacional n.º WO/2009/139898, presentada el 15 de mayo de 2009, titulada «Valves and Other Flow Control in Fluidic Systems Including Microfluidic Systems» [Harvard]; y la patente estadounidense n.º 6.951.632, presentada el 16 de noviembre de 2001, titulada «Microfluidic Devices for Introducing and Dispensing Fluids from Microfluidic Systems».

20

25

30

### Componentes de interés

Según se describe en la presente memoria, una región de fluido aislada (p. ej., una gota o un fluido en un pocillo) puede contener diversos componentes de interés. En algunos aspectos, los componentes de interés son específicos para llevar a cabo la PCR. En algunas de dichas realizaciones, los componentes de interés son específicos para un proceso específico, tal como un proceso COLD-PCR o ice-COLD-PCR, según se describen en la presente memoria.

35

Determinados métodos descritos en la presente memoria implican el uso de una biblioteca de diferentes componentes de interés, tal como una biblioteca de pares de cebadores específicos para regiones de interés que resultan en fragmentos de ADN iso-Tm o iso-Tc tras la amplificación, o una biblioteca de perlas que comprenden diferentes secuencias de captura específicas. En algunos aspectos, se pueden dispersar diferentes miembros de la biblioteca (p. ej., pares de cebadores o perlas) en las gotas de manera que cada gota contenga uno o más miembros de la biblioteca diferentes. Cada gota puede contener diversas cantidades de copias de un componente de interés, según se describe en la presente memoria. Múltiples gotas pueden formar una biblioteca de gotas de los componentes. Por ejemplo, en un conjunto de aspectos, cada gota contiene un par de cebadores específico para una región de interés que resulta en un fragmento de ADN que es sustancialmente iso-Tm (y sustancialmente iso-Tc) con respecto a otros fragmentos de ADN (contenidos en otras gotas) tras la amplificación. Una pluralidad de dichas gotas puede formar una biblioteca de gotas de pares de cebadores diseñados especialmente que resultan en fragmentos de ADN sustancialmente iso-Tm (y sustancialmente iso-Tc) tras la amplificación. En otro conjunto de aspectos, cada gota contiene al menos una perla que tiene acoplada a esta una secuencia de captura específica. Además, cada gota opcionalmente puede contener un par de cebadores, uno o más componentes los cuales pueden estar acoplados a la perla o en disolución. Una pluralidad de dichas gotas puede formar una biblioteca de gotas de perlas con secuencias de captura específicas (opcionalmente con un par de cebadores). Otros ejemplos de bibliotecas de componentes se proporcionan en la presente memoria. Cada gota opcionalmente puede contener otros componentes de interés (p. ej., dNTP, enzimas, componentes tampón) que pueden ser genéricos para las otras gotas y que se utilizan para la amplificación.

40

45

50

55

En algunos aspectos, se proporciona una pluralidad de gotas, cada una de las gotas incluye ADN fragmentado de diferentes regiones de interés. La región de interés en la gota se puede enriquecer opcionalmente. En algunos casos, las regiones de interés se enriquecen antes de incluirlas en las gotas. En otros casos, las regiones de interés

se enriquecen después de estar en forma de gota. En un conjunto de aspectos, se proporciona una pluralidad de gotas, cada una de las gotas incluye oligonucleótidos de captura biotinilados diseñados especialmente que se pueden utilizar para capturar fracciones seleccionadas del ADN genómico fragmentado. En otro conjunto de aspectos, se proporciona una pluralidad de gotas, cada una de las gotas incluye sondas de inversión molecular diseñadas especialmente que se pueden utilizar para capturar fracciones seleccionadas del ADN genómico fragmentado. En otro conjunto de aspectos, se proporciona una pluralidad de gotas, cada una de las gotas incluye sondas de captura basadas en micromatriz diseñadas especialmente que se pueden utilizar para capturar fracciones seleccionadas del ADN genómico fragmentado. En otro conjunto de aspectos adicional, se proporciona una pluralidad de gotas, cada una de las gotas incluye regiones de interés amplificadas (p. ej., formadas al utilizar PCR de larga distancia). En algunos aspectos, se lleva a cabo PCR mediada por ligación de fragmentos de ADN reducidos de ADN en circulación en plasma para amplificar de forma preferencial los fragmentos de ADN apoptóticos de tamaño pequeño y dichos fragmentos se incluyen en una pluralidad de gotas. En otro conjunto de aspectos adicional, se proporciona una pluralidad de gotas, cada una de las gotas incluye oligonucleótidos de anclaje. Según se describe en la presente memoria, los oligonucleótidos de anclaje se pueden diseñar de manera que las cadenas de ADN resultantes tras la extensión y ligación sean iso-Tm y iso-Tc.

Se pueden proporcionar diversas cantidades de copias de un componente de interés en cada gota. Por ejemplo, en algunos aspectos, cada gota de una pluralidad de gotas (p. ej., una biblioteca de gotas) incluye una única copia de un componente de interés. En otros aspectos, cada gota de una pluralidad de gotas incluye 2-5000 copias de un componente de interés (p. ej., más de 2 copias, más de 10 copias, más de 50 copias, más de 100 copias, más de 200 copias, más de 500 copias, más de 700 copias, más de 1000 copias, más de 2000 copias o más 4000 copias de un componente de interés). El componente de interés puede ser aquellos descritos en la presente memoria (p. ej., fragmentos de ADN, pares de cebadores, etc.). En algunos aspectos, cada gota contiene en promedio ~2-1000 copias genómicas para permitir la formación de heterodúplexes durante el ciclado de COLD-PCR. También se contemplan otras cantidades de copias de componentes de interés.

En algunos aspectos, se proporciona una pluralidad de gotas que contiene diferentes componentes de interés (p. ej., una biblioteca de gotas), la pluralidad de gotas comprende más de 2 gotas, más de 10 gotas, más de 100 gotas, más de 500 gotas, más de 1000 gotas, más de 5000 gotas, más de 10 000 gotas, más de 50 000, más de 100 000, más de 500 000 o más de 1 000 000 gotas. Según se describe en más detalle en la presente memoria, se puede manipular una pluralidad de gotas que contienen componentes de interés sustancialmente de forma simultánea para llevar a cabo una pluralidad de reacciones en paralelo. En determinadas realizaciones, se pueden manipular más de 2 gotas, más de 10 gotas, más de 100 gotas, más de 500 gotas, más de 1000 gotas, más de 5000 gotas, más de 10 000 gotas, más de 50 000, más de 100 000, más de 500 000 o más de 1 000 000 gotas sustancialmente de forma simultánea para llevar a cabo una pluralidad de reacciones en paralelo.

Una pluralidad de gotas que contienen diferentes componentes de interés (p. ej., una biblioteca de gotas) se puede formar mediante cualquier método adecuado. En algunos aspectos, un método para formar gotas que contienen diferentes componentes de interés implica proporcionar un fluido objeto que contiene los componentes de interés (p. ej., ADN fragmentado y reactivos para la PCR, perlas, etc.) y utilizar una técnica de enfoque de flujo o cualquier otra técnica adecuada para formar las gotas. La cantidad de componentes de interés en cada gota se puede controlar, por ejemplo, al variar la concentración de los componentes en el fluido objeto antes de la formación de la gota, al variar la tasa de flujo del fluido objeto y el fluido continuo durante la formación de la gota y/o al utilizar otros métodos conocidos para los expertos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de métodos para producir bibliotecas de gotas se describen en mayor detalle en la publicación estadounidense n.º 2010/00022414, presentada el 17 de julio de 2009, titulada «Droplet Libraries» [Raindance™].

#### Métodos para fusionar gotas

En algunos aspectos, una gota de un primer tipo (p. ej., una gota que contiene un primer reactivo, que opcionalmente puede ser miembro de una primera biblioteca de gotas) se combina con una gota de un segundo tipo (p. ej., una gota que contiene un segundo reactivo, que opcionalmente puede ser miembro de una segunda biblioteca de gotas). Por ejemplo, una gota de un primer tipo puede incluir un primer conjunto de componentes para llevar a cabo la PCR (p. ej., COLD-PCR o ice-COLD-PCR, tal como ADN fragmentado, dNTP, enzimas tales como polimerasa y/o componentes tampón y una gota de un segundo tipo puede incluir un segundo conjunto de componentes para llevar a cabo la PCR (p. ej., COLD-PCR o ice-COLD-PCR, yal como cebadores para regiones específicas). La gota combinada puede contener fragmentos de ADN, un par de cebadores específico y reactivos de PCR en cantidades adecuada para una amplificación o enriquecimiento completo. Opcionalmente, se pueden combinar tres o más gotas (p. ej., gotas que contiene componentes para llevar a cabo la PCR) para formar una única gota en algunos aspectos. La fusión (es decir, fusionar) de las gotas se puede llevar a cabo mediante cualquier método adecuado. En algunos aspectos, la fusión de las gotas se lleva a cabo utilizando un campo eléctrico. Por ejemplo, dos corrientes de gotas en un sistema de microfluidos se pueden combinar en una intersección (p. ej., en una configuración de «Y») u otra configuración adecuada y se pueden utilizar electrodos que pueden producir un campo eléctrico en o cerca de la intersección para reducir la tensión superficial de las dos gotas. La reducción de la tensión superficial de las gotas puede posibilitar que las gotas se fusionan cuando las gotas se acercan entre sí. En otro aspecto, un elemento de calentamiento se puede utilizar para fusionar las gotas. En otros aspectos, la fusión de las gotas se puede llevar a cabo al drenar el fluido continuo entre las dos gotas y acercar las dos gotas. Por ejemplo,

para un dispositivo que se fabrica en un polímero tal como PDMS, un aceite que separa las gotas se puede disolver en la cantidad de dispositivo polimérico con el tiempo. Esto puede provocar que las gotas se fusionen en determinados aspectos, (p. ej., si las gotas o el fluido continuo no incluyen un tensioactivo, es más probable que las gotas se fusionen).

- 5 En algunos aspectos, se pueden introducir reactivos adicionales en las gotas sin fusionar las gotas. Por ejemplo, una gota que incluye un fluido de un primer tipo (p. ej., una gota que contiene un primer reactivo, que opcionalmente puede ser miembro de una primera biblioteca de gotas) se puede combinar con una corriente de fluido de un segundo tipo (p. ej., un fluido que contiene un segundo reactivo).

- 10 También se pueden utilizar otros métodos para fusionar gotas o introducir reactivos en gotas. Los ejemplos no limitantes de métodos para fusionar gotas e introducir reactivos en gotas se describen en la publicación internacional n.º WO/2007/133710, presentada el 11 de mayo de 2007, titulada «Microfluidic Devices and Methods of Use Thereof» [Raindance™] y Teh et al., «Droplet microfluidics», Lab Chip, 2008, 8, 198-220.

#### Aditivos

- 15 Se pueden incluir una variedad de aditivos diferentes en las gotas descritas en la presente memoria. En algunos aspectos, se pueden agregar uno o más tensioactivos o detergentes a las gotas, y/o a un fluido continuo que rodea a las gotas, para estabilizar a las gotas contra la coalescencia. El tipo de tensioactivo elegido puede depender de factores tales como el tipo de fluido continuo que se utiliza, el contenido dentro de la gota y el material que contiene la emulsión. Por ejemplo, si la emulsión está contenida en un dispositivo de microfluído fabricado con un determinado material, el tensioactivo se puede elegir con el fin de que establezca una gota acuosa, no desnaturalice el contenido dentro de la gota y sea compatible con un fluido portador que no se disuelve en el material utilizado para formar el dispositivo. Se puede utilizar cualquier tensioactivo adecuado, incluidos tensioactivos aniónicos, no iónicos o catiónicos. En un conjunto de realizaciones, los tensioactivos adecuados pueden incluir los tensioactivos no iónicos ésteres de ácido carboxílico basados en sorbitano («Span»), incluidos monolaurato de sorbitano (Span 20), monopalmitato de sorbitano (Span 40), monoestearato de sorbitano (Span 60) y monooleato de sorbitano (Span 80) y poliéteres perfluorados. Otros ejemplos no limitantes de tensioactivos no iónicos que se pueden utilizar incluyen alquilfenoles polioxietilenados (por ejemplo, nonil, p-dodecil y dinonilfenoles), alcoholes de cadena lineal polioxietilenados, polioxipropilenglicoles polioxietilenados, mercaptanos polioxietilenados, ésteres de ácido carboxílico de cadena larga (por ejemplo, ésteres de glicerilo y poliglicerilo de ácidos grasos naturales, propilenglicol, sorbitol, ésteres de sorbitol polioxietilenados, ésteres de polioxietilenglicol, etc.) y alcanolaminas (p. ej., condensados de dietanolamina-ácido graso y condensados de isopropanolamina-ácido graso). Además, también se pueden utilizar tensioactivos iónicos tales como dodecilsulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés).

- 25 En algunos aspectos, las gotas incluyen una o más etiquetas. Por ejemplo, una única gota puede contener una única etiqueta en algunos casos. La etiqueta se puede acoplar a una entidad dentro de la gota, tal como un material químico o biológico (p. ej., ADN fragmentado, un cebador, una secuencia de captura) o un material no químico ni biológico (p. ej., una perla). En otros aspectos, la etiqueta flota libre en la gota. Se puede utilizar cualquier etiqueta adecuada. Los ejemplos no limitantes de etiquetas incluyen etiquetas ópticas, etiquetas enzimáticas y etiquetas radioactivas que incluyen, pero no se limitan a, proteínas, marcadores de ADN, tintes, puntos cuánticos, marcadores de identificación por radiofrecuencia o combinaciones de estos. La etiqueta se puede detectar mediante cualquier método adecuado tal como polarización de fluorescencia, intensidad de fluorescencia, duración de fluorescencia, transferencia de energía de fluorescencia, pH, contenido iónico, temperatura o combinaciones de estos.

#### Pocillos

- 35 En algunas realizaciones, una o más regiones de fluidos aisladas se posicionan en uno o más pocillos (por ejemplo, pocillos de tamaño micro, nano o picolitro) o recipientes. Según se describe en la presente memoria, las regiones de fluido aisladas pueden estar en forma de gotas o ser simplemente fluidos aislados dentro de los pocillos. Los pocillos se pueden configurar como placas micro, nano o de picolitro posicionadas en un sistema de microfluidos, o pueden tener cualquier otra configuración adecuada.

- 40 Un dispositivo (p. ej., una placa de titulación o un dispositivo de microfluidos) puede incluir cualquier cantidad de pocillos adecuada. Por ejemplo, un dispositivo puede incluir más de 1, más de 5, más de 10, más de 100, más de 1000, más de 10 000, más de 50 000, más de 100 000, más de 500 000 o más de 1 000 000 de pocillos que se pueden utilizar para alojar un fluido (p. ej., una gota u otro fluido aislado).

- 45 Los pocillos pueden tener cualquier tamaño, volumen, forma y/o configuración adecuada. Por ejemplo, un pocillo puede tener al menos una dimensión transversal (p. ej., una longitud, ancho o altura), menor que 250 µm, menor que 200 µm, menor que 150 µm, menor que 100 µm, menor que 75 µm, menor que 50 µm, menor que 25 µm, menor que 10 µm o menor que 1 µm. En algunas realizaciones, un pocillo puede tener un volumen menor que 50 µL, menor que 10 µL, menor que 1 µL, menor que 100 nL, menor que 10 nL, menor que 1 nL, menor que 100 pL o menor que 10 pL. También se contemplan otros tamaños y volúmenes.

Un pocillo puede tener cualquier forma adecuada para alojar un fluido. Por ejemplo, un pocillo puede tener una sección transversal en forma de cuadrado, otra puede ser rectangular y otra puede tener forma triangular. Si los

pocillos se utilizan para alojar gotas, las diferentes formas de los pocillos pueden posibilitar que las gotas tengan diferentes energías superficiales mientras están posicionadas en el pocillo y pueden provocar que una gota adopte una forma en lugar de otra. Las diferentes formas de los micropocillos también se pueden utilizar en combinación con gotas de diferentes tamaños, de manera que las gotas de determinados tamaños tomen formas las específicas de los micropocillos.

En algunos casos, el tamaño del pocillo es aproximadamente del mismo tamaño que la gota. Por ejemplo, el volumen del pocillo puede ser menor que aproximadamente el doble del volumen de la gota. Esto es particularmente útil para posicionar una única gota dentro de un único pocillo. Sin embargo, en otros casos, más de una gota se puede posicionar en un pocillo. Tener más de una gota en un pocillo puede ser útil para aplicaciones que requieren la fusión de dos gotas en una gota más grande y para aplicaciones que incluyen permitir que un componente pase (p. ej., por difusión) de una gota a otra gota adyacente. Los ejemplos no limitantes de métodos para posicionar gotas en pocillos se proporcionan en la patente estadounidense n.º: 7.556.776, presentada el 8 de septiembre de 2005, titulada «Microfluidic Manipulation of Fluids and Reactions» [Brandeis/Harvard]; la publicación estadounidense n.º 2010/0163109, presentada el 4 de agosto de 2009, titulada «Manipulation of Fluids and Reactions in Microfluidic Systems» [Brandeis/Harvard].

Sin embargo, se entenderá que, en otros aspectos, no es necesario que las gotas estén posicionadas en pocillos de un dispositivo de microfluidos. Por ejemplo, las gotas se pueden alinear lado a lado en un canal o un recipiente de un sistema de microfluidos, donde cada una de las gotas está separada por un fluido continuo. En otro ejemplo, una pluralidad de gotas está posicionada (p. ej., de forma aleatoria) en un recipiente grande de un dispositivo de microfluído. También se contemplan otras configuraciones.

#### Canales de microfluidos

Las gotas u otras regiones aisladas de fluido se pueden posicionar en regiones de un dispositivo de microfluído que tiene cualquier dimensión transversal adecuada. Típicamente, los canales de fluido en un sistema de microfluído tienen dimensiones transversales máximas de menos de 2 mm y, en algunos casos, de menos de 1 mm. En algunas realizaciones, todos los canales de fluido de un dispositivo tienen una dimensión transversal mayor de no más de 2 mm o 1 mm. Sin embargo, se pueden utilizar regiones más grandes, tales como recipientes que tienen una dimensión transversal mayor de, por ejemplo, entre 2 mm y 50 mm, para alojar las gotas u otras entidades. En un conjunto de realizaciones, la dimensión transversal máxima del o de los canales de un dispositivo de microfluído es menor que 500 micrones, menor que 200 micrones, menor que 100 micrones, menor que 50 micrones o menor que 25 micrones. El canal puede tener cualquier forma transversal adecuada (circular, ovalada, triangular, irregular, cuadrada o rectangular, o similares), cualquier configuración adecuada (p. ej., serpentina, recta) y puede estar cubierto o descubierto. En realizaciones donde está completamente cubierto, al menos una porción del canal puede tener una sección transversal que está completamente rodeada o todo el canal puede estar completamente rodeado a lo largo de su longitud total con la excepción de su o sus entradas y salidas. Un canal también puede tener una relación de aspecto (longitud con respecto a dimensión transversal promedio) de al menos 2:1, más típicamente al menos 3:1, 5:1 o 10:1 o más. Un canal abierto generalmente incluirá características que facilitan el control sobre el transporte de fluidos, p. ej., características estructurales (una hendidura alargada) y/o características físicas o químicas (hidrofobicidad con respecto a hidrofiliidad) u otras características que pueden ejercer una fuerza (p. ej., una fuerza de contención) sobre un fluido. El fluido dentro del canal puede llenar de forma parcial o completa el canal. En algunos casos donde se usa un canal abierto, el fluido puede mantenerse dentro del canal, por ejemplo, utilizando tensión superficial (es decir, un menisco cóncavo o convexo).

Los canales del dispositivo pueden ser hidrófobos o hidrófilos para minimizar la energía libre en la superficie en la interfaz entre un material que fluye dentro del canal y las paredes del canal. Por ejemplo, si se desea formar gotas acuosas en un aceite, las paredes del canal pueden hacerse hidrófobas. Si se desea formar gotas de aceite en un fluido acuoso, las paredes de los canales pueden hacerse hidrófilas. También se contemplan otras configuraciones.

#### Métodos que implican microfluidos

Según se describe en la presente memoria, determinados aspectos de la descripción se refieren a métodos para enriquecer de forma simultánea diversos alelos de escasa abundancia (secuencias diana) de una muestra por medio de COLD-PCR o ice-COLD-PCR. En algunos casos, las secuencias diana son mutaciones a un nivel de 1-10 %. Un método puede implicar, por ejemplo, introducir un primer fluido objeto en una fase dispersa en un primer canal de un dispositivo de microfluidos e introducir un fluido de fase continua en un segundo canal del dispositivo. El dispositivo puede incluir componentes tales como regiones de calentamiento y enfriamiento para llevar a cabo la PCR. El primer fluido objeto puede incluir una o más secuencias diana que se enriquecerán y opcionalmente otros componentes para llevar a cabo la COLD-PCR o ice-COLD-PCR (p. ej., dNTP, enzimas tales como polimerasa y/o componentes tampón). Los canales del dispositivo de microfluidos se pueden configurar para formar gotas del fluido objeto (p. ej., un primer conjunto de gotas); por ejemplo, los canales se pueden disponer en una configuración de enfoque de flujo para permitir la formación de las gotas. El método puede implicar formar una pluralidad de gotas del fluido objeto (cada una de las gotas contiene fragmentos de la secuencia diana que se enriquecerá), donde las gotas opcionalmente están monodispersas. En algunos aspectos, el método puede implicar introducir un segundo fluido objeto que contiene un segundo conjunto de componentes para llevar a cabo la PCR (p. ej., cebadores para

regiones específicas) en el dispositivo. En algunos aspectos, también se pueden formar gotas con el segundo fluido objeto (p. ej., un segundo conjunto de gotas). En algunos casos, una gota del primer conjunto se fusiona con una gota del segundo conjunto para formar gotas combinadas, donde cada una de estas contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la COLD-PCR o ice-COLD-PCR. El método puede implicar llevar a cabo la COLD-PCR o ice-COLD-PCR en la pluralidad de gotas (combinadas) de forma simultánea en el dispositivo de microfluidos para permitir el enriquecimiento simultáneo de diversos alelos de escasa abundancia (secuencias mutantes) de la muestra.

Como resultado de llevar a cabo uno o más métodos descritos en la presente memoria, en algunos aspectos, se puede proporcionar una pluralidad de gotas, cada una de las gotas contiene fragmentos enriquecidos de secuencias diana, en donde las secuencias diana comprenden mutaciones a un nivel de 1-10 %.

La amplificación por COLD-PCR paralela masiva en gotas se puede llevar a cabo utilizando un dispositivo de microfluidos de RainDance™ Inc. que puede dispensar ADN y reactivos de PCR dentro de las gotas individuales antes de llevar a cabo la amplificación en millones de gotas en paralelo para enriquecer las secuencias que contienen mutaciones. Para combinar la COLD-PCR con la tecnología de RainDance™, se pueden aplicar las siguientes modificaciones a la tecnología de Raindance™ existente:

(a) la cantidad de ADN de entrada se puede ajustar de manera que cada nanogota contenga un promedio de ~2-1000 copias genómicas (en lugar de un promedio de 1 copia genómica aplicada actualmente). De esta manera, se posibilitará la formación de heterodúplexes durante el ciclado de COLD-PCR.

(b) Debido a que RainDance™ amplifica las regiones de ADN genómico con una varianza de 10 veces de gota a gota, se puede aumentar la cantidad total de gotas formadas por experimento de 5 a 10 veces. Esto corresponde a aumentar el ADN de entrada total utilizado y el tiempo total de formación de gotas, por ejemplo, de los actuales 6-10 minutos a ~60 minutos. De esta manera, la probabilidad de capturar eventos de bajo nivel (mutaciones) en gotas no se verá afectada por la variabilidad entre gotas, mientras que en la etapa posterior de COLD-PCR se enriquecerán las mutaciones.

#### COLD-PCR/ice-COLD-PCR sobre soporte sólido

En algunos aspectos, el método se lleva a cabo sobre un soporte sólido. Por ejemplo, se captura la mezcla de reacción sobre perlas magnéticas. Esto se podría lograr al hibridar los fragmentos de ADN con oligos de captura biotinilados y posteriormente incubar los híbridos de oligo-ADN con perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. A continuación, se lavan las perlas para retirar el ADN no unido. De manera alternativa, se acopla una secuencia de referencia (RS, por sus siglas en inglés) a una microperla magnética mediante unión de estreptavidina-biotina. A continuación, se utiliza la RS para capturar la mezcla de reacción al incubar las perlas unidas a RS con la mezcla de reacción. Tras la incubación y el lavado, cada perla contiene varias copias de secuencias mutantes y secuencias naturales hibridadas con la RS unida a la perla.

Luego, se rodea cada perla dentro de una emulsión que contiene una única perla con secuencias mutantes y naturales capturadas y cebador inverso específico para secuencia unido a esta además del cebador directo y la mezcla de PCR común en disolución dentro de la emulsión. A continuación, se lleva a cabo la PCR convencional para permitir la formación de fragmentos de ADN iso-Tm y posteriormente reacciones COLD-PCR dentro de la emulsión. En algunos aspectos, ambos cebadores pueden ser comunes para todas las secuencias diana tras de ligación de «colas» comunes para las secuencias diana y ambos cebadores pueden unirse a la perla.

En algunos aspectos, se llevan a cabo varias reacciones de PCR convencional individuales en disolución utilizando cebadores biotinilados con colas de cebador comunes. Los pares de cebadores se diseñan de manera que todos los amplicones resultantes sean iso-Tm (es decir, tras la amplificación, todos los amplicones resultantes tienen la misma temperatura de fusión) o iso-Tc. Cada producto de PCR (amplicón iso-Tm o amplicón iso-Tc) luego se incuba con perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. El ADN no unido se retira por lavado. Como resultado se obtiene varias copias de secuencias diana unidas a la superficie de la perla (es decir, se obtienen varios grupos de perlas de ice-COLD-PCR con dianas unidas a su superficie). A continuación, se mezclan todos los grupos de perlas en un único tubo. Luego, se rodea cada perla dentro de una emulsión de manera que a lo sumo una única perla se rodee dentro de cada emulsión junto con componentes de PCR. Después, utilizando los cebadores comunes, se lleva a cabo la COLD-PCR en todas las perlas de forma simultánea según se describe en la presente memoria.

#### Composiciones de perlas para COLD-PCR/ice-COLD-PCR

Según algunos aspectos de la descripción, se proporciona una composición que comprende microperlas magnéticas recubiertas con estreptavidina que tienen pares de cebadores acoplados a la superficie de la perla. Las perlas pueden tener un tamaño de 1-3 µm. Uno o ambos cebadores específicos para las secuencias mutantes y naturales se pueden unir a la superficie de la perla. En algunos aspectos, un cebador específico para secuencia se acopla a la perla, mientras que el cebador común se agrega a la emulsión durante la amplificación. En algunos aspectos, los cebadores diseñados especialmente que tras la amplificación resultan el amplicones de ADN iso-Tm o iso-Tc se unen a la superficie de la perla.

Según algunos aspectos de la descripción, se proporcionan perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina que tienen una secuencia de referencia (RS) unida a la superficie de la perla. La secuencia de referencia es específica para la diana de ADN prevista y se puede unir a la perla a través de un nucleótido biotinilado. Preferiblemente, la RS contiene un di-desoxi-nucleótido en el extremo 3' con una doble biotina sostenida por un separador de cadena de carbono. Por lo tanto, la RS está bloqueada en 3' para la extensión por polimerasa y se diseña de acuerdo con los métodos descritos en Milbury CA, et al. (Ice-COLD-PCR enables rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown ADN mutations. *Nucleic Acids Res*;39:e2).

La RS se puede sintetizar por medio de sintetizadores oligonucleotídicos estándares. Este modo de síntesis tiene la ventaja adicional de que los nucleótidos modificados, tales como el ácido nucleico peptídico (PNA, por sus siglas en inglés) o el ácido nucleico bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés) o uracilo (U) se pueden insertar a voluntad en cualquier posición deseada en la secuencia RS. El uso de PNA en la posición de la secuencia donde se sabe que se concentran las mutaciones «centrales» en muestras de cáncer clínicas puede potenciar la capacidad de enriquecer estas mutaciones específicas. Alternativamente, la RS se puede sintetizar a través de reacción PCR de la secuencia adecuada a partir de una muestra de ADN natural. La PCR se puede llevar a cabo con un cebador biotinilado en 5' si se desea la inmovilización en las perlas desde el extremo 5' de la RS. Tras la PCR, el extremo 3' del amplicón sintetizado se bloquea para la extensión por polimerasa, p. ej., al agregar un di-desoxi-nucleótido (ddNTP) que evita la extensión adicional. Opcionalmente, el ddNTP también se biotinila o doble biotinila cuando se desea para permitir la unión de la RS sintetizada a las perlas con estreptavidina desde el extremo 3'. Otro modo para bloquear el extremo 3' es a través de un grupo -PO<sub>4</sub>, a través de un grupo C-3 en el extremo 3' de la secuencia, o a través de cualquier otro método conocido para los expertos de síntesis de oligonucleótidos y bioquímica de ácido nucleico.

La RS es complementaria a la secuencia diana de ADN natural, pero es 5-20 bp más corta en longitud de manera que no permite la unión del cebador a la RS o a la estructura bicatenaria que consiste en la RS más una secuencia diana hibridada a la RS. En algunos aspectos, la perla también contiene en su superficie un cebador unido biotinilado en 5' (p. ej., un cebador inverso) correspondiente a un extremo de la diana de ADN prevista (Figura 2). El cebador solo tiene una superposición parcial con la RS y se puede diseñar según los métodos descritos en Milbury CA, et al. (Ice-COLD-PCR enables rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown ADN mutations. *Nucleic Acids Res*;39:e2). Las cantidades relativas de cebador con respecto a RS unidas a la superficie pueden variar, pero preferiblemente están en el intervalo de una relación entre cebador y RS de 0,01-100; o 0,1-10; o 0,5-2,0. En otro aspecto de la descripción, un par de cebadores de ácido nucleico correspondientes a los extremos de la diana de ADN prevista se unen a la perla de ice-COLD-PCR.

Las perlas unidas a RS descritas en la presente memoria llevan a cabo diversas funciones:

(i) Las perlas permiten la captura e hibridación específica de secuencia de las secuencias diana con la RS correspondiente en la superficie de la perla cuando se incuban con fragmentos de ADN genómico a una temperatura adecuada, p. ej., 60-70 °C. Tras el lavado repetido de las perlas magnéticas, cada perla unida a RS contiene solo las secuencias diana complementarias a la secuencia de captura unida a esta. Estas secuencias pueden ser naturales o mutantes, dado que a temperaturas de hibridación de 60-70 °C hay poca discriminación entre secuencias diana naturales y que contienen mutaciones puntuales únicas y se espera que ambas se unan a la RS. Por lo tanto, cada perla puede capturar numerosas secuencias diana que incluyen secuencias naturales y mutantes en su superficie, donde todas se hibridan con la RS unida a la perla. De esta manera, cientos o miles de diversas secuencias diana se pueden hibridar de forma simultánea con su RS respectiva sobre la superficie de la perla, por consiguiente, cada RS sirve como un «imán» para su propia secuencia diana complementaria.

(ii) Las perlas permiten llevar a cabo la COLD-PCR posterior en emulsión. En algunos aspectos, tras la incubación de las perlas unidas a RS con secuencias diana y la captura de cada grupo de secuencias diana sobre la correspondiente RS unida a la perla, se agrega un cebador directo (común para todas las secuencias diana) y componentes de PCR a la disolución de perlas y se rodea a las perlas en emulsión, según los protocolos generales descritos en Diehl F, Li M, He Y, et al. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods* 2006;3(7):551-9; Li M, Diehl F, Dressman D, et al. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nat Methods* 2006;3(2):95-7; y Dressman D, Yan H, Traverso G, et al. Transforming single ADN molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(15):8817-22. Cada emulsión abarca una perla unida a RS. A continuación, las perlas contienen varias copias de secuencias mutantes y naturales capturadas, así como un cebador inverso unido a su superficie y un cebador directo en disolución dentro de la emulsión (Figura 3). Durante la amplificación por COLD-PCR posterior, las secuencias diana capturadas que son naturales permanecen unidas a la RS; mientras que las secuencias mutantes capturadas se desnaturalizan a la Tc correcta y se amplifican de forma selectiva dentro de la emulsión. Después de la amplificación, las perlas contienen principalmente secuencias diana mutadas, algunas de las cuales están unidas a la superficie de la perla mientras que otras flotan libres dentro de las emulsiones (Figura 4). Debido a la proximidad de las cadenas de ADN logradas al llevar a cabo la COLD-PCR dentro de la emulsión, se logrará un enriquecimiento elevado de las mutaciones en cualquier posición de las secuencias diana capturadas de forma múltiple.

COLD-PCR independiente de la temperatura

Según algunos aspectos de la descripción, en lugar de generar amplicones de ADN iso- $T_m$  antes de iniciar la COLD-PCR, se lleva a cabo una COLD-PCR independiente de la temperatura. Esta modificación elimina el requisito de que el usuario aisle fragmentos iso- $T_m$  o iso- $T_c$  antes de iniciar la COLD-PCR y proporciona un procedimiento de una etapa en un tubo para todos los fragmentos de ADN genómico o fracciones de estos. Por lo tanto, la modificación descrita permite la COLD-PCR/ice-COLD-PCR múltiple en dianas de ADN con diversas temperaturas de desnaturalización, de forma simultánea. La estrategia se puede utilizar para llevar a cabo la COLD-PCR independientemente de la temperatura (TI-COLD-PCR, por sus siglas en inglés) en disolución, en gotas o sobre un soporte sólido.

En algunos aspectos, la mezcla de reacción se dispensa en gotas que luego se fusionan con gotas que contienen cebadores para las dianas de ADN previstas. La TI-COLD-PCR se lleva a cabo mediante temperaturas de desnaturalización progresivas desde valores más bajos hasta más altos para cubrir gradualmente todo el intervalo de posibles temperaturas de desnaturalización. En algunos aspectos, se lleva a cabo PCR convencional antes de la TI-COLD PCR para enriquecer las mutaciones de escasa abundancia antes de la TI-COLD PCR.

Suponiendo que para una secuencia dada la  $T_c$  correcta es 84,7 °C. La TI-COLD-PCR se lleva a cabo durante 10 ciclos a 80 °C, luego 10 ciclos a 80,3, 10 ciclos a 80,6, etc., hasta que se alcanza la temperatura de desnaturalización de 95 °C donde todas las secuencias deberían haberse desnaturalizado en alguna etapa. A una temperatura inferior a 84,7 °C ninguna de las secuencias diana se desnaturalizaría y, por lo tanto, no se amplificaría ninguna diana. A 84,7 °C, las secuencias mutadas se amplificarán de forma selectiva utilizando los cebadores específicos para secuencia presentes en la reacción de PCR. Por encima de los 84,7 °C, todas las secuencias se amplificarán por igual, es decir, las secuencias mutadas ya enriquecidas más las secuencias naturales tendrían la misma amplificación a temperaturas de desnaturalización superiores a 84,7 °C. A la temperatura de desnaturalización final de 95 °C, las secuencias diana, amplificadas, mutadas se enriquecerían con respecto a las secuencias naturales. De forma similar, para todas las otras secuencias diana con diferentes  $T_c$ , se aplicaría el mismo escenario: a una temperatura de desnaturalización por debajo de su  $T_c$  no se amplificarían, a la  $T_c$  se amplificarían solo si están mutada, mientras que por encima de la  $T_c$  todas las amplificarán por igual. Por consiguiente, en general, a la temperatura de desnaturalización final de 95 °C, las secuencias diana, amplificadas, mutadas se enriquecerían con respecto a las secuencias naturales, para todas las dianas de ADN presentes en la reacción.

La TI-COLD PCR se puede llevar a cabo en disolución en un tubo. Esto requiere que para cada secuencia diana haya un par de cebadores aparte y que todos los cebadores se agreguen juntos a la reacción. Por lo tanto, el par de cebadores específico para una secuencia dada no se utilizará hasta que la temperatura de desnaturalización sea suficientemente alta para alcanzar la temperatura crítica de desnaturalización  $T_c$  en la que las secuencias diana mutantes se amplifican de forma preferencial con respecto a las secuencias naturales. A la temperatura de desnaturalización  $T_c$ , los cebadores específicos para la secuencia diana se consumirán sustancialmente al sintetizar principalmente los amplicones mutantes. A una temperatura por encima de la  $T_c$ , cualesquiera cebadores restantes se utilizarán de igual forma para amplificar las secuencias mutantes (enriquecidas) más las naturales, hasta consumirse por completo.

Sin embargo, un problema de esta estrategia es que los cebadores tenderán a hacer reacción entre sí y formar dímeros de cebador y subproductos. Este efecto indeseado se puede evitar al limitar la concentración de cebadores a la más baja posible (p. ej., en el intervalo de 0.01-0.2  $\mu$ m), acoplar a todas las secuencias diana el mismo cebador en un extremo y un cebador específico para secuencia en el otro extremo, o acoplar cebadores comunes a ambos extremos de todas las secuencias diana. De manera alternativa, la TI-COLD PCR se puede llevar a cabo de forma restringida en el espacio, en gotas como se lleva a cabo mediante Raindance™ o sobre un soporte sólido, según se describe en la presente memoria. Por ejemplo, al utilizar perlas unidas a RS que tienen un cebador específico para la diana unido a su superficie y un cebador directo genérico en disolución, cada emulsión contendrá cebadores específicos para la secuencia diana capturada en la RS, para evitar, de esta forma, las interacciones indeseadas entre cebadores. Por lo tanto, utilizar valores progresivos de temperatura del más bajo al más alto amplificará las secuencias diana de forma selectiva en todas las emulsiones de forma simultánea, sin la necesidad de aislar las dianas de ADN iso- $T_c$  o conocer desde antes la  $T_c$  necesaria para la COLD-PCR. En algunos aspectos, se lleva a cabo PCR convencional antes de la TI-COLD PCR para enriquecer las mutaciones de escasa abundancia antes de la TI-COLD PCR.

COLD-PCR independiente de la temperatura sobre soporte sólido

Se rodea a las perlas en una emulsión, cada perla contiene inmovilizadas en su superficie: (a) la secuencia de referencia 1 para la diana 1, (b) el cebador directo 1 para la diana 1. La emulsión también contiene (c) el cebador inverso 1 para la diana 1, polimerasa, dNTP y tampones para PCR. Además, las emulsiones 2, 3, 4, etc. contienen de forma similar componentes para las dianas 2, 3, 4, etc. Los cebadores se proporcionan dentro de cada emulsión en cantidad limitada y los cebadores se pueden agotar después de alrededor de 20-25 ciclos. Suponiendo que la diana 1 tiene una  $T_c$ = 84,0 °C, la diana 2 tiene una  $T_c$ = 85,0 °C y la diana 3 tiene una  $T_c$ = 86 °C, etc., la ice-COLD-PCR se aplica primero durante 20 ciclos a la  $T_c$  para la diana 1 ( $T_c$ = 84,0 °C), en los cuales las secuencias que contienen mutación en la emulsión que contiene la diana 1 se amplifican, mientras que las secuencias naturales no se amplifican. Al mismo tiempo, ninguna de las dianas 2, 3, 4, etc. se amplificará en otras emulsiones, dado que ni

las secuencias naturales ni las mutantes se desnaturalizan a esta temperatura de desnaturalización. Tras los 20 ciclos de ice-COLD-PCR, los cebadores se agotan y la reacción dentro de la emulsión que contiene la diana 1 se detiene. Si dianas adicionales dentro de diferentes emulsiones tienen una  $T_c$  similar a la de la diana 1 ( $T_c = 84,0$  °C), entonces también se amplificarán a esta temperatura, de forma similar a la diana 1. De este modo, todos los fragmentos iso- $T_m$ /iso  $T_c$  se coamplifican a  $T_c = 84$  °C durante los 20 iniciales.

A continuación, el ciclado se cambia a otros 20 ciclos a la  $T_c$  para la diana 2 ( $T_c = 85,0$  °C), en los cuales las secuencias que contienen mutación en la emulsión que contiene la diana 2 se amplifican, mientras que las secuencias naturales prácticamente no se amplifican. De manera similar, tras los 20 ciclos de ice-COLD-PCR, los cebadores se agotan y la reacción dentro de la emulsión que contiene la diana 2 se detiene. Las dianas que también tienen la  $T_c = 85,0$  °C se coamplifican con la diana 2. Al seguir el mismo esquema, se cubren las temperaturas de desnaturalización que abarcan todo el intervalo de temperaturas (p. ej., 80-92 °C) en una única reacción de COLD-PCR, en un único tubo. Las reacciones en emulsiones individuales comienzan cada vez que se alcanza la  $T_c$  correcta y se detienen cada vez que se agotan los cebadores. Esta estrategia garantiza que los cebadores no tiendan a crear dímeros de cebador dentro de las emulsiones. En algunos aspectos, todas las dianas tienen cebadores comunes en uno o ambos extremos. Debido a que se aplican muchos ciclos de PCR en esta estrategia, se puede utilizar polimerasa que no se desactiva fácilmente a temperaturas elevadas (p. ej., Phusion).

La principal ventaja de esta estrategia es que no es necesario aislar fragmentos iso- $T_m$  del ADN genómico ni conocer cuál es la  $T_m$  y  $T_c$  de las dianas. Debido a que se aumentan las temperaturas progresivamente hasta todas las posibles temperaturas de desnaturalización, desde la temperatura más baja a la más alta, el enriquecimiento de la mutación enriquecimiento se produce siempre hasta que los cebadores se agotan en todas las emulsiones. Las reacciones en emulsiones individuales comienzan cada vez que se alcanza la  $T_c$  correcta y se detienen cada vez que se agotan los cebadores.

COLD-PCR independiente de la temperatura que utiliza la incorporación de desoxinucleótidos modificados durante la amplificación.

En algunos aspectos, la COLD-PCR independiente de la temperatura de múltiples fragmentos de ADN que tienen diferentes  $T_m$  y  $T_c$  se lleva a cabo en presencia de desoxinucleótido trifosfatos modificados en la reacción. Por ejemplo, los trifosfatos contienen bases modificadas tales como: 2'-desoxi-inosina; di-amino-purina; iso-guanina; iso-citosina; meti-citosina; 7-(2-tienil)imidazo[4,5-b]piridina; 2-nitro-4-propinilpirrol; aminoalil-uridina; xantina; diaminopirimidina; bases coordinadas por metales tales como 2,6-bis(etiltiometil)piridina con ion de plata o una mondentato piridina con un ion de cobre; análogos de nitroazol; o se puede utilizar cualquier otro nucleótido trifosfato modificado que se pueda incorporar al ADN mediante la polimerasa durante la PCR. Al incorporar bases modificadas en el ADN durante la PCR, la  $T_m$  de los diversos fragmentos de ADN se vuelve más uniforme y, por lo tanto, facilita que la TI-COLD-PCR amplifique y enriquezca las secuencias mutantes en múltiples fragmentos de forma simultánea.

Por ejemplo, suponiendo que un fragmento de ADN dado tiene un contenido de 60 % de GC y una  $T_m$  elevada correspondiente de 90 °C, mientras que un segundo fragmento tiene un contenido de 40 % de GC y una  $T_m$  correspondiente de 85 °C. Si se incorpora 2'-desoxi-inosina a la reacción de amplificación, este reemplazará a la mayoría de las guaninas en ambos fragmentos de ADN y resultará en la formación de enlaces de inosina:citosina en lugar de enlaces G:C. Por consiguiente, el efecto del contenido de GC sobre la  $T_m$  se reducirá o eliminará y ambas secuencias terminarán con una  $T_m$  similar. Del mismo modo, se puede aplicar también la estrategia opuesta. Al incorporar 2-amino-purina en lugar de adenina, la  $T_m$  de todas las secuencias aumentará y, por lo tanto, hará que todos los fragmentos tengan una  $T_m$  elevada uniforme.

Dichas estrategias que utilizan bases de ADN modificadas facilitarán la aplicación de la TI-COLD-PCR, dado que se pueden aproximar las  $T_m$  de numerosos fragmentos de ADN. Por lo tanto, la ventana de temperatura elegida para la TI-COLD-PCR puede ser estrecha y fácil de lograr.

Técnicas electroforéticas para separar fragmentos de ADN según su  $T_m$

En algunos aspectos, en lugar de pares de cebador diseñados especialmente y amplificación por PCR para generar fragmentos de ADN iso- $T_m$ , se utilizan técnicas electroforéticas para separar los fragmentos de ADN según su  $T_m$ . Se separan físicamente diversas dianas de ADN con un intervalo de  $T_m$  (y  $T_c$ ) diferentes mediante electroforesis en gel o capilar y se recogen en diferentes fracciones que tienen diversas dianas de ADN que tienen esencialmente la misma  $T_m/T_c$ . Por ejemplo, en la CDCE (electroforesis capilar de desnaturalización constante, Khrapko et al. Nucleic Acids Res. 11 de febrero de 1994, 22(3):364-369) se inyectan fragmentos de ADN bicatenarios a través de un capilar sometido a un gradiente de temperaturas. El ADN que se desnaturaliza a una determinada  $T_m1$  se desplaza a una tasa diferente a través del capilar con respecto al ADN no desnaturalizado y, por lo tanto, se separa del ADN bicatenario y se puede recoger como la fracción 1. De manera similar, el ADN que se desnaturaliza a  $T_m2$  se recoge como la fracción 2, etc. Cada fracción contiene dianas de ADN con diversas secuencias, donde todas tienen la misma  $T_m/T_c$  (o muy similar).



En algunos aspectos, se agregan adaptadores comunes a los extremos de todas las dianas de ADN de manera que todos se puedan amplificar en una única reacción de PCR. Tras la recogida, los fragmentos de ADN contenidos dentro de cada fracción se pueden amplificar en un único tubo y con el mismo programa de COLD-PCR utilizando los adaptadores comunes. Por consiguiente, cada fracción requiere una reacción de COLD-PCR diferente. Por lo tanto, por ejemplo, si se recogen 20 fracciones separadas que representan todas las *Tm* posibles en el intervalo 80-90 °C, dentro de «celdas» de 0,5 °C, se puede amplificar una parte sustancial del genoma humano y enriquecer las mutaciones dentro de cada celda. Tras 20 amplificaciones por COLD-PCR separadas, a continuación, los amplificantes se mezclan y secuencian en una única pasada de secuenciación de última generación.

Otras estrategias para la separación física de fragmentos de ADN de diversas *iso-Tm/iso-Tc* incluyen medios electroforéticos en gel, tales como electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE, por sus siglas en inglés), electroforesis en gel de desnaturalización constante (CDGE, por sus siglas en inglés), electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE, por sus siglas en inglés) y electroforesis capilar con gradiente de temperatura (TGCE, por sus siglas en inglés).

Análisis de las secuencias amplificadas por COLD-PCR

Secuenciación: Tras el enriquecimiento de las secuencias diana que contienen mutación a través de las estrategias basadas en COLD-PCR múltiple y las composiciones descritas en la presente memoria, los fragmentos de ADN amplificados se pueden concentrar al disolver la emulsión (o mediante purificación simple si la reacción se llevó a cabo en disolución sin emulsión) y procesar para secuenciación mediante cualquiera de las estrategias de secuenciación de última generación (NGS, por sus siglas en inglés) disponibles, incluidas tecnologías de secuenciación segunda y tercera (molécula simple). Diversas estrategias de NGS incorporan una etapa de PCR como parte de la secuenciación. Por consiguiente, una estrategia es aprovechar esta etapa de PCR e incorporar el proceso de COLD-PCR dentro de la propia secuenciación.

Incorporación de COLD-PCR dentro de la etapa de amplificación de «colonia de PCR» utilizada en la secuenciación de última generación: Esta estrategia integra la COLD-PCR en la propia secuenciación, en oposición a los ejemplos anteriores que describen la *iso-Tc* COLD-PCR o TI-COLD-PCR que se lleva a cabo como un procedimiento independiente antes de la NGS.

Durante la secuenciación de última generación, el ADN diana se inmoviliza sobre un soporte sólido y se amplifica por PCR de forma clonal para formar colonias de PCR (también conocidas como «polonias») y posteriormente se lleva a cabo la secuenciación sobre el soporte sólido. La presente descripción permite la amplificación simultánea de numerosos fragmentos *iso-Tm* sobre un soporte sólido utilizando COLD-PCR. Debido a la proximidad de las dianas inmovilizadas sobre el soporte sólido, se espera que la COLD-PCR sea muy eficaz, donde esencialmente se amplifican solo las secuencias que contienen mutación que luego se secuencia directamente. De esta manera, se pronostica que la eficacia de la secuenciación aumentará varios órdenes de magnitud dado que esencialmente SOLO se leen secuencias que contienen mutación. Se proporciona esencialmente una secuenciación de última generación para ADN solo mutante.

Iso-*Tm* o *iso-Tc* COLD-PCR sobre soporte sólido, como parte de la etapa de formación de polonias dentro de la secuenciación de última generación.

A. Para la plataforma Illumina

1. Se producen fragmentos *iso-Tm* o *iso-Tc* a partir de ADN genómico, utilizando uno de los métodos descritos en la presente memoria. La fragmentación no se hace de forma aleatoria y el resultado es dianas monocatenarias con adaptadores comunes.

2. El ADN diana se une de forma aleatoria a la superficie interior de los canales de celda de flujo.

3. Se agregan los nucleótidos y la polimerasa para iniciar la amplificación COLD-PCR completa puenteada en fase sólida de los fragmentos *iso-Tm/iso-Tc*.

4. La COLD-PCR completa sobre soporte sólido permitirá la desnaturalización de las secuencias que contienen malapareamientos formadas mediante la hibridación de las secuencias mutantes inmovilizadas con las secuencias naturales inmovilizadas adyacentes, mientras que las secuencias sin malapareamientos (naturales) se suprimirán de forma eficaz.

5. Las secuencias desnaturalizadas contienen un porcentaje elevado de secuencias que contienen mutación

6. Se generan agrupaciones densas de ADN bicatenario enriquecido con secuencias que contienen mutación en cada canal de la celda de flujo de Illumina.

7. A continuación, se procede a la secuenciación por síntesis, según la plataforma Illumina.

B. Para la plataforma Roche-454 o el sistema Ion Torrent (PCR en emulsión)

1. Producir fragmentos iso-Tm o iso-Tc a partir de ADN genómico, utilizando uno de los métodos descritos en la presente memoria. La fragmentación no se hace de forma aleatoria y el resultado es dianas de ADN monocatenario. En algunos aspectos, las dianas contienen adaptadores comunes.

5 2. Unir el ADN diana a las perlas que contienen cebadores densos en su superficie, cada cebador es específico para una diana diferente. En algunos aspectos, los cebadores reconocen a los adaptadores comunes.

3. Mezclar las dianas con las perlas en una relación menor que 1 diana por perla, luego rodear las perlas con emulsión junto con nucleótidos, polimerasa y uno de los dos cebadores que también se inmoviliza sobre la perla según el protocolo de Roche-454.

10 4. Iniciar la amplificación COLD-PCR completa basada en emulsión de los fragmentos iso-Tm. La COLD-PCR completa inmovilizada sobre perlas rodeadas en nanorreactores (emulsión) permite la rápida hibridación de las secuencias mutantes con las naturales que permite la desnaturalización de las secuencias naturales inmovilizadas adyacentes.

15 BEAM y citometría de flujo: Puede ser deseable aislar perlas/emulsiones que contienen secuencias mutadas que han sido amplificadas durante la COLD-PCR y descartar las perlas que contienen solo las secuencias naturales, a efectos de lograr que la posterior secuenciación sea incluso más eficaz. En el caso donde se han aislado primero las secuencias iso-Tc a partir del ADN genómico antes de la COLD-PCR, se espera que las únicas emulsiones que contienen cantidad copiosas de ADN sean aquellas que incluyen secuencias mutadas, dado que en las emulsiones con secuencias naturales habrá escasa amplificación. En este caso, las perlas con ADN amplificado se pueden clasificar a través de citometría de flujo de alto rendimiento en presencia de tinte de unión a ADN, en una estrategia similar a la tecnología BEAM (véase Li M, Diehl F, Dressman D, et al. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. Nat Methods 2006;3(2):95-7). La población de perlas que produce señales de fluorescencia intensa es la que contiene las secuencias mutadas amplificadas y se puede clasificar y secuenciar.

Separación de cadena de ADN repetida a temperaturas críticas de desnaturalización (RE.SE.CT, por sus siglas en inglés)

25 Según la invención, se proporciona un método que permite la identificación de alelos de secuencias variantes (secuencias diana mutantes) en presencia de un gran exceso de alelos no variantes (secuencias diana naturales) en ácidos nucleicos sin la complicación de errores inducidos por polimerasa u otros artefactos introducidos por los cebadores. El enriquecimiento que se puede obtener a través de métodos basados en PCR tiene un límite, dado que después de varios ciclos de síntesis la polimerasa introduce forma inevitable incorporaciones erróneas (errores de PCR) que posteriormente se puntúan como mutaciones. La PCR/COLD-PCR repetida también puede introducir un cebado erróneo que resulta en la amplificación indeseada de secuencias que no son diana. Además, existen métodos de análisis genético de gran capacidad que emergieron actualmente («secuenciación de tercera generación») que pueden obviar por completo el uso de la PCR.

35 La RE.SE.CT permite el enriquecimiento de las secuencias diana mutantes sin introducir incorporaciones erróneas y amplifica de forma preferencial alelos minoritarios de mezclas de secuencias naturales y que contienen mutación, independientemente de dónde se encuentre la mutación y proporciona, de esta forma, un enriquecimiento elevado de las secuencias mutadas sin PCR y sin introducir ningún artefacto. La RE.SE.CT se vale de la observación de que las secuencias de ADN bicatenario que contienen uno o más malapareamiento de base simple se desnaturalizan rápido y se reasocian lentamente con respecto a las secuencias completamente apareadas (Figura 11). Al fijar la temperatura de desnaturalización en la Tc, las mutaciones en cualquier posición a lo largo de la secuencia se enriquecen durante la RE.SE.CT. Posteriormente, las secuencias enriquecidas se pueden someter a barrido con cualquiera de los métodos disponibles actualmente para detectar mutaciones, incluido la secuenciación Sanger, fusión de alta resolución (HRM, por sus siglas en inglés), SSCP (siglas en inglés para «polimorfismo de conformación de cadena simple»), secuenciación de última generación y MALDI-TOF (siglas en inglés para «espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por tiempo de vuelo»).

45 El método se puede utilizar para la detección múltiple de metilación de ADN y para enriquecer cadenas de ADN mutantes y cadenas de ADN dañadas, tales como ADN que contiene sitios abásicos que resulta de la exposición a agentes que dañan el ADN. La posición del sitio abásico creará un malapareamiento tras la hibridación con la secuencia de referencia que permite, por lo tanto, su desnaturalización selectiva tras la RE.SE.CT. A diferencia de las aplicaciones basadas en ice-COLD-PCR que requieren polimerasa de ADN para funcionar, en la RE.SE.CT no es necesario bloquear el extremo 3' de la RS, siempre que no se utilice polimerasa en el proceso de enriquecimiento de la mutación. Una ventaja de esta estrategia es que es fácil sintetizar la secuencia de referencia utilizando una reacción de PCR simple en lugar de síntesis con sintetizadores de oligonucleótidos que son costosos. Esto también permite utilizar secuencias de referencia más grandes, p. ej., RS de 200 bp. Lo cual representa una ventaja sustancial con respecto a la COLD-PCR.

55 En una realización, se proporciona un método para preparar una secuencia diana mutante monocatenaria a partir de una mezcla de secuencias diana que se sospecha que contienen la secuencia diana mutante y una secuencia diana natural. El método comprende: calentar las secuencias diana que se sospecha que contienen secuencias diana

mutantes y secuencias diana naturales hasta una temperatura de desnaturalización que es superior a la temperatura de fusión de las secuencias diana. Esto permite la formación de una mezcla que contiene secuencias mutantes monocatenarias y secuencias naturales monocatenarias. A continuación, la mezcla se pone en contacto con un exceso de secuencias de referencia que son complementarias a la secuencia natural y se lleva a cabo una etapa de hibridación completa, es decir, se reduce la temperatura para permitir la formación de dúplexes de cadena diana/cadena de referencia, en donde los dúplexes incluyen dúplexes de cadena mutante/cadena de referencia y dúplexes de cadena natural/cadena de referencia. Después, se lleva a cabo una etapa de desnaturalización selectiva, es decir, se eleva la temperatura hasta una temperatura crítica de desnaturalización que es inferior a la temperatura de fusión de los dúplexes de cadena natural/cadena de referencia para permitir la desnaturalización selectiva de los dúplexes de cadena mutante/cadena de referencia, de esta manera, se aumenta la relación de las secuencias diana mutantes monocatenarias con respecto a las secuencias diana naturales monocatenarias. Los dúplexes de cadena natural/cadena de referencia formados mediante la desnaturalización selectiva se retiran. Opcionalmente, en algunas realizaciones, la etapa de hibridación completa, la etapa de desnaturalización selectiva y la retirada de los dúplexes de cadena natural/cadena de referencia formados mediante desnaturalización selectiva se repiten al menos 1, 2, 3, 5, 10, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 veces. En algunas realizaciones, se agrega un exceso adicional de secuencia de referencia después de la retirada de los dúplexes de cadena natural/cadena de referencia.

Opcionalmente, en algunas realizaciones, el método comprende, además, llevar a cabo una etapa de hibridación selectiva, es decir, la temperatura se reduce para permitir la formación selectiva de dúplexes de secuencia diana natural/secuencia de referencia con respecto a la formación de dúplexes de secuencia mutante/secuencia de referencia. En algunas realizaciones, las etapas de desnaturalización selectiva e hibridación selectiva se repiten al menos 1, 2, 3, 5, 10, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 veces para enriquecer adicionalmente las secuencias diana mutantes monocatenarias.

Opcionalmente, en cualquiera de las realizaciones precedentes, las secuencias de referencia se acoplan a partículas. Opcionalmente, en cualquiera de las realizaciones precedentes, las secuencias de referencia se acoplan a partículas magnéticas.

Opcionalmente, en algunas realizaciones, las secuencias diana se ponen en contacto con un exceso de al menos dos secuencias de referencia diferentes, cada secuencia de referencia diferente es complementaria a una secuencia diana natural diferente, y los dúplexes formados por las secuencias naturales/secuencias de referencia tienen sustancialmente la misma temperatura de fusión, o sustancialmente la misma temperatura crítica de desnaturalización ( $T_c$ ). En algunas realizaciones, las secuencias diana se ponen en contacto con un exceso de al menos 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500 o 1000 secuencias de referencia diferentes.

Opcionalmente, en algunas realizaciones, el método comprende, además, detectar las secuencias diana mutantes monocatenarias. Opcionalmente, en algunas realizaciones, el método comprende, además, aislar las secuencias diana mutantes monocatenarias.

En algunas realizaciones, las secuencias diana mutantes monocatenarias se aíslan al poner en contacto las secuencias diana mutantes monocatenarias con cebadores (Figura 12). A continuación, se baja la temperatura rápidamente hasta alcanzar 50-55 °C para permitir la unión del cebador con las secuencias que son monocatenarias. La temperatura se eleva hasta 65-70 °C para posibilitar la extensión del único cebador a través de una polimerasa, en presencia de dNTPS etiquetados. El resultado es que las secuencias mutantes obtienen de forma selectiva una secuencia complementaria etiquetada. A continuación, las secuencias etiquetadas se inmovilizan sobre un soporte sólido recubierto con un resto de captura y el ADN no etiquetado (que es principalmente ADN natural) se retira. Las secuencias mutadas monocatenarias luego se recuperan del soporte sólido, por ejemplo, mediante desnaturalización térmica a 95 °C. Las secuencias mutadas que se recuperan representan la plantilla diana de ADN original, no la plantilla generada a través de la extensión de la polimerasa, que está etiquetada y se mantiene unida al soporte sólido después de la desnaturalización. En algunas realizaciones, el resto de etiqueta es biotina, y el resto de captura es avidina, o viceversa.

Alternativamente, a efectos de etiquetar selectivamente las secuencias mutantes monocatenarias, se podría utilizar un cebador etiquetado, en lugar de agregar dNTP etiquetado a la disolución. En algunas realizaciones, el resto de etiqueta es biotina, y el resto de captura es avidina, o viceversa.

En algunas realizaciones, las secuencias diana mutantes monocatenarias se aíslan al agregar un exceso de secuencias de referencia etiquetadas (Figura 13). A continuación, se reduce rápidamente la temperatura por debajo de 50 °C para permitir la formación de dúplexes de secuencia diana mutante monocatenaria/secuencia de referencia etiquetada. En la siguiente etapa, se elimina la sonda de exceso de referencia, por ejemplo, mediante tratamiento con exonucleasa, y las secuencias etiquetadas se capturan sobre un soporte recubierto con un resto de captura. Las secuencias mutadas monocatenarias luego se recuperan del soporte sólido, por ejemplo, mediante desnaturalización térmica a 95 °C. En algunas realizaciones, el resto de etiqueta es biotina, y el resto de captura es avidina, o viceversa.

En algunas realizaciones, las secuencias diana mutantes monocatenarias se aíslan al poner en contacto los dúplexes formados con un exceso de adaptador no etiquetado y ligasa termoestable a temperatura crítica de hibridación (p. ej., 78 °C). El adaptador no etiquetado preferencialmente se liga a plantillas bicatenarias. De este modo, el adaptador no etiquetado se ligará selectivamente a los alelos naturales, dado que estos están en dúplexes con las secuencias de referencia (Figura 14), pero no a los alelos mutantes dado que estos en su mayoría monocatenarios. A continuación, se utiliza un adaptador etiquetado que está en gran exceso con respecto al adaptador no etiquetado agregado anteriormente y la temperatura se reduce rápidamente para que el ADN diana se una a la secuencia de referencia y el adaptador etiquetado se ligue a todas las secuencias bicatenarias restantes (que se espera que sean en su mayoría secuencias mutantes, dado que la mayor parte de las secuencias naturales se ligó a un adaptador no etiquetado). Después, las secuencias etiquetadas se capturan sobre un soporte recubierto con un resto de captura. Las secuencias mutadas monocatenarias luego se recuperan del soporte sólido, por ejemplo, mediante desnaturalización térmica a 95 °C. En algunas realizaciones, el resto de etiqueta es biotina, y el resto de captura es avidina, o viceversa.

En algunas realizaciones, las secuencias diana mutantes monocatenarias se aíslan al utilizar secuencias de referencia etiquetadas. Los dúplexes formados por la secuencia natural/secuencia de referencia etiquetada se retiran mediante captura sobre la superficie sólida recubierta un resto de captura, de esta manera se deja la población enriquecida de secuencias diana mutantes monocatenarias. En algunas realizaciones, el resto de etiqueta es biotina, y el resto de captura es avidina, o viceversa.

En algunas realizaciones, las secuencias diana mutantes monocatenarias se aíslan al utilizar secuencias de referencia acopladas a perlas magnéticas. Después de llevar a cabo la etapa de desnaturalización selectiva, que permite la desnaturalización selectiva de los dúplexes de cadena mutante/cadena de referencia, pero no los dúplexes de cadena natural/cadena de referencia, las perlas magnéticas se retiran, lo cual resulta en la retirada de todas las secuencias de referencia más cualquier dúplex formado con las secuencias de referencia. En algunas realizaciones, la secuencia de referencia en exceso adicional acoplada a las perlas magnéticas se agrega y el proceso se repite al menos 1, 2, 3, 5, 10, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 veces. La secuencia de referencia se puede unir a través del extremo 5' o 3' a las perlas magnéticas, y los imanes se pueden activar y desactivar para permitir la retirada repetida de las perlas magnéticas de la reacción, tras la desnaturalización selectiva de las secuencias mutadas. El tamaño de las perlas unidas a la secuencia de referencia (RS-perlas) puede variar de grande (5 micrómetros) a pequeño (nanómetros de diámetro). (Figura 15)

Como alternativa al uso de perlas magnéticas, las secuencias de referencia se pueden inmovilizar sobre cualquier tipo de soporte sólido (p. ej., dentro de capilares hecho con vidrio, polímeros u otros compuestos; o dentro de dispositivos de microfluído o «chips» de microfluído en volúmenes muy pequeños). Alternativamente, la disolución de secuencias diana de ADN se puede pasar a través del soporte sólido (p. ej., impulsada a través de los capilares por medio de presión o movimiento capilar) para generar intercambios entre las microcámaras. Al regular la temperatura a lo largo de los capilares/microfluidos de forma adecuada, se puede posibilitar la unión de las secuencias que contienen mutación y las naturales a la secuencia de referencia, así como la desnaturalización selectiva de las secuencias que contienen mutación, que luego pasará a través de los capilares como una población de moléculas enriquecida. Por lo tanto, las secuencias que contienen mutación permanecerán en disolución y se pueden recuperar para ensayos posteriores.

En algunas realizaciones, las secuencias diana se preamplifican utilizando PCR asimétrica antes de ponerlas en contacto con las secuencias de referencia. La PCR asimétrica amplifica de forma preferencial una cadena de ADN en una plantilla de ADN bicatenaria, y se utiliza habitualmente en sondeo de secuenciación e hibridación donde se necesita la amplificación de solo una de las dos cadenas complementarias. La PCR se lleva a cabo de forma habitual, pero con un gran exceso del cebador para la cadena destinada a amplificación. Debido a la amplificación lenta (aritmética) más adelante en la reacción después de que el cebador limitante se ha agotado, se necesitan ciclos adicionales de PCR.

En algunas realizaciones, las secuencias diana se ponen en contacto con las secuencias de referencia en presencia de un disolvente orgánico. Los disolventes orgánicos presentes durante la unión de las secuencias diana interrogadas con las secuencias de referencia pueden tener efectos beneficiosos. Por ejemplo, los disolventes como betaína, DMSO, formamida y otros potencian la fidelidad de la hibridación de los ácidos nucleicos. Como resultado, la diferencia de temperatura entre una secuencia natural perfectamente apareada y una secuencia que contiene mutación se exagera en presencia de disolventes orgánicos. Además, la temperatura de fusión ( $T_m$ ) se reduce cuando hay disolventes orgánicos presentes y, por lo tanto, posibilita que la RE.SE.CT proceda a una temperatura más baja que es más fácil de alcanzar y que evita el posible daño de las cadenas de ADN provocado por la temperatura. Al mismo tiempo, los fragmentos de ADN con temperaturas de fusión de ADN sustancialmente diferentes en tampón acuoso normal terminan con temperaturas de fusión que son más próximas entre sí cuando se utilizan disolventes orgánicos, lo cual facilita la multiplexación. Los disolventes orgánicos de tanto como 50 % o más se pueden utilizar durante la RE.SE.CT dado que no hay ninguna enzima implicada en el proceso y como resultado el disolvente orgánico no inhibe ninguna parte del proceso.

La RE.SE.CT se puede utilizar junto con la COLD-PCR, a efectos de aumentar incluso adicionalmente el enriquecimiento de mutación obtenido a través de COLD-PCR. Por lo tanto, se puede contemplar la COLD-PCR

para enriquecer las secuencias mutadas 10 veces; luego la muestra se utiliza para RE.SE.CT, para enriquecer las secuencias mutadas otras 10 veces; etc. De este modo, la COLD-PCR y la RE.SE.CT actúan de forma sinérgica para aumentar el enriquecimiento de la mutación. La RE.SE.CT también se puede utilizar junto con diferentes métodos de amplificación, p. ej., con amplificación isotérmica conocida en la técnica, tal como LAMP, SPIE, etc.

- 5 La presente invención y descripción se ilustra de manera adicional mediante los siguientes Ejemplos, que de ninguna manera deben interpretarse como limitantes.

## EJEMPLO

### Materiales y métodos

#### Fuente de ADN genómico

- 10 Se adquirió ADN genómico de humano masculino de referencia de Promega y se utilizó como el ADN natural en experimentos de dilución. Se adquirió ADN genómico de la línea celular humana SW480 (que contenía mutación c.818 G>A en el exón 8 de *TP53*, c.925 C>T en el exón 9 de *TP53*) y T47D (que contenía c.580 C>T en el exón 6 de *TP53*) de ATCC. Los cebadores y anclajes se sintetizaron mediante Integrated ADN Technologies.

#### Aislamiento de diana en exones 8-9 de *TP53* mediante perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina

- 15 Se digirió primero el ADN genómico con la endonucleasa de restricción EcoO109I para liberar un fragmento de 336 bp que contenía los exones 8-9 de *TP53*. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 3,5 horas, que consistían en 50 µg de ADN, 100 unidades de EcoO109I, 1 × de tampón NEB 4 y 100 µg/ml de BSA. El ADN digerido se purificó a través de columnas Microcon YM-30 y se eluyó en agua. Para capturar los fragmentos de 336 bp, el ADN purificado se hibridó con una sonda biotilada en 5' (5'-biotina-GAA TCT GAG GCA TAA CTG CAC C-3'; núm. de ident. de sec.: 1), que es complementaria a la secuencia de cadena codificante de la región intrónica entre los exones 8-9. Las reacciones de hibridación se llevaron a cabo en 6 × de tampón SSPE (American Bioanalytical) con 2-5 µg de ADN genómico purificado y 33 nM de sonda biotilada y se incubaron a 42 °C durante 2 horas en un termociclador. Las reacciones hibridadas luego se purificaron a través de columna Microcon YM-30 para retirar el exceso de sonda y se eluyeron en 20 µl de agua. La captura de las dianas de ADNmc mediante Dynabeads se llevó a cabo esencialmente como describieron Li, et al. En resumen, se mezclaron 20 µl de híbridos sonda-ADN con 20 µl de Dynabeads M-270 Streptavidin (Invitrogen) prelavadas a temperatura ambiente durante 1 hora, posteriormente se lavaron tres veces con 1× de tampón de unión y lavado (5 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 mM de EDTA y NaCl 1M) complementado con 0,1 % de Tween 20, dos veces con 1× de tampón de unión y lavado y una vez con agua. Las perlas se volvieron a suspender en 20 µl de agua y la diana de ADNmc se liberó mediante desnaturalización a 95 °C durante 5 min y posterior colocación inmediata en tubos sobre los imanes DynaMag (Invitrogen). La suspensión se recuperó para análisis adicional.
- 20
- 25
- 30

#### Cuantificación de la diana de *TP53* aislada

- El enriquecimiento de la captura de la diana se estimó al medir la abundancia relativa del exón 8 de *TP53* en el gen *GAPDH* antes y después de la recogida en las perlas utilizando PCR en tiempo real, que es de al menos 1000 veces. La cuantificación de la diana de *TP53* aislada se logró mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando una curva estándar generada con ADN genómico digerido por EcoO109I, purificado en columna. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en 1× de tampón de fidelidad elevada (HF) Phusion™ (Finnzymes), 0,2 mM de dNTP (cada uno), 0,2 µM de cebador directo e inverso (cada uno), 1X de LCGreen plus+ (Idaho Technology) y 0,5 U de polimerasa de ADN Phusion (Finnzymes) en un volumen de 25 µl. Los cebadores utilizados fueron: 5'-CCTGACCTGCCGTCTAGAAAA-3' (núm. de ident. de sec.: 2; *GAPDH*-directo); 5'-CTCCGACGCCTGCTTCAC-3' (núm. de ident. de sec.: 3; *GAPDH*-inverso); 5'-TGCCTCTTGCTTCTCTTTTC-3' (núm. de ident. de sec.: 4; *TP53*-exón 8-directo); y 5'-CTTTCTTGCGGAGATTCTCTTC-3' (núm. de ident. de sec.: 5; *TP53*-exón 8-inverso). Los programas de ciclado de PCR fueron 98 °C durante 30 segundos; 50 ciclos de 98 °C 10 segundos,  $T_a$  20 segundos (lectura de fluorescencia), 72 °C 10 segundos; retención a 72 °C durante 600 segundos; fusión de ADN de 60 °C a 95 °C a 0,2 °C/segundo con lectura de fluorescencia. La temperatura de apareamiento ( $T_a$ ) para *GAPDH* y exón 8 de *TP53* fue de 68 °C y 65 °C, respectivamente.
- 35
- 40
- 45

#### COLD-PCR convencional y rápida utilizando ADNmc aislado en perlas

- Las reacciones de COLD-PCR convencionales o rápidas para el exón 8 de *TP53* se llevaron a cabo utilizando 7 ng de ADN genómico o 2100 copias de ADNmc purificado en un volumen de reacción de 25 µl en una máquina Cepheid SmartCycler™. Las concentraciones finales de otros reactivos y el ciclado de la PCR convencional fueron los descritos en la sección 5.3. Las condiciones de termociclado de la COLD-PCR rápida para el ADN genómico y el ADNmc aislado en perlas se definen en la Tabla 1. La diferencia entre las dos estrategias se refleja en la cantidad de ciclos de la PCR convencional llevados a cabo antes de pasar a la COLD-PCR, es decir, 26 ciclos utilizando ADN genómico con respecto a 18 ciclos utilizando ADNmc aislado en perlas. La temperatura crítica de desnaturalización ( $T_c$ ) se definió como  $T_m-1$ ; la  $T_c$  fue de 88,7 °C para este estudio. Los productos de PCR se digirieron utilizando Exonucleasa I (New England Biolabs) y fosfatasa alcalina de camarón (USB) [15], y se secuenciaron con cebador
- 50
- 55

## ES 2 656 557 T3

directo anidado (5'-TTGCTTCTCTTTTCCTAT-3'; núm. de ident. de sec.: 6) en el Molecular Biology Core Facility (Dana Farber Cancer Institute).

Tabla 1. Condiciones de termociclado de COLD-PCR para el ADN genómico y el ADNmc aislado en perlas.

Plantilla	Etapas	Condiciones
ADN genómico	Desnaturalización inicial	98 °C durante 30 segundos
	Ciclado de etapa 1: 35 ciclos*	98 °C durante 10 segundos
		65 °C durante 20 segundos, lectura de fluorescencia
		72 °C durante 10 segundos
	Ciclado de etapa 2: 25 ciclos	87,7 °C durante 10 segundos
		65 °C durante 20 segundos, lectura de fluorescencia
		72 °C durante 10 segundos
	Extensión	72 °C durante 600 segundos
	Curva de fusión	Progresiva 0,2 °C/segundo, 60 °C a 90 °C
	ADNmc aislado en perla	Desnaturalización inicial
Ciclado de etapa 1: 18 ciclos		98 °C durante 10 segundos
		65 °C durante 20 segundos, lectura de fluorescencia
		72 °C durante 10 segundos
Ciclado de etapa 2: 52 ciclos*		87,7 °C durante 10 segundos
		65 °C durante 20 segundos, lectura de fluorescencia
		72 °C durante 10 segundos
ADNmc aislado en perla	Ciclado de etapa 3: 25 ciclos	87,7 °C durante 10 segundos
		65 °C durante 20 segundos, lectura de fluorescencia
		72 °C durante 10 segundos
	Extensión	72 °C durante 600 segundos
	Curva de fusión	Progresiva 0,2 °C/segundo, 60 °C a 90 °C
<p>* Para esta etapa, 35 y 52 ciclos son la cantidad máxima de ciclos que se pueden completar antes de avanzar a la siguiente etapa; sin embargo, este programa está diseñado para proceder automáticamente a la siguiente etapa de termociclado cuando la fluorescencia alcanza el umbral de PCR (<math>C_t</math> fijada a 30 unidades de fluorescencia).</p>		

PCR de larga distancia para amplificar el exón 5-9 de TP53

Para amplificar los exones 5 a 9 de *TP53*, se llevó a cabo una reacción de PCR de larga distancia convencional directamente con 20 ng de ADN genómico de las líneas celulares diluidas en ADN genómico de humano masculino en un volumen de 20 µl. Las concentraciones finales de otros reactivos fueron las de la sección con el siguiente cebador directo (5'- ACTTCAATGCCTGGCCGAT-3' núm. de ident. de sec.: 7) y el cebador inverso (5'- Biotin-GCCCAATTGCAGGATAAAC -3' núm. de ident. de sec.: 8). El tamaño del amplicón de PCR es 2522 bp de longitud. El ciclado de PCR se llevó a cabo en una máquina Eppendorf™ de la siguiente manera: 98 °C durante 30 segundos y 30 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 65 °C durante 20 segundos, 72 °C durante 1 minuto, posteriormente 72 °C durante 5 minutos. Los productos de PCR se purificaron con el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen Inc.) para retirar los cebadores biotinilados libres y se procedió posteriormente al aislamiento de las perlas magnéticas, según se describió en la presente memoria.

Apareamiento por anclaje y llenado de huecos

Las perlas enlazadas con el ADNmc se volvieron a suspender en 1× de tampón de reacción Ampligase (Epicentre Inc.) y posteriormente se agregaron 0,16 pmol de cebadores de anclaje para cada región diana (Tabla 2). La mezcla se desnaturalizó a 100 °C durante 1 minuto y se enfrió inmediatamente sobre hielo durante 5 minutos, posteriormente se procedió a la incubación a 60 °C durante 15 minutos en un horno de hibridación. Se agregó una mezcla de 2 µl que contenía 1× de tampón de reacción Ampligase, 0,2 mmol/L de cada desoxinucleótido trifosfato, 2 unidades de polimerasa de ADN AmpliTaq, Stoffel Fragment (Applied Biosystems), 2,5 unidades de Ampligase (Epicentre) y la reacción se incubó a 60 °C durante 1 hora en un horno de hibridación. A continuación, las perlas se lavaron 2 veces de 1× tampón de unión y lavado y 3 veces con agua, posteriormente se volvieron a suspender en 15 µl de agua. Las perlas se desnaturalizaron a 95 °C durante 2 minutos y posteriormente se colocaron de inmediato sobre los imanes DynaMag. Se recogió un sobrenadante de 12 µl y se almacenó a 4 °C.

Tabla 2. Secuencia de cebadores de anclaje

	Anclajes *	Tamaño de PCR	T <sub>c</sub>
exón 6 de <i>TP53</i>	Izquierda: <u>GCCTCCCTCGCGCCATCAGAGGG</u> TCCCCAGGCCTCTGA (núm. de ident. de sec.: 9)	157 bp	85 °C
	Derecha: Fosfato-TTGGATGACAGAAACA CTTTTCGCTGAGCGGGCTGGCAAGGC (núm. de ident. de sec.: 10)		
exón 8 de <i>TP53</i>	Izquierda: <u>GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCC</u> TCTTGCTTCTTTTCCT (núm. de ident. de sec.: 11)	174 bp	86 °C
	Derecha: Fosfato-CCGCAAGAAAGGGGA GCCTCTGAGCGGGCTGGCAAGGC (núm. de ident. de sec.: 12)		
exón 9 de <i>TP53</i>	Izquierda: <u>GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCACC</u> TTTCCTTGCCTCTTTCC (núm. de ident. de sec.: 13)	134 bp	84,5 °C
	Derecha: Fosfato-TGGATGGAGAATATTT CACCCTTCTGAGCGGGCTGGCAAGGC (núm. de ident. de sec.: 14)		
*454 los cebadores A y B se subrayan. Cabe señalar que las secuencias de los anclajes derechos son complementarias al cebador B, mientras que las de los anclajes izquierdos son idénticas al cebador A.			

COLD-PCR y convencional con cebadores genéricos

Se llevaron a cabo reacciones COLD-PCR o convencionales directamente con 2 µl de ADNmc purificado en un volumen de 25 µl. La concentración final de otros reactivos fue la siguiente: 1× tampón GoTaq Flexi (Promega), 0,63 U de polimerasa de ADN GoTaq Flexi (Promega), 0,2 mmol/L de cada desoxinucleótido trifosfato, 0,2 µmol/L (cada uno de) cebador 454-A y B, 2,5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub> y 0,1× LCGreen<sup>plus+</sup>. El ciclado de la PCR convencional fue el siguiente: 95 °C durante 120 segundos y 35 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 53 °C durante (lectura de fluorescencia) 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Las condiciones de ciclado de PCR para la COLD PCR simple y doble se resumen en la Tabla 3. La PCR simple se secuenció con el cebador 454-A y el cebador 454-B y la PCR doble se secuenció después de una PCR convencional anidada (Tabla 4).

Tabla 3. Condiciones de termociclado para la COLD-PCR simple y doble

Formato de PCR	Etapa	Condiciones	
Simple-COLD * Doble-COLD (1 $T_c$ )	Desnaturalización inicial	95 °C durante 120 segundos	
	Ciclado de etapa 1: 5 ciclos	95 °C durante 15 segundos	
		53 °C durante 30 segundos, lectura de fluorescencia	
		72 °C durante 30 segundos	
	Ciclado de etapa 2: 25 ciclos	$T_c$ durante 15 segundos	
		53 °C durante 30 segundos, lectura de fluorescencia	
		72 °C durante 30 segundos	
	Curva de fusión	Progresiva 0,2 °C/segundo, 60 °C a 90 °C	
	Doble-COLD (2 $T_c$ s)	Desnaturalización inicial	95 °C durante 120 segundos
		Ciclado de etapa 1: 5 ciclos	95 °C durante 15 segundos
53 °C durante 30 segundos, lectura de fluorescencia			
72 °C durante 30 segundos			
Ciclado de etapa 2: 12 ciclos		84,5 °C durante 15 segundos	
		53 °C durante 30 segundos, lectura de fluorescencia	
		72 °C durante 30 segundos	
Ciclado de etapa 3: 12 ciclos		85 °C durante 15 segundos	
		53 °C durante 30 segundos, lectura de fluorescencia	
		72 °C durante 30 segundos	
Curva de fusión		Progresiva 0,2 °C/segundo, 60 °C a 90 °C	
* La $T_c$ para la simple y doble-cold (1 $T_c$ ) es 86 y 84,7 °C, respectivamente.			



Tabla 4. Secuencia de cebadores de PCR anidados

	Cebadores anidados
exón 6 de TP53	directo:
	<u>gtaaaacgacgcccagt</u> AGGGTCCCCAGGCCTCTGA (núm. de ident. de sec.: 15)
	inverso: <u>tcccgcgaattaatacgcac</u> CGAAAAGTGTTTCTGTCATCCAA (núm. de ident. de sec.: 16)
exón 9 de TP53	directo:
	<u>gtaaaacgacgcccagt</u> TCACCTTTCCTTGCTCTTTCC (núm. de ident. de sec.: 17)
	inverso: <u>tcccgcgaattaatacgcac</u> AAGGGTGAAATATTCTCCATCCA (núm. de ident. de sec.: 18)
Etiquetas (subrayadas), es decir, la secuencia M13 y etiqueta1 se agregaron al extremo 5' de los cebadores anidados específicos para gen a efectos de mejorar la secuenciación de los amplicones cortos.	

Resultados y discusión

COLD-PCR rápida utilizando plantilla de ADNmc aislado utilizando perlas magnéticas

Se ha demostrado previamente que la sensibilidad de la detección de la mutación se mejora significativamente al llevar a cabo dos pasadas consecutivas de COLD-PCR, en oposición a una COLD-PCR simple (Li J, Milbury CA, Li C, Makrigiorgos GM. La secuenciación Sanger basada en la coamplificación de dos pasadas con PCR a temperatura de desnaturalización más baja (COLD-PCR) identifica un nuevo espectro de mutaciones de nivel bajo en el adenocarcinoma pulmonar. Hum Mutat 2009;30:1583-90). Sin embargo, llevar a cabo múltiples pasadas de COLD-PCR aumenta las posibilidades de errores de PCR introducidos por polimerasa de ADN que posteriormente se enriquecerán junto con las verdaderas mutaciones durante la COLD-PCR.

En la presente memoria se describe una estrategia para mejorar el enriquecimiento de la mutación posibilitado por COLD-PCR, mientras también se limita la cantidad de ciclos de PCR necesarios. Para evaluar este concepto, aislamos fragmentos de ADN diana de ADN genómico utilizando una sonda biotinilada que se hibridó con el ADN diana y posteriormente se procedió al aislamiento mediante perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Esta etapa proporciona un enriquecimiento preliminar de las secuencias diana y elimina la necesidad de llevar a cabo la PCR. Al llevar a cabo una PCR en tiempo real sobre una región diana (gen *GAPDH*) que no ha sido capturada en perlas, con respecto a llevar a cabo una PCR en tiempo real sobre una región diana capturada (exones 8-9 de *TP53*), se demostró que el enriquecimiento de las regiones diana con respecto a las no diana a través del aislamiento en perlas magnéticas es de al menos 1000 veces. La cantidad de copias de diana de *TP53* aislada en perlas se midió utilizando PCR en tiempo real cuantitativa, y luego se utilizaron aproximadamente 2100 copias de diana aislada en reacciones de COLD-PCR-rápida. También se examinó ADN genómico que contenía la cantidad de copias de *TP53* equivalente como material de partida para comparar el rendimiento de la COLD-PCR cuando se aplica utilizando la diana enriquecida por perla con respecto al ADN genómico (no enriquecido).

Los datos indican que el alelo mutante se amplificó preferencialmente cuando se llevó a cabo la COLD-PCR directamente a partir del ADN genómico o utilizando el ADN aislado en perlas, aunque en una medida diferente (Figura 5). Con el uso de ADN genómico como plantilla, se enriqueció la mutación G>A c.818 en el exón 8 de *TP53* al 1 % hasta ~17%, correspondiente a un enriquecimiento de ~17 veces del mutante. Sin embargo, cuando se utilizó el ADNmc aislado en sonda como plantilla, se enriqueció la mutación G>A c.818 al 1 % hasta un 40 %: es decir el enriquecimiento mediante COLD-PCR fue mayor que el doble. Además, la abundancia de mutación más baja detectable fue un ~0,3 % de abundancia utilizando ADN aislado por perla, mientras que el límite de detección para reacciones utilizando ADN genómico fue de 1 % de abundancia de mutante (Figura 6).

Principio de COLD-PCR-rápida múltiple utilizando ADN aislado en perlas

Un modo alternativo para aplicar la COLD-PCR implica la COLD-PCR-rápida en donde los amplicones resultantes de las mutaciones G:C>A:T o G:C>T:A tienden a tener una temperatura de fusión más baja. Por lo tanto, estos amplicones se pueden desnaturar preferencialmente con respecto a los amplicones naturales a la  $T_c$ , sin necesidad de la formación de heterodúplexes durante el ciclado de PCR.

A la fecha, la COLD-PCR ha mejorado la sensibilidad de la detección de la mutación de muchas técnicas, incluida la secuenciación Sanger, pirosecuenciación, la PCR en tiempo real TaqMan, RFLP, dHPLC y fusión de alta resolución. Sin embargo, cada reacción de COLD-PCR se lleva a cabo de forma simple y la COLD-PCR múltiple

está limitada debido a que cada amplicón individual requiere una  $T_c$  diferente. Para demostrar la viabilidad de la COLD-PCR múltiple, y debido a que la captura en perlas mejora el rendimiento de la COLD-PCR, se diseñó una estrategia de COLD-PCR-*rápida* múltiple tras el aislamiento de la diana de ADN en perlas magnéticas, que permite la identificación de la mutación mediante secuenciación Sanger posterior o, posiblemente, secuenciación de última generación (Figura 7). La PCR de larga distancia con cebadores biotinilados en 5' se llevó a cabo utilizando una polimerasa de ADN de alta fidelidad del ADN genómico para amplificar de forma selectiva las secuencias diana. El objetivo de llevar a cabo la PCR de larga distancia fue simplificar el genoma y abarcar múltiples exones en un amplicón (p. ej., los exones 5-9 de *TP53* con un único amplicón de 2,5 kb en este estudio). Sin embargo, posiblemente, también se pueda ajustar el mismo protocolo para que inicie directamente a partir del ADN genómico en futuras aplicaciones.

Como se muestra en la Figura 7, los productos amplificados se mezclan y posteriormente se procede al aislamiento del ADNmc biotinilado en 5' utilizando perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Se diseñó un par de cebadores de anclaje complementarios a la misma cadena para incluir hasta 100 bp de la región génica de interés. Ambos cebadores de anclaje consisten en una región génica específica con una cola de secuencia universal, que pueden ser cebadores genéricos utilizados en la secuenciación de última generación. En este estudio, se emplearon los cebadores A y B utilizados por el sistema de secuenciación 454 (Roche Inc.). El cebador de anclaje izquierdo incluye la secuencia de cebador A de 454 en el extremo 5' y el cebador de anclaje derecho está fosforilado en 5' e incluye la secuencia complementaria a la secuencia del cebador B de 454 en el extremo 3'. Después del apareamiento con el ADNmc aislado que ha sido inmovilizado en perlas, el anclaje izquierdo se extendió mediante polimerasa de ADN AmpliTaq, Stoffel Fragment y dNTP, posteriormente se procedió a la ligación con el anclaje derecho mediante una ligasa de ADN termoestable, ligasa de ADN Ampli. Es importante utilizar una polimerasa de ADN sin la actividad de exonucleasa 5'→3' como AmpliTaq para este ensayo, dado que la actividad de exonucleasa 5'→3' digerirá el anclaje posteriormente. Se pueden rellenar los huecos y ligar múltiples regiones diana utilizando esta estrategia. El ADNmc ligado, que contiene un anclaje izquierdo en el extremo 5', un anclaje derecho en el extremo 3' y una región diana en el medio, luego se liberó de las perlas magnéticas mediante breves desnaturalización térmica. A continuación, se aplicó la COLD-PCR-*rápida* sobre el ADN purificado con los cebadores genéricos A y B. Posteriormente, se llevó a cabo la PCR convencional anidada para amplificar cada región diana de forma individual, y después secuenciación Sanger. De manera alternativa, si se lleva a cabo una reacción con elevada multiplexación, se puede utilizar la secuenciación de próxima generación para barrer las mutaciones de modo paralelo muy elevado.

#### COLD-PCR simple y doble de ADNmc ligado

Como prueba del principio, se siguió primero el esquema de la Figura 7 para llevar a cabo una COLD-PCR simple a partir de una única región diana, el exón 8 de *TP53* que contiene la mutación G>A c.818 diluida en el ADN natural a una relación entre mutante y natural de 5 %. El ADNmc compuesto por anclajes y el exón 8 de *TP53* se aisló y procesó mediante PCR convencional o COLD-PCR a una  $T_c$  de 86 °C utilizando cebadores genéricos, según se describió anteriormente. La secuenciación Sanger (Figura 8) mostró que la abundancia de 5 % de la mutación no fue visible tras la PCR convencional, pero podía detectarse claramente como una abundancia de 70 % de mutación tras el enriquecimiento con COLD-PCR. La secuenciación de ADN natural tratado de forma similar después de COLD-PCR no exhibió ningún indicio de enriquecimiento de errores de PCR en comparación con la PCR convencional.

A continuación, se siguió el esquema de la Figura 7 para diseñar una COLD-PCR doble para enriquecer mutaciones del exón 6 y el exón 9 de *TP53* de forma simultánea. De manera ideal, todos los amplicones en una COLD-PCR múltiple deberían tener una  $T_c$  similar para que el enriquecimiento se produjera en todas las dianas de forma simultánea. Por lo tanto, las regiones diana dentro de los exones 6 y 9 se diseñaron para tener una  $T_c$  muy similar, 85 °C y 84,5 °C, respectivamente. La COLD-PCR se llevó a cabo utilizando dos estrategias diferentes, es decir, utilizando una única  $T_c$  de 84,7°C (promedio de 84,5 °C y 85 °C), o utilizando un formato de dos temperaturas que incluía 12 ciclos de COLD-PCR a  $T_c$  de 84,5 °C y posteriormente 12 ciclos de COLD-PCR a  $T_c$  de 85 °C. Se ha demostrado previamente que este aumento gradual de la  $T_c$  durante la COLD-PCR-*rápida* es tolerante a diferencias de temperatura pequeñas entre reacciones que son provocadas por la variación de pocillo a pocillo inherente de los termocicladores. Esta estrategia se adaptó aquí para amplificar dos amplicones que tienen una  $T_c$  algo diferente.

El 10 % de mutación C>T c.580 en el exón 6 de *TP53* no fue detectable mediante la secuenciación por PCR convencional, pero se enriqueció y se volvió claramente visible tras la COLD-PCR con una  $T_c$  y dos  $T_c$  como una mutación al 30-40 % (Figura 9). De manera similar, el 10 % de mutación C>T c.925 en el exón 9 de *TP53* no fue detectable después de la PCR convencional, pero se detectó claramente tras la COLD-PCR con una  $T_c$  y dos  $T_c$  como una mutación al 50 y 80 %, respectivamente (Figura 9).

#### TI-COLD-PCR independiente de la temperatura

Se obtuvo evidencia del principio de la TI-COLD-PCR independiente de la temperatura en disolución, cuando se ejecuta en modo de COLD-PCR-*rápida* (es decir, sin la etapa de heterodúplex intermediario), para una secuencia diana simple. El termociclador se programó como se describe en la Figura 10, para una secuencia Kras natural o, alternativamente, para una mezcla al 10% de secuencia mutante con natural. Los cromatogramas resultantes en la Figura 10 demuestran que, al aumentar la temperatura de desnaturalización progresivamente desde valores más

bajos hasta más altos y sin conocer la temperatura crítica de desnaturalización exacta ( $T_c$ ) de esta secuencia Kras, todavía será posible llevar a cabo un enriquecimiento de mutación de forma satisfactoria. El cromatograma demuestra que la mutación G>A al 10 % se volvió una mutación al 100 % tras la TI-COLD-PCR (modo rápido). Cabe señalar que el programa de COLD-PCR-rápida de la Figura 16 solo enriquecerá mutaciones de reducción de temperatura (G:C>A:T, o G:C>T:A), que comprenden alrededor del 70 % de las mutaciones encontradas en las muestras clínicas.

El aislamiento de la diana es esencial para la investigación básica y translacional, así como en el diagnóstico molecular de enfermedades humanas. Permite la caracterización del tipo celular, proteína, ácido nucleico específico y la investigación de sus funciones; en la clínica, el aislamiento de la diana proporciona una evidencia directa para el diagnóstico de una enfermedad. Entre todas las técnicas de separación utilizadas actualmente, las perlas magnéticas recubiertas con diferentes biomoléculas han recibido mucha atención debido a su diversidad, elevado rendimiento, bajo costo y facilidad de uso. Se han utilizado de forma satisfactoria en muchas aplicaciones preclínicas y clínicas, incluido el aislamiento de células tumorales en circulación raras, detección de patógenos y activación/expansión de linfocitos T para tratar la infección por VIH y otras enfermedades humanas. Además, las perlas magnéticas a menudo se integran en una amplia gama de herramientas de diagnóstico in vitro, tales como la captura de exoma humano para la secuenciación de última generación y el ensayo de genotipificación Illumina GoldenGate™. En este estudio, se integraron las perlas magnéticas a aplicaciones de COLD-PCR y se demostró que tras el aislamiento de la diana utilizando perlas, la sensibilidad de la detección de la mutación mediante COLD-PCR se mejora significativamente y la COLD-PCR múltiple es viable.

Estudios anteriores han demostrado que la sensibilidad de la detección de la mutación se mejora significativamente al llevar a cabo dos pasadas de COLD-PCR, que permiten el enriquecimiento y la secuenciación de mutaciones de bajo nivel en muestras de adenocarcinoma pulmonar que de otra manera se habrían perdido mediante las metodologías convencionales (Li J, Milbury CA, Li C, Makrigiorgos GM. La secuenciación Sanger basada en la coamplificación de dos pasadas con PCR a temperatura de desnaturalización más baja (COLD-PCR) identifica un nuevo espectro de mutaciones de nivel bajo en el adenocarcinoma pulmonar. Hum Mutat 2009;30:1583-90). Aunque los errores introducidos por la polimerasa no fueron evidentes después de dos pasadas de COLD-PCR con el empleo de una polimerasa de fidelidad elevada (Phusion), permanece la posible preocupación debido a la cantidad de ciclos de PCR llevados a cabo. Se ha demostrado que el aislamiento de la diana utilizando perlas magnéticas mejora significativamente la detección de la mutación. De hecho, la presente combinación de aislamiento basado en perlas magnéticas con la COLD-PCR-rápida exhibió que la sensibilidad de la detección de la mutación mediante COLD-PCR se aumentó en gran medida, permitiendo la detección de mutantes con una abundancia tan baja como de 0,3 % con una única reacción de COLD-PCR. Este nivel de sensibilidad es similar al obtenido con dos pasadas de COLD-PCR-rápida.

La mejora en el enriquecimiento de la mutación obtenida mediante COLD-PCR probablemente se debe a la cantidad de ciclos de COLD-PCR llevados a cabo antes de que la reacción de amplificación alcance la saturación. Todas las reacciones de COLD-PCR incluyen una cantidad inicial de ciclos de la PCR convencional para una acumulación inicial del producto de PCR y posteriormente se cambia directamente de inmediato al ciclado de COLD-PCR para amplificar de forma selectiva los amplicones que contienen mutación. Si se omite el ciclado de PCR convencional, o si el ciclado de COLD-PCR se produce muy temprano, se puede producir una formación excesiva de dímeros de cebador debido a que la  $T_m$  es más baja para estas moléculas que para los amplicones diana previstos. Por otro lado, llevar a cabo demasiados ciclos en el modo de PCR convencional, antes de cambiar a la COLD-PCR, puede reducir el enriquecimiento general de los amplicones que contienen mutación. Los presentes datos indican que, en comparación con las reacciones que se llevan a cabo con el ADN genómico, la COLD-PCR utilizando ADN aislado en perlas podría iniciarse ~8 ciclos antes sin la introducción de problemas significativos por dímeros de cebador y permitir, por lo tanto, más ciclos de COLD-PCR que enriquecen los amplicones con mutaciones.

En relación con la COLD-PCR múltiple, en principio podría haber sido posible adaptar la PCR múltiple convencional a la COLD-PCR al diseñar amplicones que se procesaran a la misma  $T_c$ . Sin embargo, esta estrategia padecería la formación de dímeros de cebador y malcebado. El ensayo de COLD-PCR múltiple diseñado en este trabajo (Figura 7) emplea cebadores genéricos para todos los amplicones para eliminar el problema de los dímeros de cebador, mientras todavía conserva una  $T_c$  similar para los amplicones. Esta estrategia se ha utilizado anteriormente para la creación de perfiles de expresión de alto rendimiento y detección de metilación, utilizando sondas de candado o pares de oligonucleótidos separados. El protocolo adoptado incluye una etapa de ligación para generar sondas amplificables. Aunque la etapa de ligación no es absolutamente necesaria en el presente protocolo, proporciona especificidad y flexibilidad agregadas para seleccionar los amplicones que contienen los polimorfismos de nucleótido simple deseados, según se demuestra para el ensayo de genotipificación Illumina GoldenGate™ (Fan JB, Chee MS, Gunderson KL. Highly parallel genomic assays. Nat Rev Genet 2006;7:632-44). De este modo, se puede llevar a cabo una COLD-PCR potencialmente sobre un alelo dado siguiendo el protocolo de la Figura 7, al llevar a cabo la ligación específica de SNP. Se contempla que el protocolo actual puede conducir a una amplificación por COLD-PCR de gran escala y un enriquecimiento de mutación dentro de numerosos amplicones iso-  $T_c$  tras la captura del ADN genómico, una estrategia similar a aplicaciones que llevan a cabo la captura del exón y el aislamiento de la diana para la re secuenciación utilizando tecnologías de secuenciación de última generación.

5 Nuestros datos muestran que el enriquecimiento de la mutación a través de COLD-PCR se potencia mediante el aislamiento de la diana utilizando perlas magnéticas. Además, desarrollamos un ensayo de COLD-PCR múltiple utilizando ADN que se aisló e inmovilizó sobre perlas magnéticas. Estas estrategias proporcionan una plataforma que se puede desarrollar adicionalmente para barrer un panel de mutaciones que son esenciales para la toma de decisiones en el tratamiento del cáncer personalizado, sin el riesgo de perderse mutaciones de bajo nivel en las muestras clínicas.

*RE.SE.CT*

10 La validación se ha llevado a cabo para ADN que contiene mutaciones en la secuencia del exón 2 de Kras. La Figura 16 demuestra 3 ciclos del proceso, aplicados a ADN que contenía originalmente 10-13 % de secuencia mutante con respecto a natural para una mutación C>A de Kras. Después de cada ciclo del proceso, la muestra resultante se evaluó a través de secuenciación por PCR. Se puede observar que tras cada ciclo la mutación (picos en el cromatograma que indican A) aumenta con respecto a la natural. Un enriquecimiento progresivo similar de las secuencias mutadas se muestra en la Figura 17 para una mutación de Kras diferente (CC>AA). La Figuras 18-21 demuestran el enriquecimiento obtenido progresivamente mediante ciclos repetidos de RE.SE.CT para varios  
15 ejemplos de mutaciones de Kras. En cada ejemplo, el enriquecimiento se obtuvo al llevar a cabo la secuenciación por PCR después de cada ciclo de RE.SE.CT.

20

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar una secuencia diana mutante monocatenaria a partir de una mezcla de secuencias diana que se sospecha que contienen la secuencia diana mutante y una secuencia diana natural, el método comprende:
- 5 (i) someter las secuencias diana a una temperatura de desnaturalización que es superior a la temperatura de fusión de las secuencias diana, formar de esta manera una mezcla que contiene la secuencia mutante monocatenaria y secuencias naturales monocatenarias, la mezcla se caracteriza por una relación de secuencias mutantes monocatenarias con respecto a secuencias naturales monocatenarias,
- 10 (ii) poner en contacto la mezcla con un exceso de una secuencia de referencia complementaria a la secuencia natural,
- (iii) reducir la temperatura para permitir la formación de dúplexes de cadena diana/cadena de referencia, en donde los dúplexes incluyen dúplexes de cadena mutante/cadena de referencia y dúplexes de cadena natural/cadena de referencia,
- 15 (iv) someter los dúplexes de cadena diana/cadena de referencia a una temperatura crítica de desnaturalización  $T_c$  que es inferior a la temperatura de fusión de los dúplexes de cadena natural/cadena de referencia, para permitir la desnaturalización selectiva de los dúplexes de cadena mutante/cadena de referencia,
- (v) retirar los dúplexes de cadena natural/cadena de referencia,
- con los cual aumenta la relación de secuencias diana mutantes monocatenarias con respecto a las secuencias diana naturales monocatenarias.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, que comprende, además:
- (vi) repetir las etapas (iii) - (v) al menos 1, 2, 3, 5, 10, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 veces para enriquecer adicionalmente las secuencias diana mutantes monocatenarias;
- o (vi) agregar un exceso adicional de secuencia de referencia y (vii) repetir las etapas (iii) - (vi) al menos 1, 2, 3, 5, 10, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 veces para enriquecer adicionalmente las secuencias diana mutantes monocatenarias.
- 25 3. El método de la reivindicación 2, en el que las secuencias de referencia se acoplan a partículas o partículas magnéticas.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que las secuencias diana en la etapa (i) se ponen en contacto con un exceso de al menos dos secuencias de referencia diferentes, cada secuencia de referencia diferente es complementaria a una secuencia diana natural diferente, y los dúplexes formados por las secuencias naturales/secuencias de referencia tienen sustancialmente la misma temperatura crítica de desnaturalización ( $T_c$ ), en el que las secuencias diana en la etapa (i) se ponen en contacto preferiblemente con una exceso de al menos 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500 o 1000 secuencias de referencia diferentes.
- 30 5. El método de la reivindicación 1, que comprende, además:
- (a) detectar las secuencias diana mutantes monocatenarias; o
- (b) aislar las secuencias diana mutantes monocatenarias.
6. El método de la reivindicación 1, que comprende, además, aislar las secuencias diana mutantes monocatenarias, en el que las secuencias de referencia se biotinilan, y los dúplexes formados mediante la secuencia natural/secuencia de referencia biotinilada se retiran mediante captura sobre una superficie sólida recubierta con estreptavidina, de esta manera se deja la población enriquecida de secuencias diana mutantes monocatenarias.
- 40 7. El método de la reivindicación 1, que comprende, además,
- (vi) repetir las etapas (iii) - (v) al menos 1, 2, 3, 5, 10, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 veces para enriquecer adicionalmente las secuencias diana mutantes monocatenarias, en el que las secuencias de referencia se acoplan a perlas magnéticas y los dúplexes de secuencia natural/secuencia de referencia se retiran en la etapa (v) al retirar las perlas magnéticas.
- 45

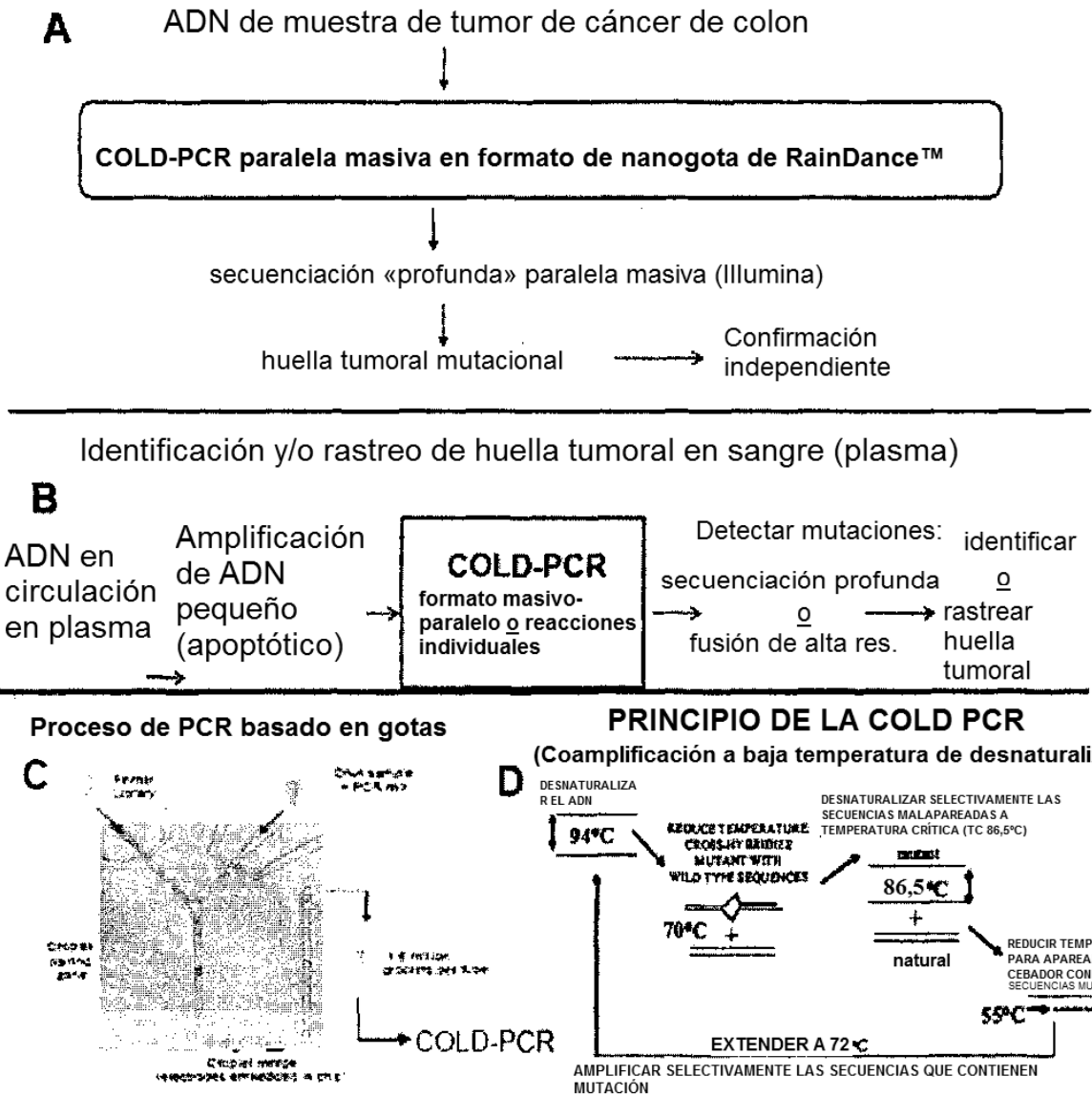


Fig. 1

Diseño de soporte sólido para ice-COLD-PCR (perla)

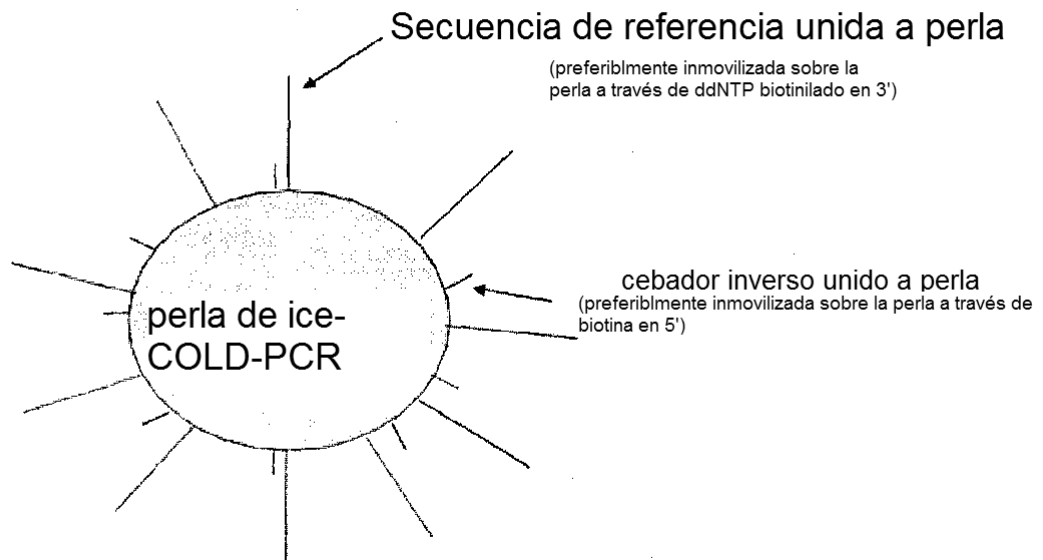


Fig. 2

Emulsión que contiene perla de ice-COLD-PCR, secuencias diana capturadas, cebador directo libre e ingredientes de PCR (polimerasa, dNTP, etc.)

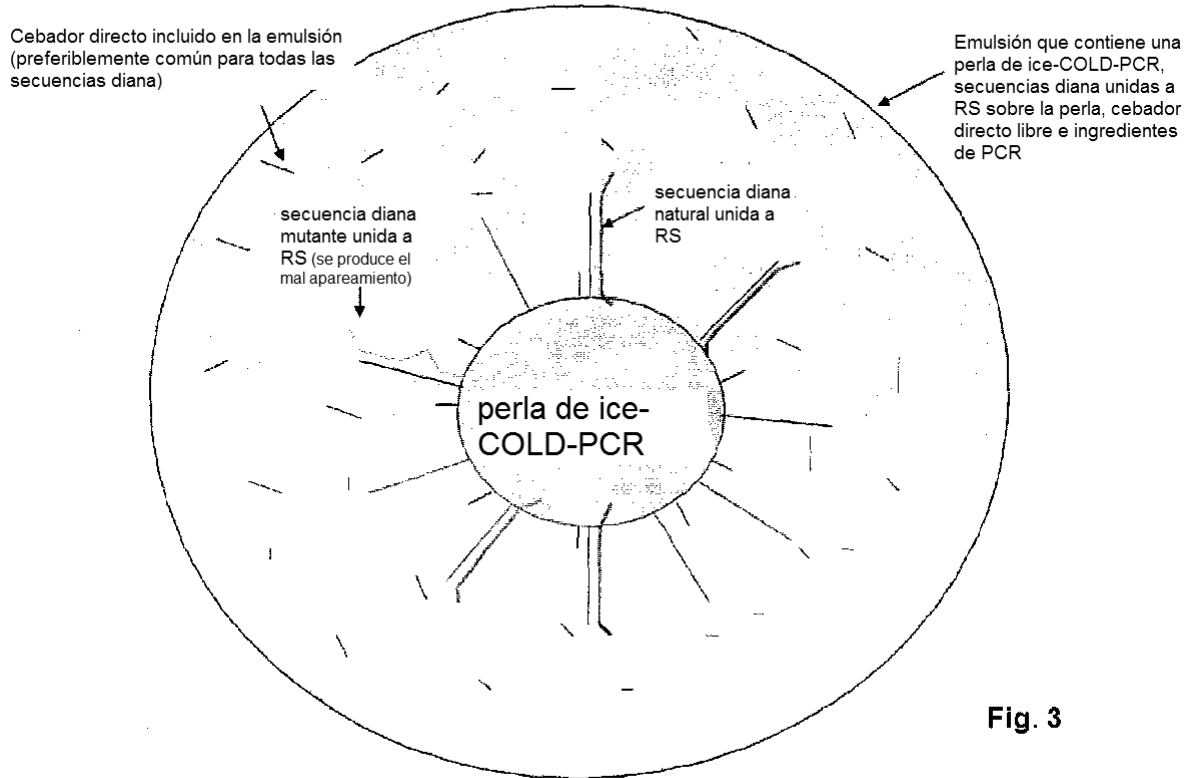


Fig. 3

Antes de la ice-COLD-PCR: la secuencia diana mutante está en minoría con respecto a la secuencia diana natural



Durante la ice-COLD-PCR sobre el soporte sólido (perla) dentro de la emulsión: la proximidad de las secuencias diana con las secuencias naturales facilita la hibridación eficaz y la formación de heterodúplexes

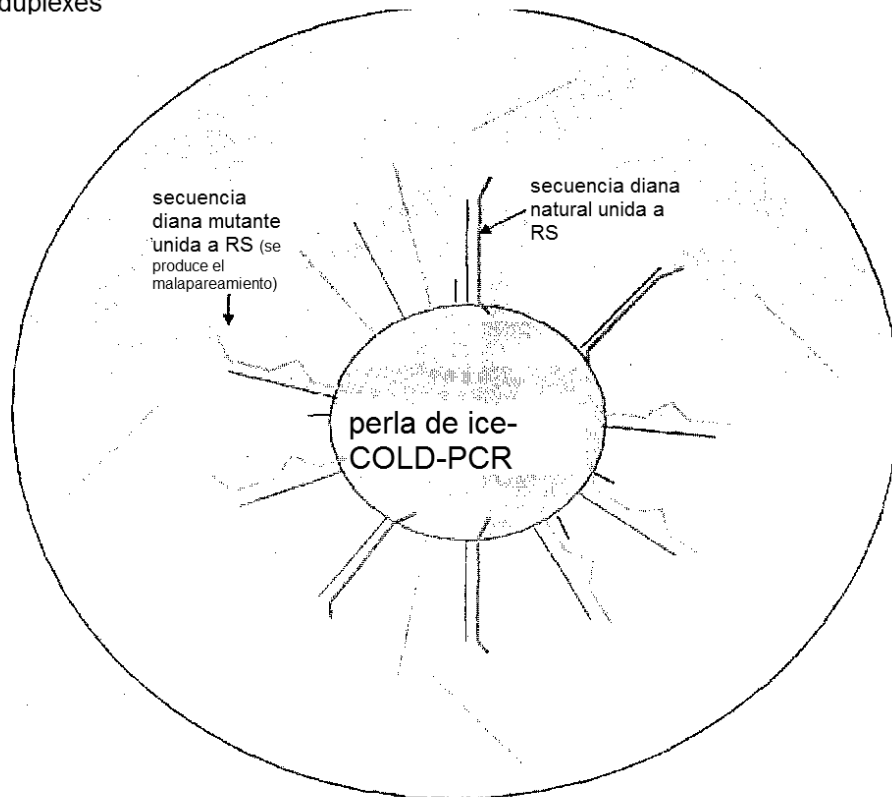


Fig. 4

- Tras la ice-COLD-PCR: las secuencias diana mutantes amplificadas ahora son mayoría con respecto a las secuencias diana naturales
  - Algunas secuencias mutantes están unidas a la perla, mientras que otras flotan libres
  - La mayoría de los cebadores se consume durante la síntesis



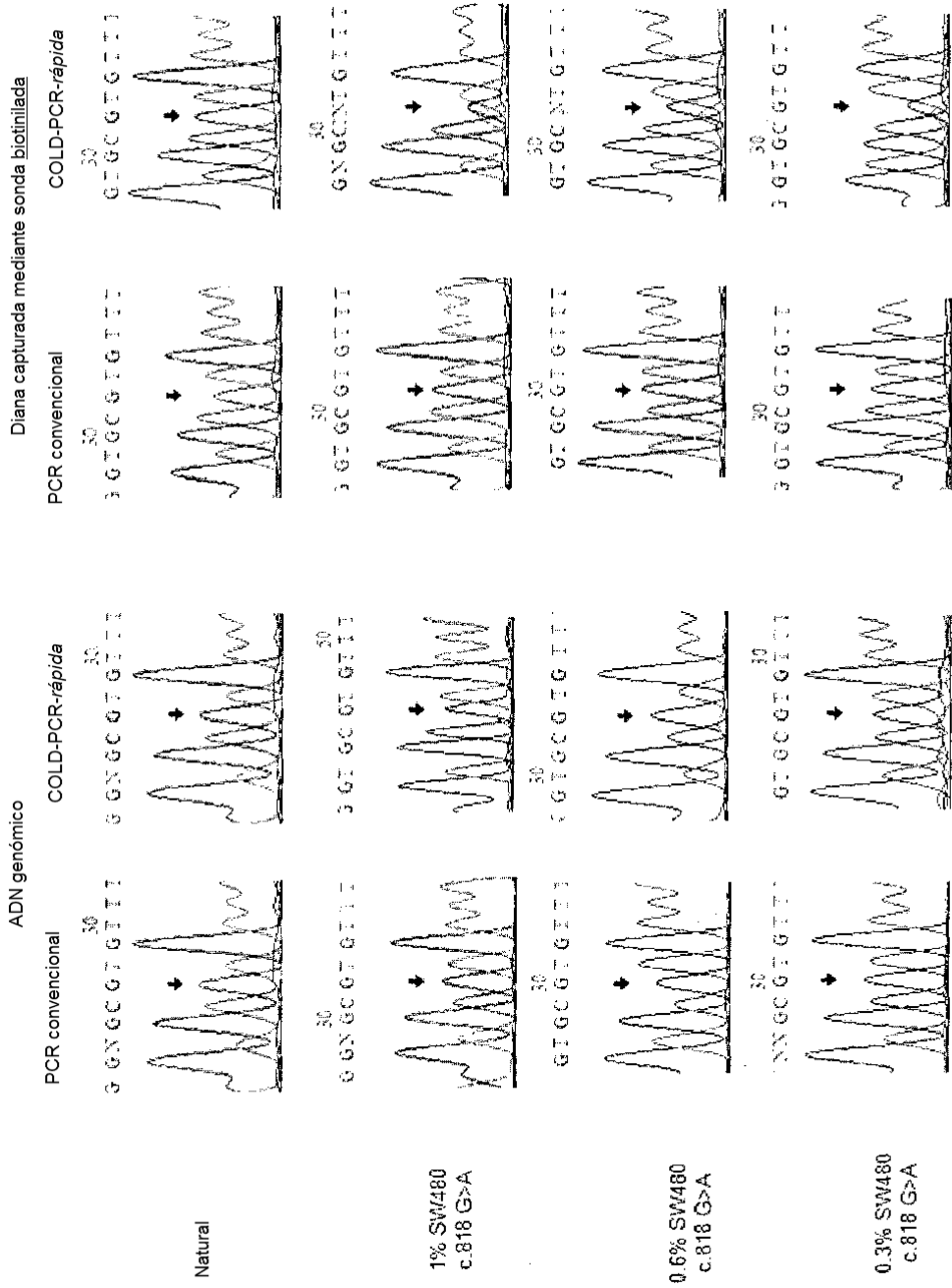


Fig. 6

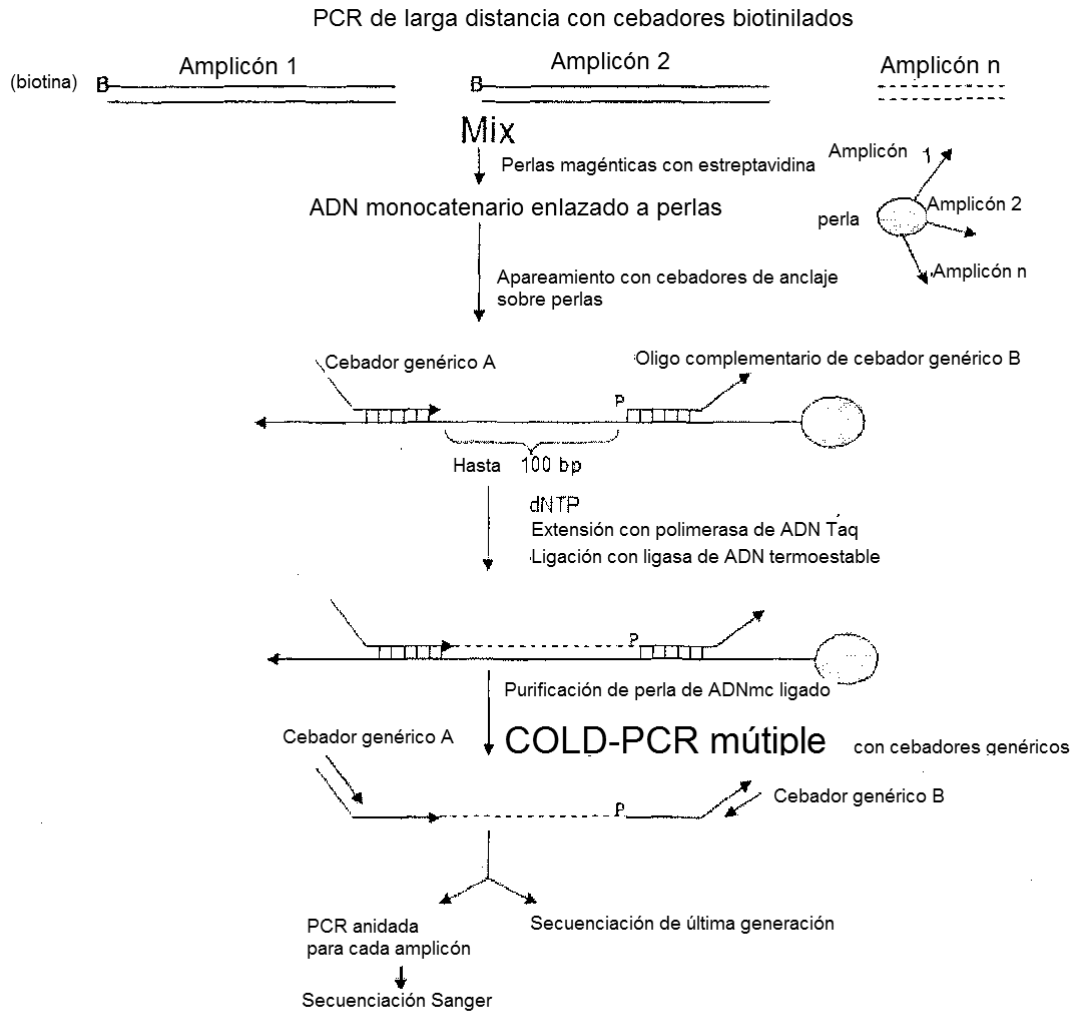


Fig.7

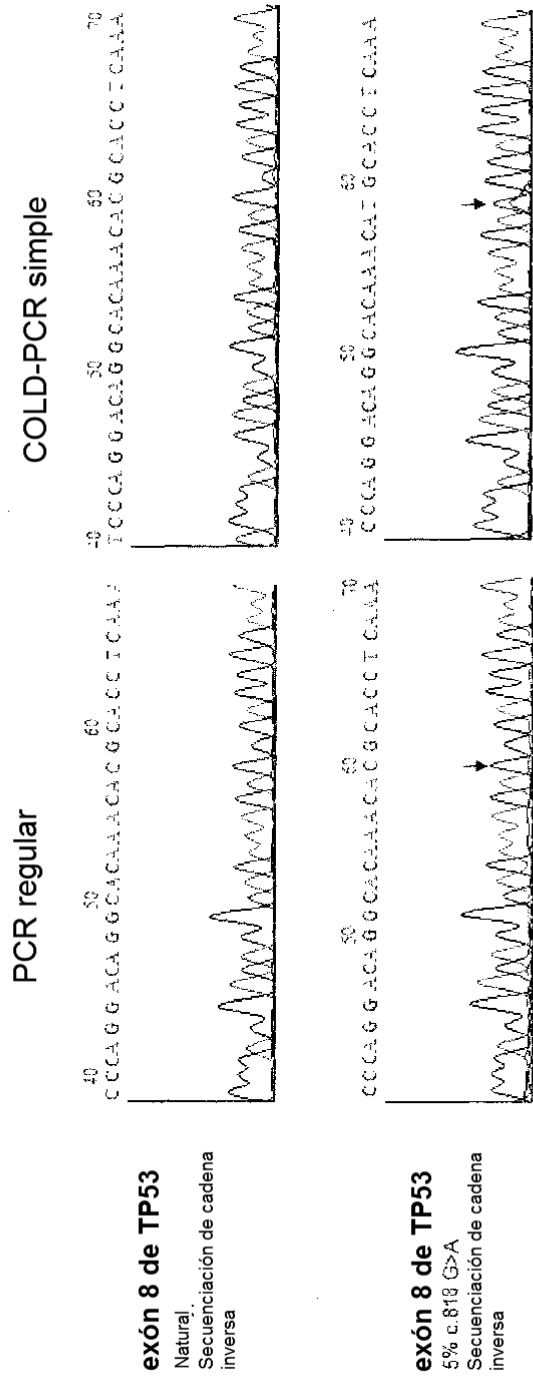
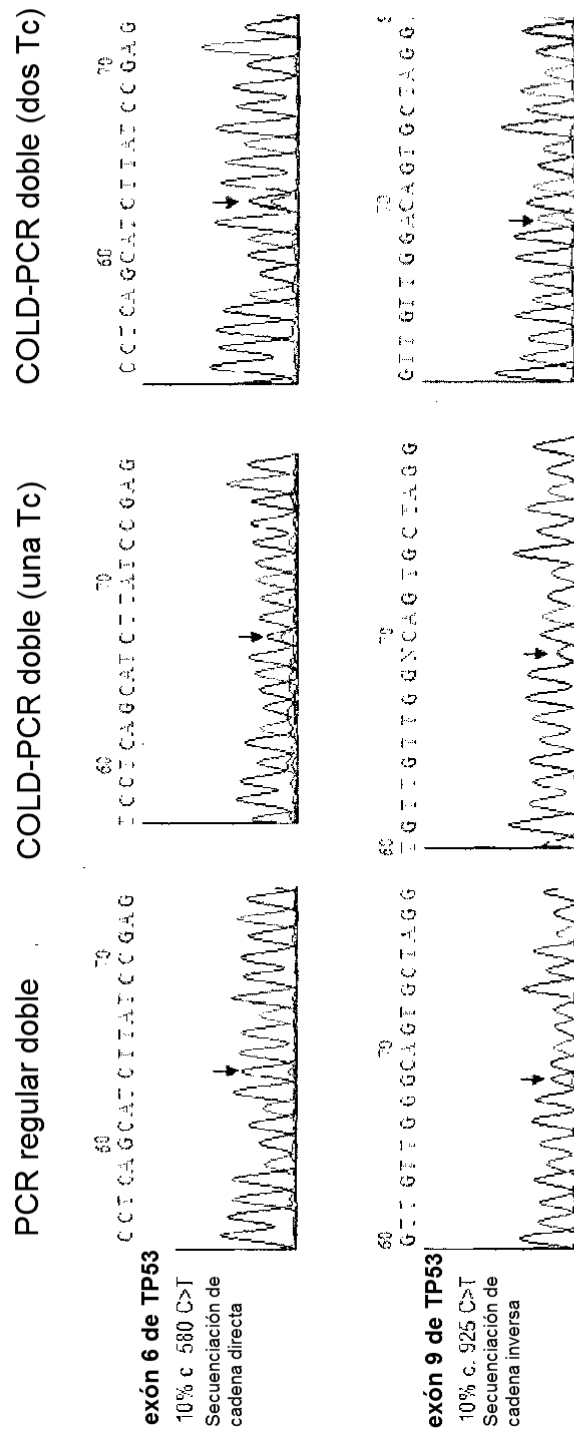


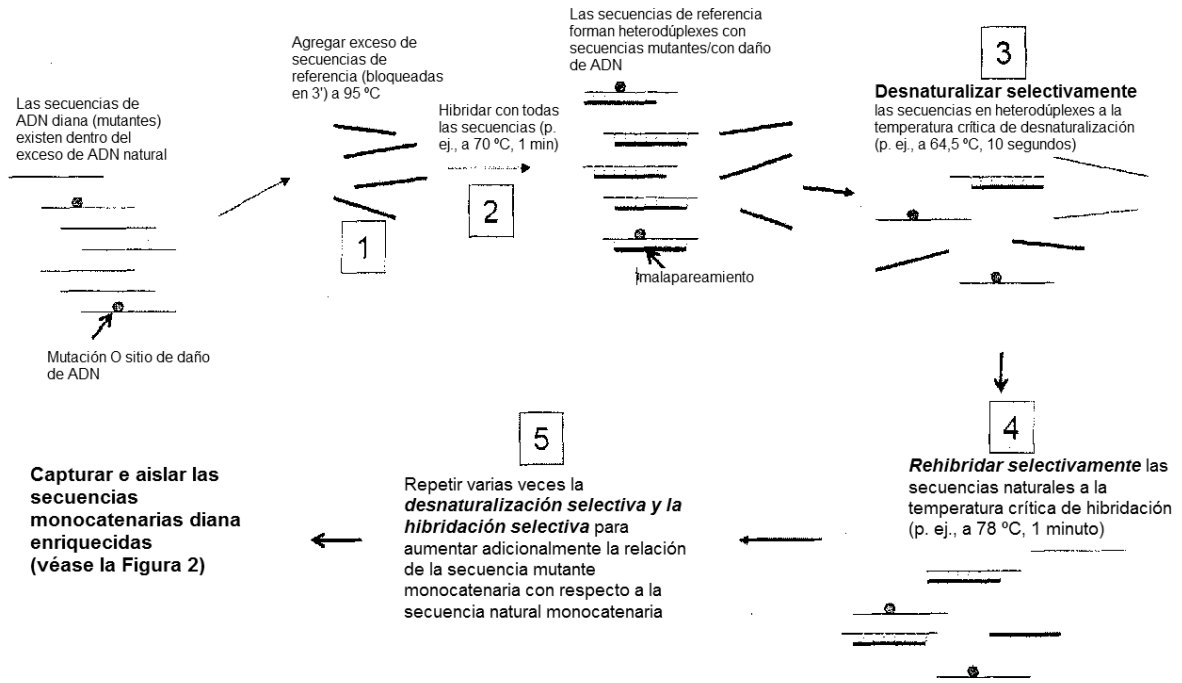
Fig. 8



**Fig. 9**



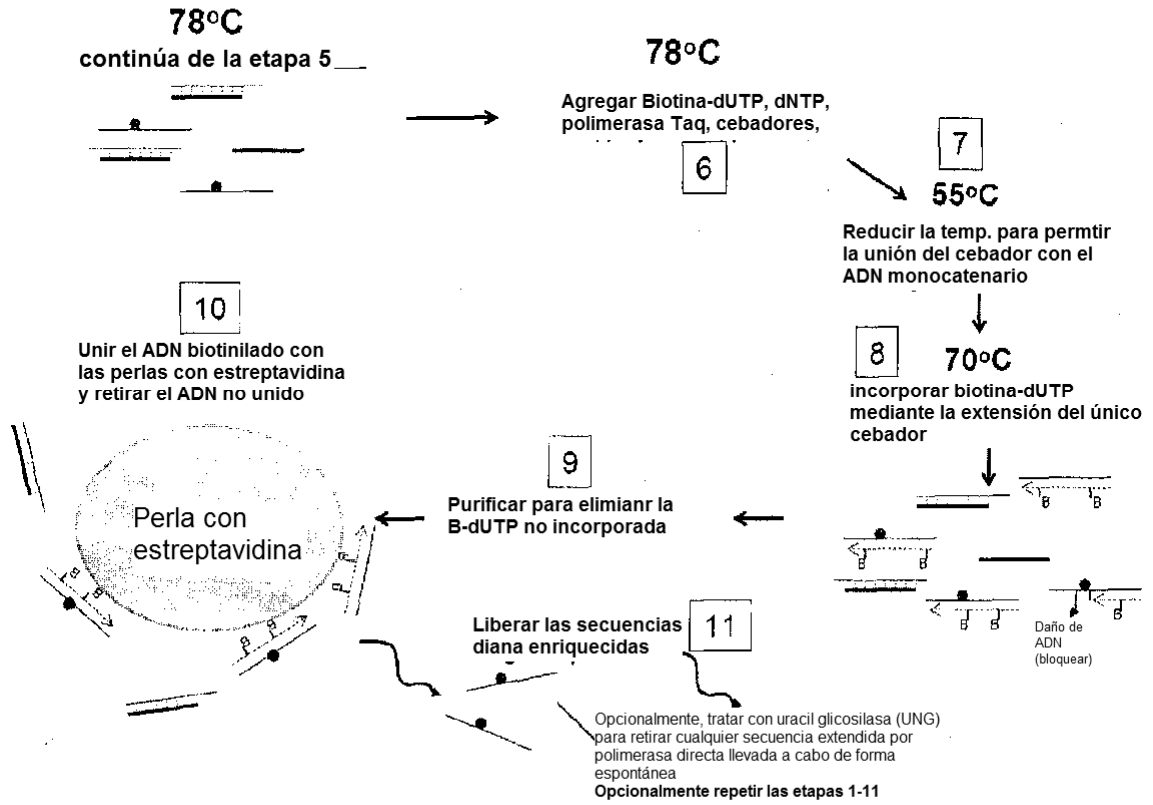
**Los heterodúplexes se desnaturalizan primero y se reasocian por último**



**Fig. 11**

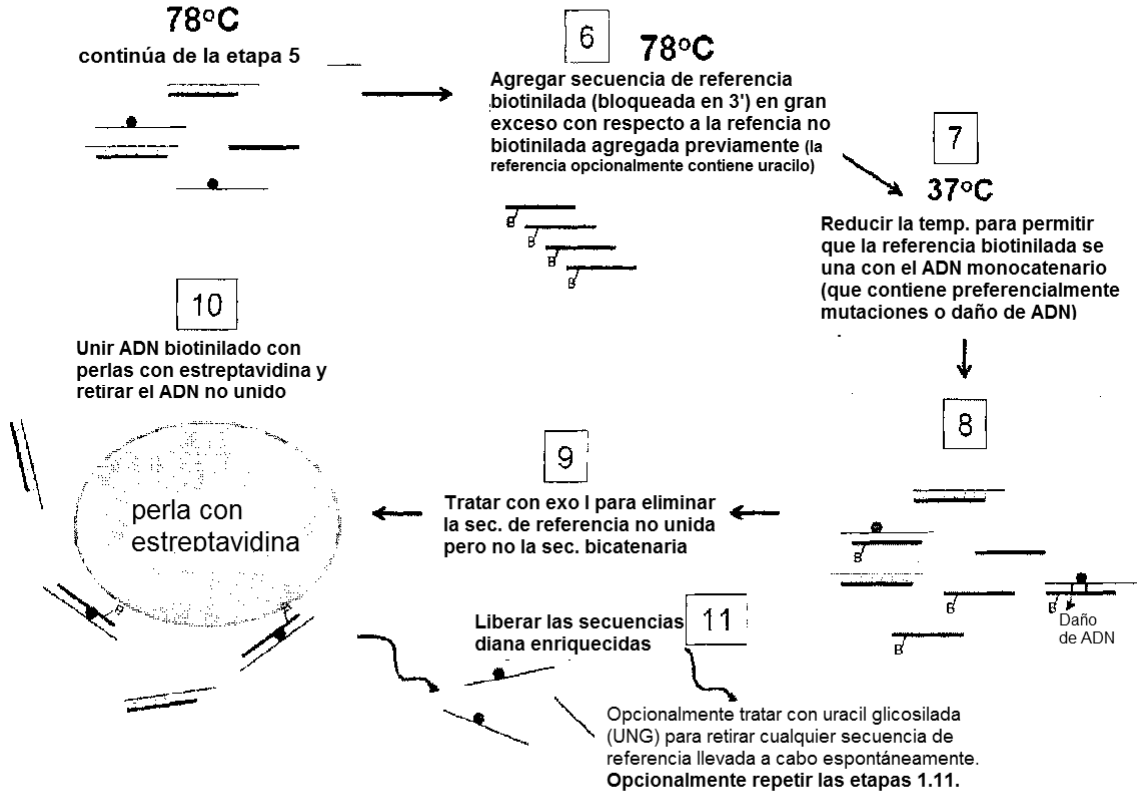


**Captura y aislamiento de secuencias monocatenarias con mutación (o daño de ADN) enriquecida mediante extensión de cebador**



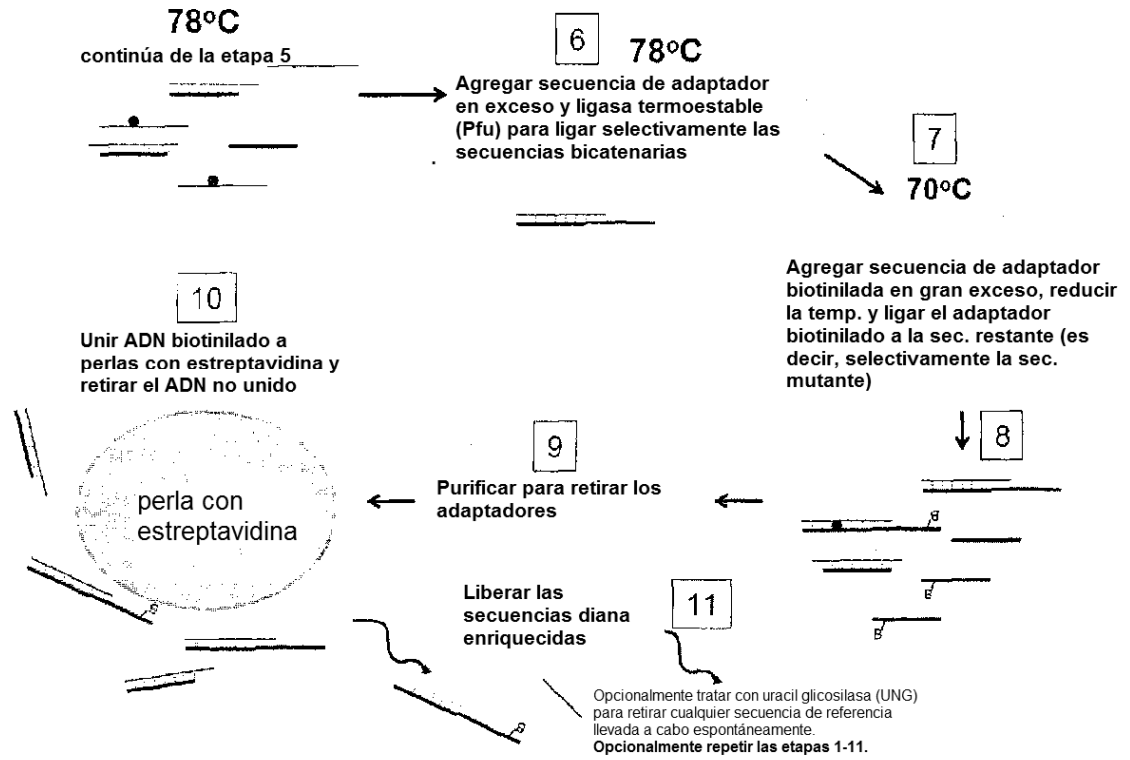
**Fig. 12**

**Captura y aislamiento de secuencias monocatenarias simples con mutación (o daño de ADN) enriquecida mediante hibridación con exceso de referencia biotinilada**



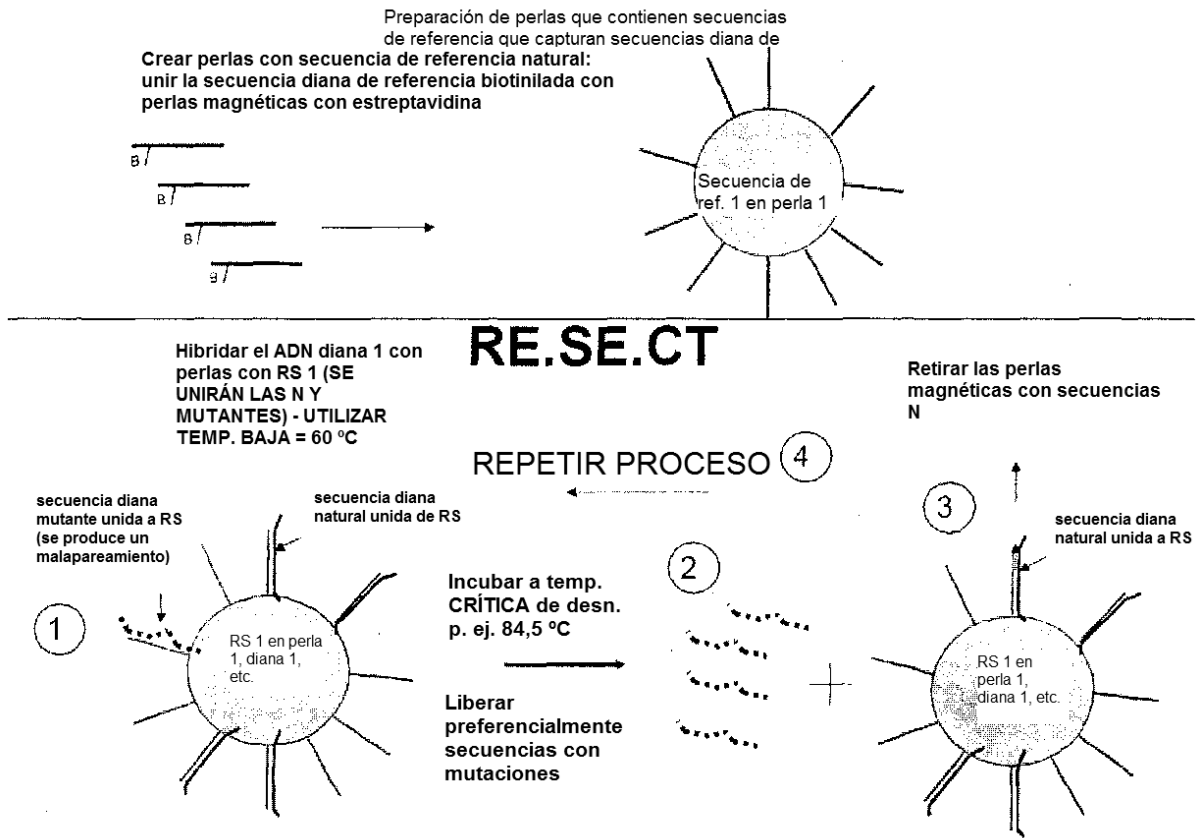
**Fig. 13**

**Captura y biotilación selectiva de secuencias monocatenarias a través de ligación selectiva a temperatura crítica**



**Fig. 14**

**RE.SE.CT: Ilustración de concepto**



**Fig. 15**

### Mutación puntual en Kras C>A

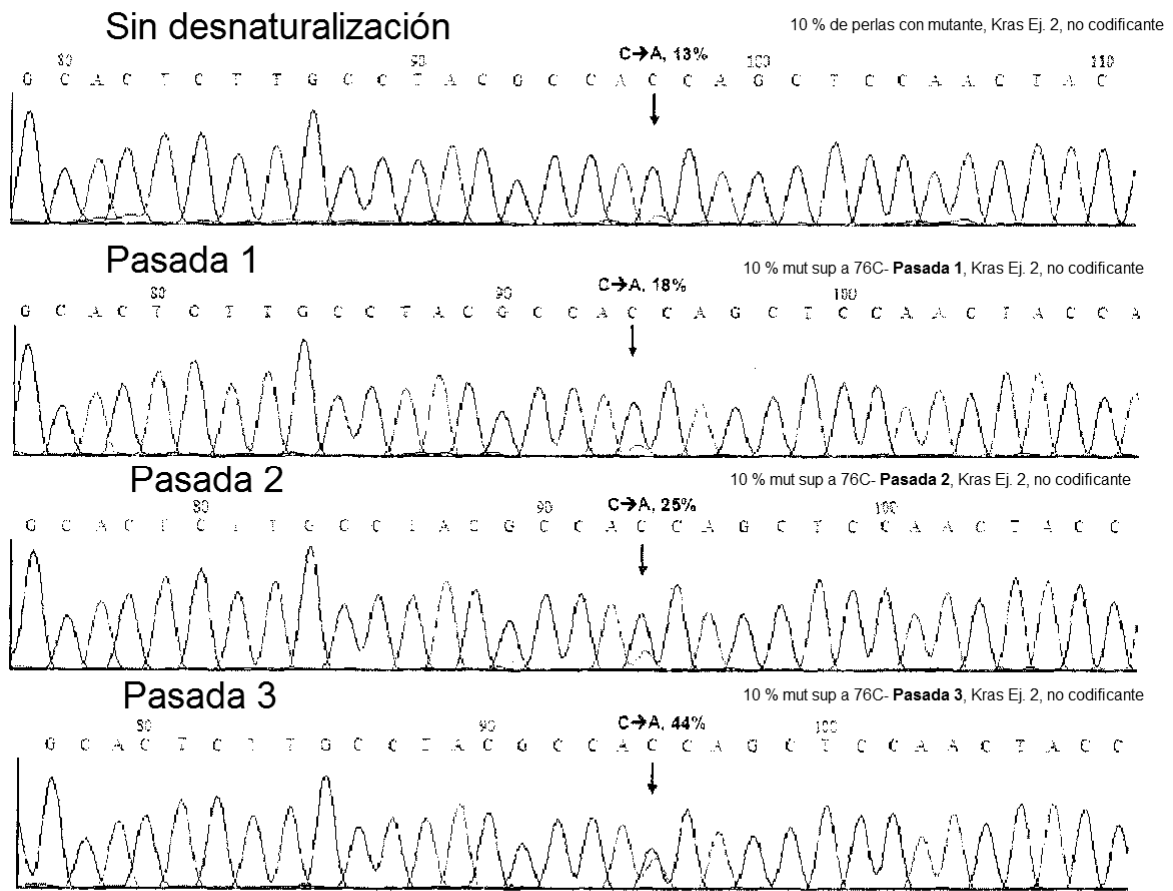
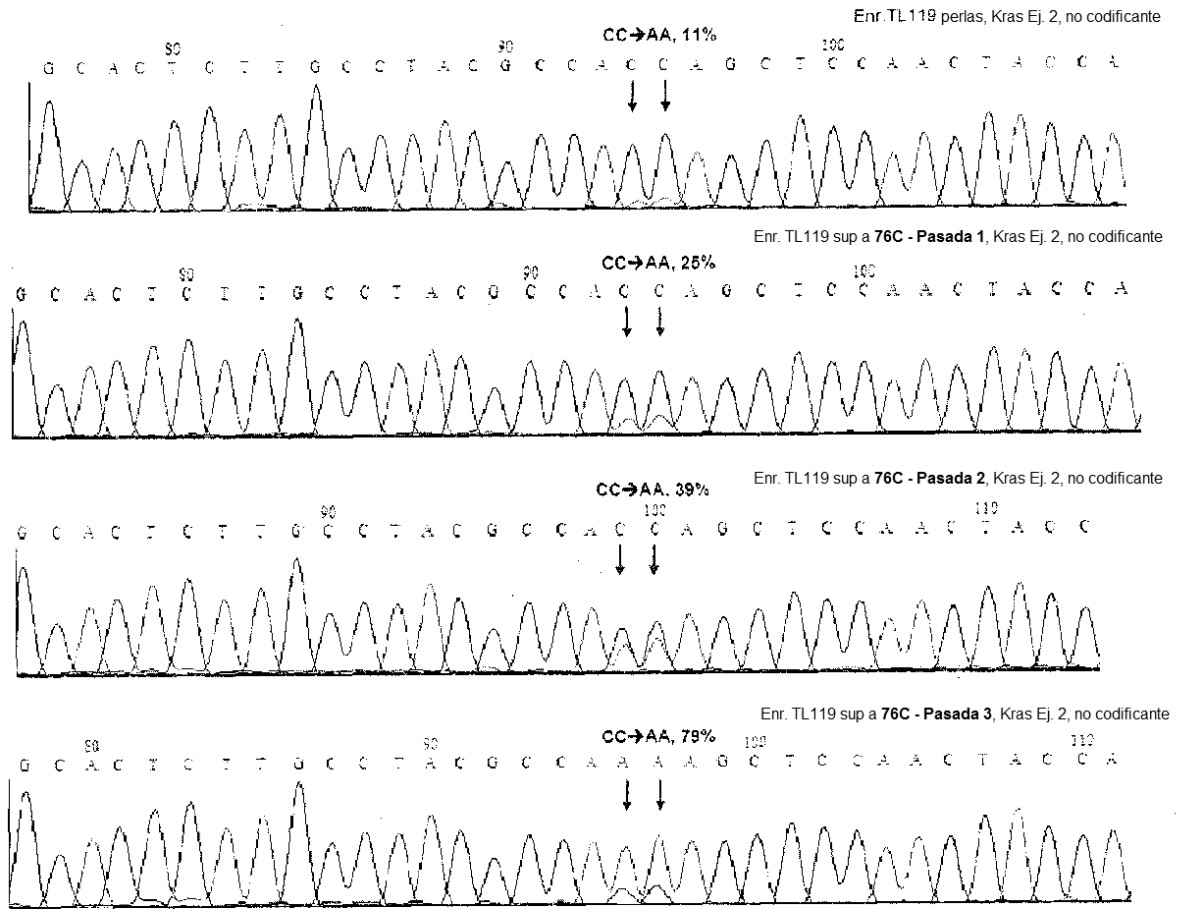


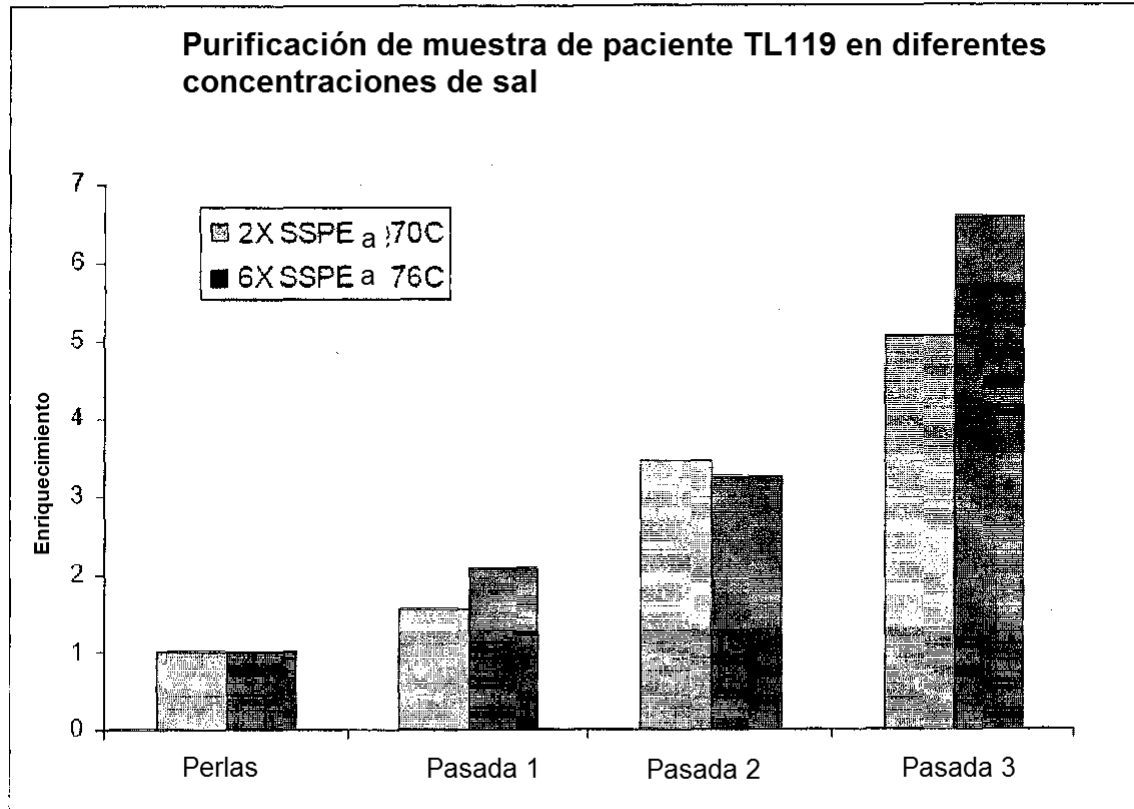
Fig. 16

**Mutación doble de Kras CC>AA**



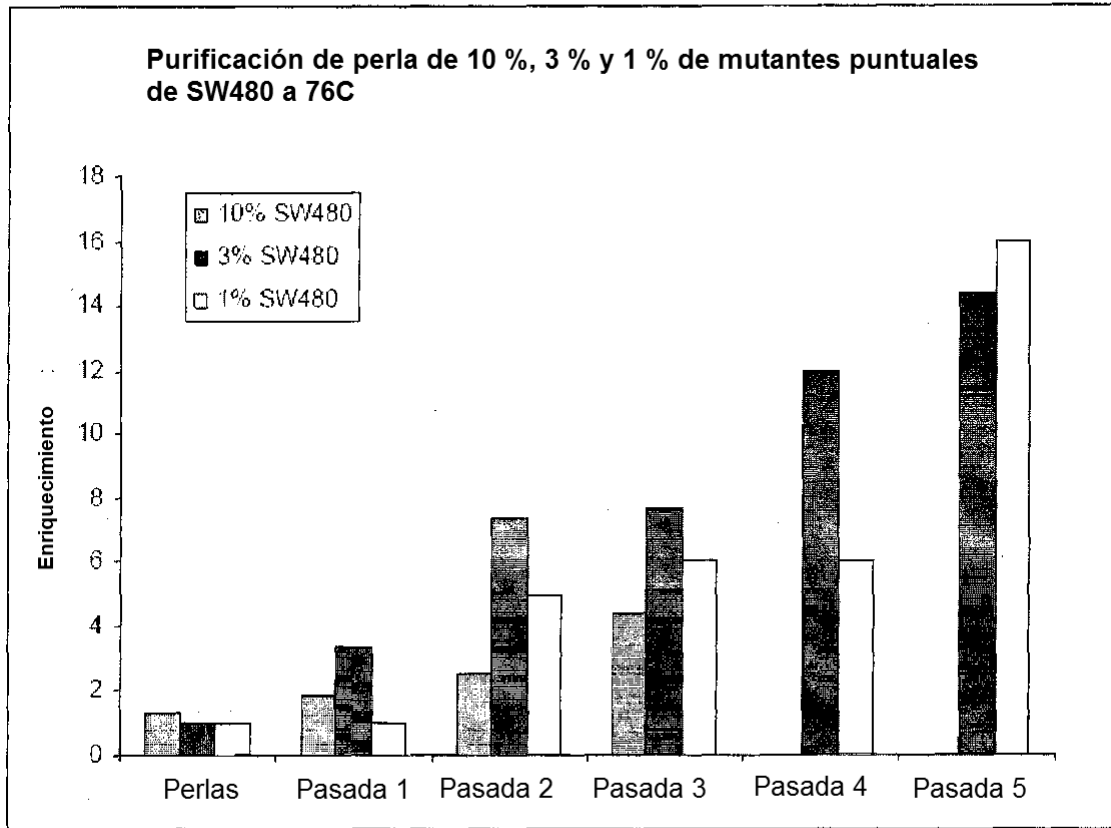
**Fig. 17**

**Purificación de perla de mutación doble de KRAS (CC>AA) de pacientes TL119**



**Fig. 18**

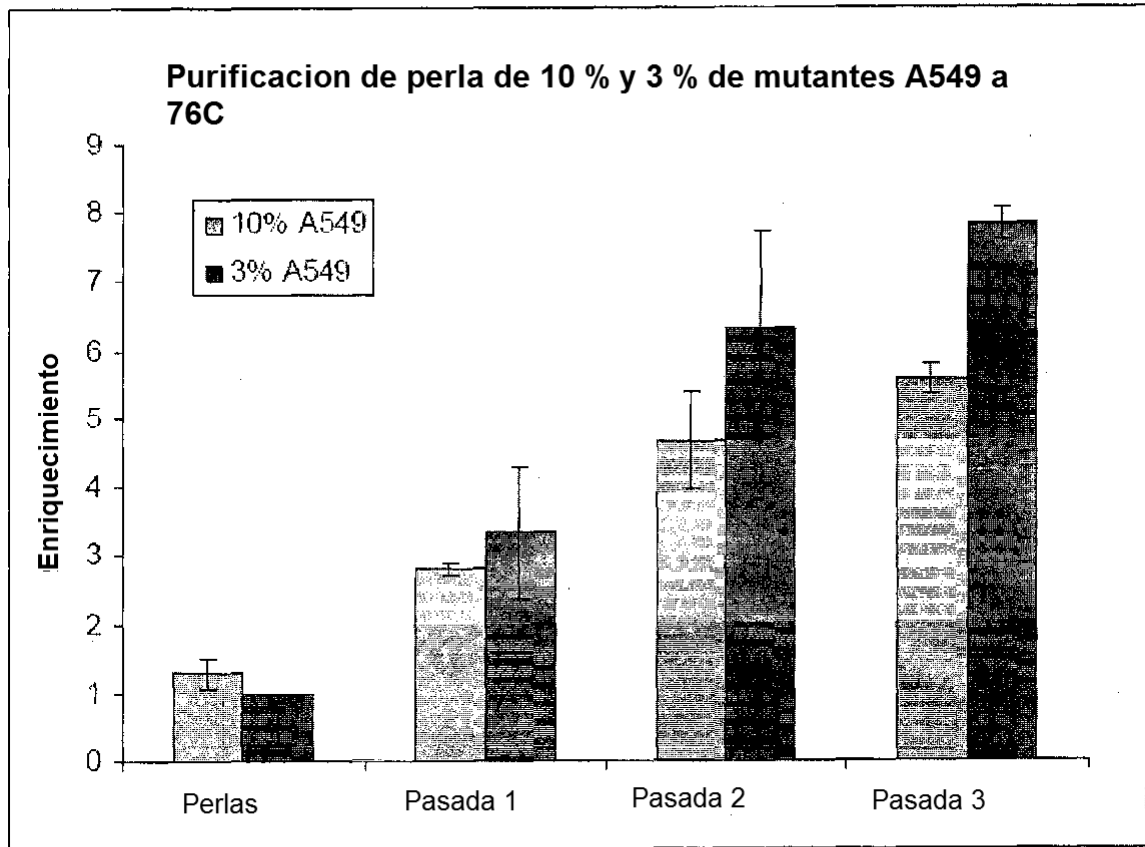
**Enriquecimiento de mutación puntual única de KRAS (C>A) de mezclas de ADN mutante de SW480**



**Fig. 19**

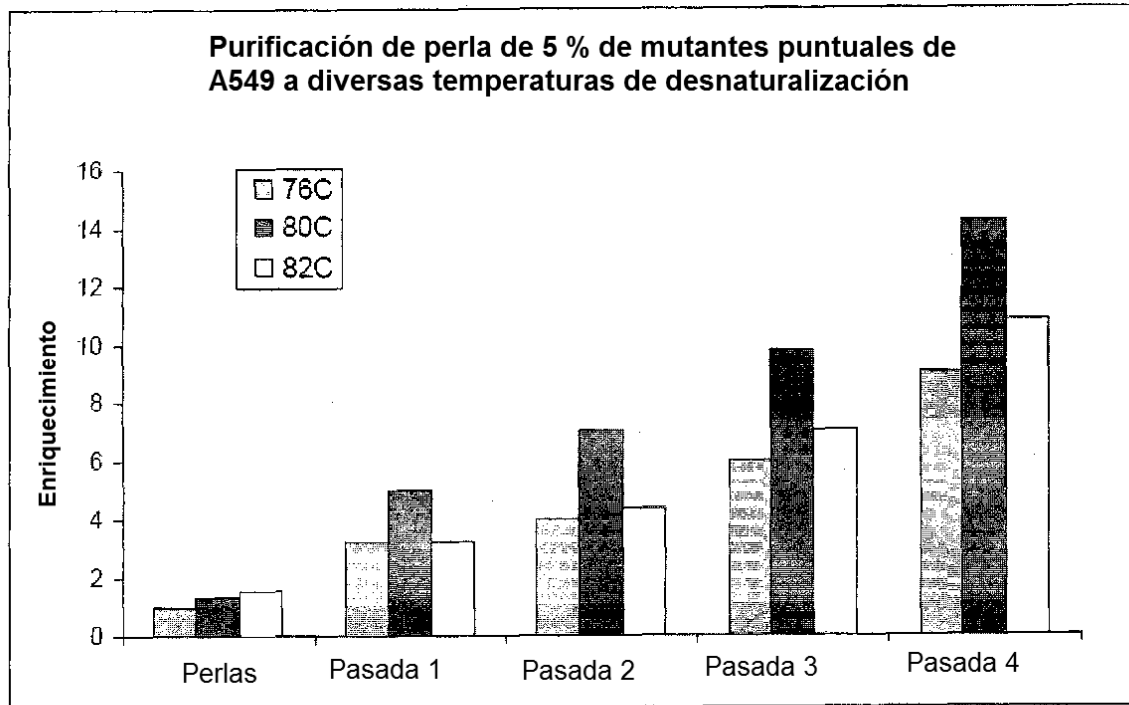


**Enriquecimiento de mutación puntual única de KRAS (C>T) de mezclas de ADN mutante A549**



**Fig. 20**

**Enriquecimiento de mutante puntual simple de KRAS (C>T) a diversas temperaturas de desnaturalización**



**Fig. 21**