

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 961**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2012 PCT/EP2012/003817**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13041194**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2012 E 12770415 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2758546**

54 Título: **Uso de G-Clamp para mejorar la PCR específica de alelo**

30 Prioridad:

23.09.2011 US 201161538650 P

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

01.03.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BODEPUDI, VEERAI AH;
SCHOENBRUNNER, NANCY y
TSAN, ALISON**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 656 961 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

Uso de G-Clamp para mejorar la PCR específica de alelo

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

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

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

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

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

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

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

40 Otro enfoque para aumentar la especificidad implica la modificación química de los cebadores. Por ejemplo, se encontró que ciertas modificaciones en los carbonos 2'-C y 4'-C de la desoxirribosa de algunos nucleótidos del cebador potencian la discriminación alélica por la polimerasa, véase Gaster, J. y Marx, A. (2005) Chem. Eur. J. 11:1861-1870. En otro estudio, se encontró que la discriminación alélica se potencia mediante el uso de una base de pirimidina antinatural en uno de los nucleótidos del cebador, específicamente, pseudoisocitidina con diversos sustituyentes en la posición 6 del anillo de pirimidina, véase la patente de EE. UU. n.º 7.408.051, o modificaciones específicas, por ejemplo, terc-butilbencil-dA o -dC o metil-dA o -dC, en el grupo amino exocíclico, véase el documento WO 2012/084173. En otro enfoque para mejorar la amplificación específica de alelo, se usan análogos de ácido nucleico bicíclico conocidos como ácido nucleico bloqueado (LNA) como una modificación en la posición -1 de la base mutada de un cebador, véase el documento US 2009/0181378.

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

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

5 La G-clamp o 9-(aminoetoxi)fenoxazin-2'-desoxicitidina es una aminoetoxifenoxazin-2'-desoxicitidina tricíclica, que es un análogo de citosina, que se muestra en la Figura 1. La G-clamp, cuando se incorpora a los oligonucleótidos, reconoce simultáneamente las caras de Watson-Crick y Hoogsteen de una guanina complementaria dentro de una hélice. Por
10 ello, la G-clamp que contiene oligonucleótidos potenciaba sustancialmente la estabilidad térmica helicoidal y la discriminación de emparejamientos erróneos cuando hibridaba con cadenas complementarias de ADN y ARN. Estas propiedades de afinidad y especificidad potenciadas son de interés en los campos del diagnóstico basado en ácidos nucleicos y el direccionamiento específico de secuencia de ARN mediante el enfoque antisentido. Las características adicionales de G-clamp y derivados de pirimidina relacionados se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 6.414.127, la patente de EE. UU. n.º 6.951.931, la patente de EE. UU. n.º 7.511.125 y la patente de EE. UU. n.º RE39.324.

15 **SUMARIO DE LA INVENCION**

En un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de amplificación específica de alelo de una variante de una secuencia diana, existiendo la diana en forma de varias secuencias variantes, comprendiendo el procedimiento (a) hibridar un primer y un segundo oligonucleótidos con al menos una variante de la secuencia diana; en el que el primer
20 oligonucleótido es al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana, y el segundo oligonucleótido es al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana, y tiene al menos un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana; en el que el segundo oligonucleótido incorpora al menos un nucleótido "G-clamp" (9-(aminoetoxi)fenoxazin-2'-desoxicitidina); (b) extender el segundo oligonucleótido con una ácido nucleico polimerasa, en el que la polimerasa es capaz de extender el segundo
25 oligonucleótido de manera eficiente cuando el segundo oligonucleótido hibrida con una variante de la secuencia diana que es complementaria de al menos un nucleótido selectivo, y de manera sustancialmente menos eficiente cuando el segundo oligonucleótido hibrida con una variante de la secuencia diana que no es complementaria de al menos un nucleótido selectivo.

30 Se divulga adicionalmente un kit para la amplificación específica de alelo de una secuencia diana, existiendo la diana en forma de varias secuencias variantes, comprendiendo el kit: (a) un primer oligonucleótido al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana; y (b) un segundo oligonucleótido al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana que tiene al menos un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana; en el que el segundo oligonucleótido incorpora al menos un
35 nucleótido "G-clamp" (9-(aminoetoxi)fenoxazin-2'-desoxicitidina).

La divulgación describe adicionalmente un oligonucleótido para realizar una amplificación específica de alelo de una secuencia diana, existiendo la diana en forma de varias secuencias variantes, comprendiendo el oligonucleótido, (a) una
40 secuencia al menos parcialmente complementaria de una porción de una o más variantes de dicha secuencia diana; (b) al menos un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana; (c) al menos un nucleótido "G-clamp" (9-(aminoetoxi)fenoxazin-2'-desoxicitidina).

La divulgación describe aún adicionalmente una mezcla de reacción para la amplificación específica de alelo de una secuencia diana, existiendo la diana en forma de varias secuencias variantes, comprendiendo la mezcla: (a) un primer
45 oligonucleótido al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana; y (b) un segundo oligonucleótido al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana, pero que tiene al menos un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana; en el que dicho segundo oligonucleótido incorpora al menos un nucleótido "G-clamp" (9-(aminoetoxi)fenoxazin-2'-desoxicitidina).

50 **BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS**

La FIG. 1 muestra la interacción de enlace de hidrógeno entre la desoxiguanina y la desoxicitidina (A) y entre la desoxiguanina y la G-clamp (B).

55 La FIG. 2 (A-C) muestra la secuencia de codificación del gen de EGFR humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

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

65 El término «ácido nucleico» se refiere a polímeros de nucleótidos (por ejemplo, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de nucleótidos, etc.) y que comprenden ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN),

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

Además de las bases heterocíclicas de origen natural que se encuentran típicamente en ácidos nucleicos (por ejemplo, adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), los análogos de nucleótidos también pueden incluir bases heterocíclicas de origen no natural, tales como las descritas, por ejemplo, en Seela et al. (1999) *Helv. Chim. Acta* 82:1640. Ciertas bases usadas en análogos de nucleótidos actúan como modificadores de la temperatura de fusión (Tm). Por ejemplo, algunos de estos incluyen 7-desazapurinas (por ejemplo, 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, etc.), pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo, propinil-dU, propinil-dC, etc.) y similares; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.990.303. Otras bases heterocíclicas representativas incluyen, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina; derivados 8-aza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; derivados 7-desaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitidina; 5-fluorocitidina; 5-clorocitidina; 5-yodocitidina; 5-bromocitidina; 5-metilcitidina; 5-propinilcitidina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluorouracilo; 5-clorouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracilo y similares.

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

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

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

Un nucleótido "G-clamp" se refiere al análogo de citosina, 9-(aminoetoxi)fenoxazin-2'-desoxicitidina (AP-dC) y se divulga en el documento US 6.414.127. Por ejemplo, AP-dC se puede incorporar en cebadores para generar productos de amplificación a partir de una secuencia diana, la secuencia YKL055c de *S. cerevisiae* (véase "The Glen Reports 19-2", 1 de diciembre de 2007, XP055047527, Sterling Virginia/EE. UU.). Además, se describen oligonucleótidos con AP-dC en el extremo 3' y oligonucleótidos correspondientes sin la extensión AP-dC en el extremo 3', véase "The Glen Reports 18-1", 1 de junio de 2006, XP055047827, Sterling, Virginia/EE. UU.

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

Un «ácido nucleico cebador» o «cebador» es un oligonucleótido que puede hibridar con un ácido nucleico de molde y permitir la extensión o elongación de la cadena usando un biocatalizador que incorpora nucleótidos. Aunque se utilizan

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Un «nucleótido selectivo» es un nucleótido en un cebador específico de alelo que confiere selectividad por el alelo al cebador. El nucleótido selectivo es complementario de un nucleótido correspondiente en la variante deseada de los ácidos nucleicos diana, pero no complementario del nucleótido correspondiente en las variantes no deseadas del ácido nucleico diana. En un cebador, más de un nucleótido puede ser complementario de un nucleótido en las variantes deseadas de los ácidos nucleicos diana, pero no complementario del nucleótido correspondiente en las variantes no deseadas del ácido nucleico diana. Sin embargo, el nucleótido selectivo se localiza en una posición dentro del cebador que afecta a la especificidad del cebador. El nucleótido selectivo permite una amplificación eficiente o ineficiente del ácido nucleico diana, dependiendo de si encuentra o no encuentra un nucleótido complementario en el ácido nucleico diana. Un cebador puede contener más de un nucleótido selectivo.

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

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a un procedimiento de amplificación específica de alelo que comprende (a) proporcionar una muestra, que posiblemente contiene al menos una variante de una secuencia diana; (b) proporcionar un primer oligonucleótido al menos parcialmente complementario de más de una variante de la secuencia diana; (c) proporcionar un segundo oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana, que tiene un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana; en el que dicho segundo oligonucleótido incorpora al menos un nucleótido 9-(aminoetoxi)fenoxazin-2'-desoxicitidina; (d) proporcionar condiciones adecuadas para la hibridación de dichos primer y segundo oligonucleótidos con al menos una variante de la secuencia diana; (e) proporcionar condiciones adecuadas para la extensión de los oligonucleótidos mediante una ácido nucleico polimerasa; en el que dicha polimerasa es capaz de extender dicho segundo oligonucleótido cuando hibrida con la variante de la secuencia diana para la que tiene dicho nucleótido selectivo complementario y sustancialmente menos cuando dicho segundo oligonucleótido hibrida con la variante de la secuencia diana para la que tiene un nucleótido selectivo no complementario.

El segundo oligonucleótido, al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana, que tiene un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana, se conoce como «oligonucleótido selectivo», «cebador selectivo» o «cebador selectivo de alelo». El oligonucleótido selectivo de la presente invención comprende 10-50, más preferentemente 15-35 nucleótidos, la mayoría de ellos complementarios de una secuencia en más de una variante de la secuencia diana. El nucleótido selectivo del oligonucleótido es complementario de una variante de la secuencia diana que ha de ser amplificada y no complementario de otras variantes. En un modo de realización, el nucleótido selectivo es el nucleótido del extremo 3'. El oligonucleótido selectivo de la presente invención incluye uno o más nucleótidos "G-clamp" (9-(aminoetoxi)fenoxazin-2'-desoxicitidina). En algunos modos de realización, el nucleótido "G-clamp" aparece en el nucleótido del extremo 3'. De acuerdo con la invención, el nucleótido "G-clamp" aparece 1, 2 o 3 nucleótidos en dirección 5' del nucleótido del extremo 3'. En otros modos de realización, el nucleótido con una base modificada es el nucleótido del extremo 3'. En algunos modos de realización, el nucleótido "G-clamp" aparece tanto en el extremo 3' como al menos en una posición más, en otra parte del oligonucleótido.

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

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

En algunos modos de realización, la reacción de amplificación implica un protocolo de inicio en caliente. En el contexto de la amplificación específica de alelo, la selectividad de los cebadores específicos de alelo con respecto a la diana con

emparejamientos erróneos se puede potenciar mediante el uso de un protocolo de inicio en caliente. Se conocen en la técnica muchos protocolos de inicio en caliente, por ejemplo, el uso de cera, la separación de los reactivos críticos del resto de la mezcla de reacción (patente de EE. UU. n.º 5.411.876), el uso de un ácido nucleico polimerasa inactivada reversiblemente por un anticuerpo (patente de EE.UU. n.º 5.338.671), un ácido nucleico polimerasa inactivada reversiblemente por un oligonucleótido que está diseñado para unirse específicamente a su sitio activo (patente de EE. UU. n.º 5.840.867) o el uso de un ácido nucleico polimerasa con modificaciones químicas reversibles como se describe, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.677.152 y 5.773.528.

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

El ensayo de amplificación específico de alelo puede emplear cualquier ácido nucleico polimerasa adecuada conocida en la técnica. Para un ensayo de PCR específico de alelo se puede usar cualquier ácido nucleico polimerasa termoestable. A veces es deseable usar una enzima sin la actividad de corrección (exonucleasa 3'-5'), tal como, por ejemplo, la ADN polimerasa Taq. También puede ser deseable usar enzimas sustancial o totalmente carentes de la actividad nucleasa 5'-3', tal como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.795.762. Un ejemplo de dicha enzima es la polimerasa $\Delta Z05$. A veces puede ser deseable tener una enzima con capacidad de «inicio en caliente», tal como las enzimas modificadas de forma reversible descritas en las patentes de EE. UU. n.º 5.677.152 y 5.773.528. Un ejemplo de una enzima de inicio en caliente es la polimerasa $\Delta Z05$ -Gold.

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

Los productos de amplificación se pueden detectar después de haberse completado la amplificación, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de los productos no marcados y tinción del gel con un colorante de unión a ácido nucleico. De forma alternativa, los productos de amplificación pueden llevar un marcador radioactivo o químico, ya sea en virtud de su incorporación durante la síntesis o en virtud de ser los productos de extensión de un cebador marcado. Después de la electroforesis o durante la misma, los productos de amplificación marcados se pueden detectar con herramientas radiológicas o químicas adecuadas conocidas en la técnica. Después de la electroforesis, el producto también se puede detectar con una sonda específica de la diana marcada por cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica. La sonda marcada también se puede aplicar a la diana sin electroforesis, es decir, en un ensayo de «inmunotransferencia por puntos» o similar.

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

La presente divulgación proporciona además una mezcla de reacción para amplificar de forma específica o selectiva una variante seleccionada de la secuencia diana, que comprende un primer oligonucleótido al menos parcialmente complementario de más de una variante de la secuencia diana, un segundo oligonucleótido al menos parcialmente complementario de más de una variante de la secuencia diana, pero que tiene un nucleótido selectivo complementario de solo una variante de la secuencia diana, en el que dicho segundo oligonucleótido incluye tanto al menos un nucleótido "G-clamp" como un ácido nucleico diana que se sabe que existe en más de una variante de secuencia. En algunos modos de realización, la mezcla de reacción comprende además los reactivos y soluciones necesarios, en general, para la amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo un ácido nucleico polimerasa, precursores de ácidos

nucleicos, es decir, trifosfatos de nucleósidos, e iones orgánicos e inorgánicos, adecuados para el soporte de la actividad de la ácido nucleico polimerasa.

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

25 En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un oligonucleótido para uso en la PCR específica de alelo. Un oligonucleótido típico para uso en la PCR específica de alelo de la presente invención comprende 10-50, más preferentemente 15-35 nucleótidos, la mayoría de ellos complementarios de una secuencia en más de una variante de la secuencia diana. Sin embargo, el nucleótido selectivo del oligonucleótido es complementario de una variante de la secuencia diana y no complementario de otras variantes. Además, el oligonucleótido descrito para el uso de la presente invención incluye uno o más nucleótidos "G-clamp". En algunos modos de realización, el nucleótido "G-clamp" aparece en el nucleótido del extremo 3'. En otros modos de realización, el nucleótido "G-clamp" aparece entre 1 y 5. De acuerdo con la presente invención, al menos una 9-(aminoetoxi)fenoxazin-2'-desoxicitidina se incorpora en una posición 1, 2 o 3 nucleótidos en dirección 5' del nucleótido del extremo 3'. En algunos modos de realización, el nucleótido "G-clamp" aparece tanto en el extremo 3' como en otras partes del oligonucleótido.

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

EJEMPLOS

40 *Ejemplo 1*

Cebadores para detectar la mutación L858R en el gen de EGFR humano

45 Esta mutación resulta del cambio de nucleótidos 2573 T-> G en el gen de EGFR de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). Los cebadores y las sondas para detectar tanto el gen de EGFR de tipo silvestre como el mutante (SEQ ID NO: 2) se muestran en la Tabla 1. Un cebador en cada par de cebadores de amplificación presenta emparejamientos correctos con la variante mutante y emparejamientos erróneos con la variante de tipo silvestre en el extremo 3'. El cebador y la sonda restantes son comunes tanto para la diana mutante como para la diana de tipo silvestre.

50 Tabla 1

SEQ ID NO: 3	GCACCCAGCAGTTTGGCC <u>A</u>	Cebador de tipo silvestre
SEQ ID NO: 4	GCGCCCAGCAGTTTGGCCC	Cebador mutante
SEQ ID NO: 5	GCGCCCAGCAGTTTGGCC <u>J</u>	Cebador mutante
		J = G-clamp
SEQ ID NO: 6	GCGCCCAGCAGTTTGGC <u>J</u> C	Cebador mutante
		J = G-clamp
SEQ ID NO: 7	GCGCCCAGCAGTTTGG <u>J</u> CC	Cebador mutante
		J = G-clamp

SEQ ID NO: 8	GTCTTCTCTGTTTCAGGGCATGAAC	Cebador común
SEQ ID NO: 9	FTACTGGTGAAQAACACCGCAGCATGTP	Sonda: F = treo-FAM, Q = BHQ-2, P = fosfato
SEQ ID NO: 10	ATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCT	Cebador de tipo silvestre
SEQ ID NO: 11	ATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCG	Cebador mutante
SEQ ID NO: 12	ATGTCAAGATCACAGATTTTGGGJG	Cebador mutante J = G-clamp
SEQ ID NO: 13	CTGGTCCCTGGTGTGAGAAAA	Cebador común
SEQ ID NO: 14	FTACCATGCAGQAAGGAGGCAAAGTAAGGAGP	Sonda: F = FAM, Q = BHQ-2, P = fosfato

5 Para cada reacción de amplificación, el ADN genómico de tipo silvestre (K562) estaba presente en 10^4 copias por reacción. El ADN plasmídico mutante linealizado también estaba presente en 10^4 copias por reacción. Se prepararon plásmidos mutantes mediante inserción de 500 pb en un vector pUC19 (proporcionado como Minigenes de IDT; SEQ ID NO: 15 y 16).

10 Cada reacción amplificaba 10^4 copias de cualquier diana mutante o de tipo silvestre (a 10^4 copias de entrada). La variante con emparejamientos correctos era un ADN plasmídico con el inserto que incorporaba la secuencia mutante EGFR L858R, mientras que la variante con emparejamientos erróneos era el ADN K562. Los cebadores con emparejamientos correctos están no modificados o modificados con G-Clamp en el extremo 3' o en las posiciones N-1 o N-2 del extremo 3'.

15 Cada reacción de 12 μ l contenía glicerol al 2,98 %, Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), KCl 80 mM, dATP, dCTP y dGTP todos 200 μ M, dUTP 400 μ M, cebador directo 0,2 μ M, cebador inverso 0,2 μ M, sonda de detección 0,05 μ M, DMSO al 2,5 %, Pierce Tween 20 al 0,02 %, azida sódica al 0,036 %, EDTA 0,1 mM, 0,2 U/ μ l de uracil-N-glucosilasa (UNG), aptámero NTQ21-46A 200 nM, polimerasa mutada Z05 40 nM y acetato de magnesio 2,5 mM (con azida de sodio al 0,09 %).

20 La amplificación y el análisis se realizaron usando el instrumento LightCycler 480 de Roche. Las reacciones se sometieron al siguiente perfil de temperatura: 50 °C durante 5 minutos (etapa de UNG) seguido de 2 ciclos de 95 °C durante 10 segundos y 62 °C durante 30 segundos; y 60 ciclos de 93 °C durante 10 segundos y 62 °C durante 30 segundos. Los datos de fluorescencia se recogieron al final de cada etapa a 62 °C durante los últimos 60 ciclos.

25 Los resultados de un experimento se muestran en la Tabla 2. Los resultados de la amplificación se expresan como un cambio en la fluorescencia en el intervalo de longitudes de onda de 450-500 nm o 540-580 nm. La selectividad de la amplificación se mide por la diferencia en el valor de Ct (Δ Ct) entre las dianas con emparejamientos correctos y las dianas con emparejamientos erróneos. El Δ Ct para cada experimento se indica en la Tabla 2. Los datos muestran que la variante con emparejamientos correctos (mutante) de la diana se amplificaba selectivamente con respecto a la variante con emparejamientos erróneos (tipo silvestre). La selectividad se potenciaba mediante la modificación con G-clamp de los nucleótidos del cebador.

30

Tabla 2

Cebador	Ct de L858R promedio	Ct de WT promedio	Δ Ct (WT-L858R)
SEQ ID NO: 3	36,7	21,6	-15,1
SEQ ID NO: 4	22,1	24,3	2,2
SEQ ID NO: 5	23,8	26,2	2,4
SEQ ID NO: 6	22,5	26,6	4,1
SEQ ID NO: 7	22,5	29,4	6,9

35 *Ejemplo 2*

Cebadores para detectar mutaciones en el gen PIK3CA

40 Un cebador en cada par de cebadores de amplificación presenta emparejamientos correctos con la variante mutante y emparejamientos erróneos con la variante de tipo silvestre en el extremo 3'. El cebador y la sonda restantes son comunes tanto para la diana mutante como para la diana de tipo silvestre. El ADN genómico de tipo silvestre (K562) estaba presente en 10^4 copias por reacción. El ADN plasmídico mutante linealizado estaba presente en 10^4 copias por

reacción. Se prepararon plásmidos mutantes mediante inserción de 500 pb en un vector pUC19 (proporcionado como Minigenes de IDT).

5 Los cebadores están no modificados o modificados con G-Clamp en cualquier posición de base desde N-1 hasta N-2. En algunos diseños se introduce un emparejamiento erróneo adicional en la secuencia del cebador en o cerca del sitio de modificación con G-Clamp.

10 Cada reacción de 12 µl contenía glicerol al 2,98 %, Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), KCl 80 mM, dATP, dCTP y dGTP todos 200 µM, dUTP 400 µM, cebador directo 0,1 µM, cebador inverso 0,1 µM, sonda de detección 0,05 µM, DMSO al 2,5 %, Pierce Tween 20 al 0,02 %, azida sódica al 0,036 %, EDTA 0,1 mM, 0,2 U/µl de uracil-N-glucosilasa (UNG), aptámero NTQ21-46A 200 nM, polimerasa mutante Z05 40 nM y acetato de magnesio 2,5 mM (con azida de sodio al 0,09 %).

15 La amplificación y el análisis se realizaron usando el instrumento LightCycler 480 de Roche. Las reacciones se sometieron al siguiente perfil de temperatura: : 50 °C durante 5 minutos (etapa de UNG) seguido de 2 ciclos de 95 °C durante 10 segundos y 62 °C durante 30 segundos; y 60 ciclos de 93 °C durante 10 segundos y 62 °C durante 30 segundos. Los datos de fluorescencia se recogieron al final de cada etapa a 62 °C durante los últimos 60 ciclos.

20 Los resultados de un experimento se muestran en la Tabla 3. Los resultados de la amplificación se expresan como un cambio en la fluorescencia en el intervalo de longitudes de onda de 450-500 nm o 540-580 nm. La selectividad de la amplificación se mide por la diferencia en el valor de Ct (Δ Ct) entre las dianas con emparejamientos correctos y las dianas con emparejamientos erróneos. El Δ Ct para cada experimento se indica en la Tabla 3. Los datos muestran que, para el cebador mutante no modificado, la variante con emparejamientos correctos (mutante) de la diana se amplificaba selectivamente con respecto a la variante con emparejamientos erróneos (tipo silvestre). La selectividad se potenció mediante la modificación con G-clamp de los nucleótidos del cebador mutante.

25

Tabla 3

	Ct de mutante promedio	Ct de WT promedio	Δ Ct (WT-Mutante)
Cebador de tipo silvestre	24,5	21,2	-3,3
Cebador mutante sin modificar	22,6	33,6	11,0
Cebador mutante con G-clamp	27,6	51,5	23,9

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG

<120> USO DE G-CLAMP PARA MEJORAR LA PCR ESPECÍFICA DE ALELO

10 <130> 27369 WO

<150> 61/538.650

<151> 23-09-2011

15 <160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 3633

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

30 <223> Gen de EGFR de tipo silvestre

<400> 1

ES 2 656 961 T3

atgcgaccct	ccgggacggc	cggggcagcg	ctcctggcgc	tgctggctgc	gctctgcccg	60
gcgagtcggg	ctctggagga	aaagaaagt	tgccaaggca	cgagtaacaa	gctcacgcag	120
ttgggcactt	ttgaagatca	ttttctcagc	ctccagagga	tgttcaataa	ctgtgaggtg	180
gtccttggga	atttgaaat	tacctatgtg	cagaggaatt	atgatctttc	cttcttaaag	240
accatccagg	aggtggctgg	ttatgtcctc	attgccctca	acacagtgga	gcgaattcct	300
ttgaaaaacc	tgcagatcat	cagaggaaat	atgtactacg	aaaattccta	tccttagca	360
gtcttatcta	actatgatgc	aaataaaacc	ggactgaagg	agctgcccac	gagaaattta	420
caggaaatcc	tgcattggcg	cgtgcggttc	agcaacaacc	ctgccctgtg	caacgtggag	480
agcatccagt	ggcgggacat	agtcagcagt	gactttctca	gcaacatgtc	gatggacttc	540
cagaaccacc	tgggcagctg	ccaaaagtgt	gatccaagct	gtcccaatgg	gagctgctgg	600
ggtgcaggag	aggagaactg	ccagaaactg	accaaaatca	tctgtgcccc	gcagtgtctc	660
gggcgctgcc	gtggcaagtc	ccccagtgac	tgctgccaca	accagtgtgc	tcgaggctgc	720
acaggcccc	gggagagcga	ctgcctggtc	tgccgcaa	tccgagacga	agccacgtgc	780
aaggacacct	gccccccact	catgctctac	aacccccacca	cgtaccagat	ggatgtgaac	840
cccgagggca	aatacagctt	tggtgccacc	tgctggaaga	agtgtccccg	taattatgtg	900
gtgacagatc	acggctcgtg	cgtccgagcc	tggtgggccc	acagctatga	gatggaggaa	960
gacggcgtcc	gcaagtgtaa	gaagtgcgaa	gggccttgcc	gcaaagtgtg	taacggaata	1020
ggtattgggtg	aatttaaaga	ctcactctcc	ataaatgcta	cgaatattaa	acacttcaaa	1080
aactgcacct	ccatcagtg	cgatctccac	atcctgccgg	tggcatttag	gggtgactcc	1140
ttcacacata	ctcctcctct	ggatccacag	gaactggata	ttctgaaaac	cgtaaaggaa	1200

ES 2 656 961 T3

atcacaggt ttttgctgat tcaggcttgg cctgaaaaca ggacggacct ccatgccttt 1260
 gagaacctag aaatcatacg cggcaggacc aagcaacatg gtcagttttc tcttgcaatc 1320
 gtcagcctga acataacatc cttgggatta cgctccctca aggagataag tgatggagat 1380
 gtgataatth caggaaacaa aaatttgtgc tatgcaaata caataaactg gaaaaaactg 1440
 tttgggacct ccggtcagaa aacaaaaatt ataagcaaca gaggtgaaaa cagctgcaag 1500
 gccacaggcc aggtctgcca tgccttgtgc tcccccgagg gctgctgggg cccggagccc 1560
 agggactgcg tctcttgccg gaatgtcagc cgaggcaggg aatgctgga caagtgaac 1620
 cttctggagg gtgagccaag ggagtttgtg gagaactctg agtgcataca gtgccacca 1680
 gagtgcctgc ctcaggccat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga caactgtatc 1740
 cagtgtgccc actacattga cggccccac tgcgtcaaga cctgcccggc aggagtcatg 1800
 ggagaaaaca acaccctggt ctggaagtac gcagacgccg gccatgtgtg ccacctgtgc 1860
 catccaaact gcacctacgg atgcaactgg ccaggctctg aaggctgtcc aacgaatggg 1920
 cctaagatcc cgtccatcgc cactgggatg gtgggggccc tctcttctgt gctggtggtg 1980
 gccctgggga tcggcctctt catgcaagg cgccacatcg ttcggaagcg cacgctgcbg 2040
 aggctgctgc aggagaggga gcttgtggag cctcttacac ccagtggaga agctcccaac 2100
 caagctctct tgaggatctt gaaggaaact gaattcaaaa agatcaaagt gctgggctcc 2160
 ggtgcttctg gcacggtgta taagggactc tggatcccag aaggtagaaa agttaaatt 2220
 cccgctgcta tcaaggaatt aagagaagca acatctccga aagccaacaa ggaaatcctc 2280
 gatgaagcct acgtgatggc cagcgtggac aacccccacg tgtgcccct gctgggcatc 2340
 tgcctcacct ccacctgca gctcatcacg cagctcatgc cttcggctg cctcctggac 2400
 tatgtccggg aacacaaaga caatattggc tcccagtacc tgctcaactg gtgtgtgcag 2460
 atcgcaaagg gcatgaaacta cttggaggac cgctccttgg tgcaccgca cctggcagcc 2520
 aggaacgtac tggtagaaac accgcagcat gtcaagatca cagattttgg gctggccaaa 2580
 ctgctgggtg cggaagagaa agaataccat gcagaaggag gcaaagtgcc tatcaagtgg 2640
 atggcattgg aatcaattht acacagaatc tatacccacc agagtgatgt ctggagctac 2700
 ggggtgactg tttgggagtt gatgacctt ggatccaagc catatgacgg aatccctgcc 2760
 agcgagatct cctccatcct ggagaaagga gaacgcctcc ctcagccacc catatgtacc 2820
 atcgtatgct acatgatcat ggtcaagtgc tggatgatag acgcagatag tcgcccgaag 2880
 ttccgtgagt tgatcatcga attctcaaaa atggcccag acccccagcg ctacctgtc 2940
 attcaggggg atgaaagaat gcatttgcca agtcctacag actccaactt ctaccgtgcc 3000
 ctgatggatg aagaagacat ggacgacgtg gtggatgccg acgagtacct catcccacag 3060
 cagggtctct tcagcagccc ctccacgtca cggactcccc tctgagctc tctgagtga 3120
 accagcaaca attccaccgt ggcttgcat gatagaaatg ggctgcaag ctgtcccatc 3180
 aaggaagaca gcttcttga gcgatacagc tcagaccca caggcgcctt gactgaggac 3240

ES 2 656 961 T3

agcatagacg acaccttcct cccagtgctt gaatacataa accagtcctg tcccaaaagg 3300
cccgctggct ctgtgcagaa tcctgtctat cacaatcagc ctctgaacct cgcgcccagc 3360
agagaccac actaccagga cccccacagc actgcagtgg gcaaccccgga gtatctcaac 3420
actgtccagc ccacctgtgt caacagcaca ttcgacagcc ctgcccactg ggcccagaaa 3480
ggcagccacc aaattagcct ggacaaccct gactaccagc aggacttctt tccaaggaa 3540
gccaagccaa atggcatctt taagggctcc acagctgaaa atgcagaata cctaagggtc 3600
gcgccacaaa gcagtgaatt tattggagca tga 3633

<210> 2

5 <211> 3633

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> misc_feature

15

<223> Gen de EGFR mutante 2573 T>G

<400> 2

atgcgacctt ccgggacggc cggggcagcg ctctggcgc tgctggctgc gctctgcccg 60
gcgagtcggg ctctggagga aaagaaagt tgcgaaggca cgagtaacaa gctcacgcag 120
ttgggcactt ttgaagatca ttttctcagc ctccagagga tgttcaataa ctgtgaggtg 180
gtccttggga atttgaaat tacctatgtg cagaggaatt atgatctttc cttctt'aaag 240
accatccagg aggtggctgg ttatgtcctc attgcccctc acacagtgga gcgaattcct 300
ttgaaaaacc tgcagatcat cagaggaaat atgtactacg aaaattccta tgccttagca 360
gtcttatcta actatgatgc aaataaaacc ggactgaagg agctgcccac gagaaattta 420
caggaaatcc tgcattggcg cgtgcgggtc agcaacaacc ctgccctgtg caacgtggag 480
agcatccagt ggcgggacat agtcagcagt gactttctca gcaacatgtc gatggacttc 540
cagaaccacc tgggcagctg ccaaaagtgt gatccaagct gtcccaatgg gagctgctgg 600
ggtgcaggag aggagaactg ccagaaaactg accaaaatca tctgtgcccga gcagtgtctc 660
gggcgctgcc gtggcaagtc ccccagtgac tgctgccaca accagtgtgc tgcaggctgc 720
acaggcccc gggagagcga ctgcctggtc tgccgcaaat tccgagacga agccacgtgc 780
aaggacacct gccccccact catgctctac aacccccacca cgtaccagat ggatgtgaac 840
cccgagggca aatacagctt tgggtccacc tgcgtgaaga agtgtccccg taattatgtg 900
gtgacagatc acggctcgtg cgtccgagcc tgtggggccg acagctatga gatggaggaa 960
gacggcgtcc gcaagtgtaa gaagtgcgaa gggccttgcc gcaaagtgtg taacggaata 1020
ggtattgggt aatttaaaga ctactctcc ataaatgcta cgaatattaa acacttcaaa 1080
aactgcacct ccatcagtgg cgatctccac atcctgccgg tggcatttag gggtgactcc 1140
ttcacacata ctctctctt ggatccacag gaactggata ttctgaaaac cgtaaaggaa 1200

20

ES 2 656 961 T3

atcacagggg ttttgctgat tcaggccttg cctgaaaaca ggacggacct ccatgccttt 1260
 gagaacctag aaatcatacg cggcaggacc aagcaacatg gtcagttttc tcttgcaagc 1320
 gtcagcctga acataacatc cttgggatta cgctccctca aggagataag tgatggagat 1380
 gtgataattt caggaaacaa aaatttgtgc tatgcaaata caataaactg gaaaaaactg 1440
 tttgggacct ccggtcagaa aaccaaattt ataagcaaca gaggtgaaaa cagctgcaag 1500
 gccacaggcc aggtctgcca tgcttctgtc tccccgagg gctgctgggg cccggagccc 1560
 agggactgcg tctcttgccg gaatgtcagc cgaggcaggg aatgctgga caagtgaac 1620
 ctctggagg gtgagccaag ggagttgtg gagaactctg agtgcataca gtgccacca 1680
 gagtgcctgc ctcaggccat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga caactgtatc 1740
 cagtgtgccc actacattga cggccccac tgcgtcaaga cctgcccggc aggagtcatg 1800
 ggagaaaaca acaccctggc ctggaagtac gcagacgccg gccatgtgtg ccacctgtgc 1860
 catccaaact gcacctacgg atgcaactgg ccaggctctg aaggctgtcc aacgaatggg 1920
 cctaagatcc cgtccatcgc cactgggatg gtggggggccc tcctcttctg gctggtggtg 1980
 gccctgggga tcggcctctt catgcaagc cgccacatcg ttcggaagcg cacgctgcgg 2040
 aggctgctgc aggagaggga gcttgtggag cctcttacac ccagtggaga agctcccaac 2100
 caagctctct tgaggatctt gaaggaaact gaattcaaaa agatcaaagt gctgggctcc 2160
 ggtgctgctc gcacgggtga taagggactc tggatcccag aagggtgagaa agttaaatt 2220
 cccgtcgcta tcaaggaatt aagagaagca acatctccga aagccaacaa ggaaatcctc 2280
 gatgaagcct acgtgatggc cagcgtggac aacccccacg tgtgccgctt gctgggcatc 2340
 tgccctacct ccacctgca gctcatcacg cagctcatgc ccttcggctg cctcctggac 2400
 tatgtccggg aacacaaaga caatattggc tcccagtacc tgctcaactg gtgtgtgca 2460
 atcgcaaagg gcatgaacta cttggaggac cgctccttgg tgcaccgca cctggcagcc 2520
 aggaacgtac tgggtgaaaac accgcagcat gtcaagatca cagattttgg gcgggcaaaa 2580
 ctgctgggtg cggaagagaa agaataccat gcagaaggag gcaaagtgcc tatcaagtgg 2640
 atggcattgg aatcaatttt acacagaatc tatacccacc agagtgatgt ctggagctac 2700
 ggggtgactg tttgggagtt gatgaccttt ggatccaagc catatgacgg aatccctgcc 2760
 agcgagatct cctccatcct ggagaaagga gaacgcctcc ctcagccacc catatgtacc 2820
 atcgatgtct acatgatcat ggtcaagtgc tggatgatag acgcagatag tcgcccgaag 2880
 ttccgtgagt tgatcatcga attctccaaa atggcccag acccccagcg ctacctgtc 2940
 attcaggggg atgaaagaat gcatttgcca agtcctacag actccaactt ctaccgtgcc 3000
 ctgatggatg aagaagacat ggacgacgtg gtggatgccg acgagtacct catcccacag 3060
 cagggtctct tcagcagccc ctccacgtca cggactcccc tcctgagctc tctgagtgca 3120
 accagcaaca attccaccgt ggcttgcat gatagaaatg ggctgcaag ctgtcccatc 3180
 aaggaagaca gcttcttga gcgatacagc tcagaccca caggcgctt gactgaggac 3240

ES 2 656 961 T3

	agcatagacg acaccttctt cccagtgcct gaatacataa accagtccgt tcccaaaagg	3300
	cccgtggct ctgtgcagaa tctgtctat cacaatcagc ctctgaacce cgcgccagc	3360
	agagaccac actaccagga cccccacagc actgcagtgg gcaaccccga gtatctcaac	3420
	actgtccagc ccacctgtgt caacagcaca ttcgacagcc ctgcccactg ggcccagaaa	3480
	ggcagccacc aaattagcct ggacaaccct gactaccagc aggacttctt tccaaggaa	3540
	gccaagccaa atggcatctt taagggtccc acagctgaaa atgcagaata cctaagggtc	3600
	gcgccacaaa gcagtgaatt tattggagca tga	3633
	<210> 3	
5	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador de tipo silvestre	
15	<400> 3	
	gcacccagca gtttgcca	19
	<210> 4	
20	<211> 19	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador mutante	
30	<400> 4	
	gcgccagca gtttgccc	19
35	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador mutante	
	<220>	
	<221> modified_base	
50	<222> (19)..(19)	
	<223> G-clamp	
55	<400> 5	

ES 2 656 961 T3

	gcgcccagca gtttgccc	19
	<210> 6	
5	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador mutante	
15	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (18)..(18)	
20	<223> G-clamp	
	<400> 6	
25	gcgcccagca gtttgccc	19
	<210> 7	
	<211> 19	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador mutante	
	<220>	
40	<221> modified_base	
	<222> (17)..(17)	
45	<223> G-clamp	
	<400> 7	
50	gcgcccagca gtttgccc	19
	<210> 8	
	<211> 25	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador común	
	<400> 8	
65	gtcttctctg ttcaggga tgaac	25

ES 2 656 961 T3

<210> 9
 <211> 25
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Sonda
 <400> 9
 15 tactggtgaa aacaccgcag catgt 25
 <210> 10
 <211> 25
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador de tipo silvestre
 <400> 10
 30 atgcaagat cacagattt gggct 25
 <210> 11
 35 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador mutante
 45 <400> 11
 atgcaagat cacagattt gggcg 25
 <210> 12
 50 <211> 25
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador mutante
 60 <220>
 <221> modified_base
 65 <222> (24)..(24)

ES 2 656 961 T3

<223> G-clamp
 <400> 12
 5 atgtcaagat cacagatfff gggcg 25
 <210> 13
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador común
 <400> 13
 20 ctggccctg ggtcaggaa aa 22
 <210> 14
 25 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Sonda
 35 <400> 14
 taccatgcag aaggaggcaa agtaaggag 29
 <210> 15
 40 <211> 500
 <212> ADN
 45 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <223> Minigén de EGFR de tipo silvestre
 <400> 15
 tcttctttca tgcgcctttc cattctttgg atcagtagtc actaacgttc gccagccata 60
 agtccctcgc gtggagaggg tcagagcctg gcatgaacat gaccctgaat tcggatgcag 120
 55 agcttcttcc catgatgatc tgtccctcac agcagggtct tctctgtttc agggcatgaa 180

ES 2 656 961 T3

ctacttggag gaccgtcgct tgggtcaccg cgacctggca gccaggaacg tactggtgaa 240
aacaccgcag catgtcaaga tcacagattt tgggctggcc aaactgctgg gtgcggaaga 300
gaaagaatac catgcagaag gaggcaaagt aaggaggtgg ctttaggtca gccagcattt 360
tcctgacacc agggaccagg ctgccttccc actagctgta ttgtttaaca catgcagggg 420
aggatgctct ccagacattc tgggtgagct cgcagcagct gctgctggca gctgggtcca 480
gccaggtct cctggtagtg 500

<210> 16

5 <211> 500

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> misc_feature

15 <223> Minigén de EGFR mutante 2573 T>G

<400> 16

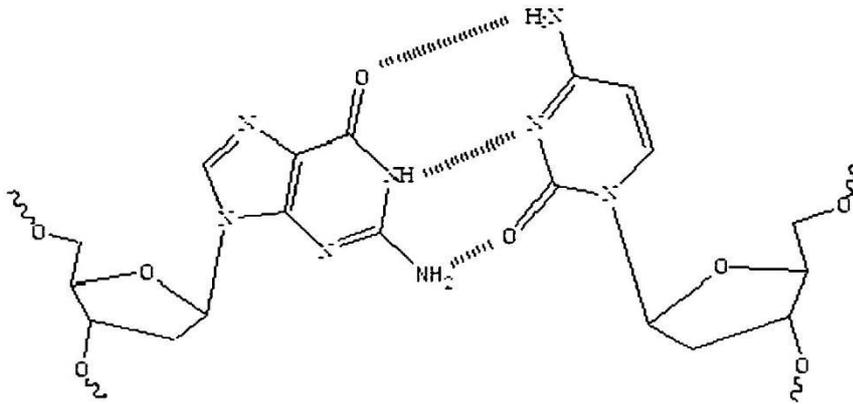
tcttctttca tgcgcctttc cattctttgg atcagtagtc actaacgttc gccagccata 60
agtcctcgac gtggagaggc tcagagcctg gcatgaacat gacctgaat tcggatgcag 120
agcttcttcc catgatgac tgccctcac agcagggctt tctctgtttc agggcatgaa 180
ctacttggag gaccgtcgct tgggtcaccg cgacctggca gccaggaacg tactggtgaa 240
aacaccgcag catgtcaaga tcacagattt tgggcgggcc aaactgctgg gtgcggaaga 300
gaaagaatac catgcagaag gaggcaaagt aaggaggtgg ctttaggtca gccagcattt 360
tcctgacacc agggaccagg ctgccttccc actagctgta ttgtttaaca catgcagggg 420
aggatgctct ccagacattc tgggtgagct cgcagcagct gctgctggca gctgggtcca 480
gccaggtct cctggtagtg 500

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de amplificación específica de alelo de una variante de una secuencia diana, existiendo la diana en forma de varias secuencias variantes, comprendiendo el procedimiento:
- 10 (a) hibridar un primer y un segundo oligonucleótido con al menos una variante de la secuencia diana; en el que el primer oligonucleótido es al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y el segundo oligonucleótido es al menos parcialmente complementario de una o más variantes de la secuencia diana y tiene al menos un nucleótido selectivo complementario de una única variante de la secuencia diana en el nucleótido del extremo 3'; en el que dicho segundo oligonucleótido incorpora al menos una 9-(aminoetoxi)fenoxazin-2'-desoxicitidina en una posición 1, 2 o 3 nucleótidos en dirección 5' del nucleótido del extremo 3';
- 15 (b) extender el segundo oligonucleótido con una ácido nucleico polimerasa, en el que dicha polimerasa es capaz de extender dicho segundo oligonucleótido de manera eficiente cuando dicho segundo oligonucleótido hibrida con una variante de la secuencia diana que es complementaria de al menos un nucleótido selectivo, y de manera sustancialmente menos eficiente cuando dicho segundo oligonucleótido hibrida con una variante de la secuencia diana que no es complementaria de al menos un nucleótido selectivo.
- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además una etapa (c) de detección del producto de extensión del cebador en la etapa (b).
- 25 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha ácido nucleico polimerasa se selecciona de un grupo que consiste en ADN polimerasa Taq, ADN polimerasa Z05, ADN polimerasa Δ Z05 y ADN polimerasa Δ Z05-Gold.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha ácido nucleico polimerasa posee actividad nucleasa 3'-5'.
- 30 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicha ácido nucleico polimerasa se selecciona de un grupo que consiste en ADN polimerasa Pfu y Thermatoga Maritima.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha variante de la secuencia de la etapa (a) es una mutación del gen de PIK3CA o de EGFR humano.
- 35 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho segundo oligonucleótido se selecciona de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6 y 7.

FIGURA 1

A



B

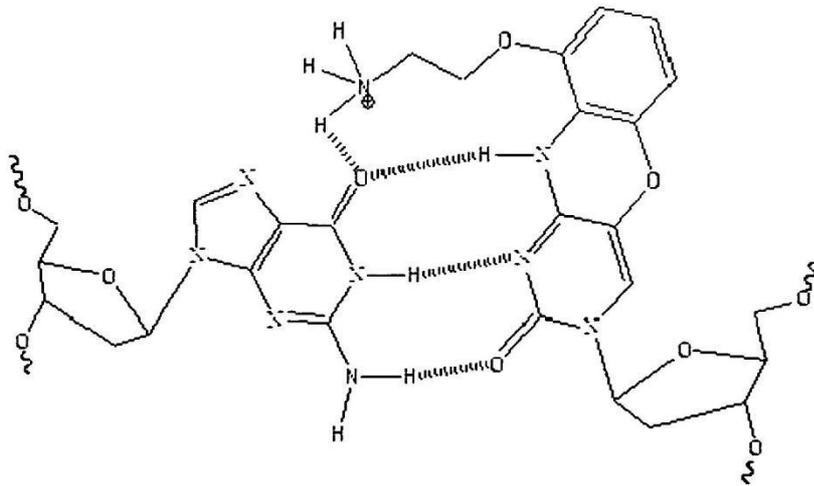


FIGURA 2A

1 ATGCGACCCCTCCGGGACGGCCGGGGCAGCGCTCCTGGCGCTGCTGGCTGCGCTCTGCCCCG
 61 GCGAGTCGGGCTCTGGAGGAAAAGAAAGTTTGCCAAGGCACGAGTAACAAGCTCACGCAG
 121 TTGGGCACTTTTGAAGATCATTTTCTCAGCCTCCAGAGGATGTTCAATAACTGTGAGGTG
 181 GTCCTTGGGAATTTGGAAATTACCTATGTGCAGAGGAATTATGATCTTTCCTTCTTAAAG
 241 ACCATCCAGGAGGTGGCTGGTTATGTCTCATTGCCCTCAACACAGTGGAGCGAATTCCT
 301 TTGGAACCTGCAGATCATCAGAGGAAATATGTACTACGAAAATTCTATGCCTTAGCA
 361 GTCTTATCTAACTATGATGCAAATAAAACCGGACTGAAGGAGCTGCCCATGAGAAATTTA
 421 CAGGAAATCCTGCATGGCGCCGTGCGGTTTCAGCAACAACCCCTGCCCTGTGCAACGTGGAG
 481 AGCATCCAGTGGCGGGACATAGTCAGCAGTGACTTTCTCAGCAACATGTTCGATGGACTTC
 541 CAGAACCACCTGGGCAGCTGCCAAAAGTGTGATCCAAGCTGTCCCAATGGGAGCTGCTGG
 601 GGTGCAGGAGAGGAGAACTGCCAGAACTGACCAAAATCATCTGTGCCCAGCAGTGCTCC
 661 GGGCGCTGCCGTGGCAAGTCCCCCAGTGACTGCTGCCACAACCAGTGTGCTGCAGGCTGC
 721 ACAGGCCCCCGGGAGAGCGACTGCCTGGTCTGCCGCAAATTCGAGACGAAGCCACGTGC
 781 AAGGACACCTGCCCCCACTCATGCTCTACAACCCACCACGTACCAGATGGATGTGAAC
 841 CCCGAGGGCAAATACAGCTTTGGTGCCACCTGCGTGAAGAAGTGTCCCCGTAATTATGTG
 901 GTGACAGATCACGGCTCGTGCCTCCGAGCCTGTGGGGCCGACAGCTATGAGATGGAGGAA
 961 GACGGCGTCCGCAAGTGTAAGAAGTGCGAAGGGCCTTGCCGCAAAGTGTGTAACGGAATA
 1021 GGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTTAAACACTTCAAA
 1081 AACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTITAGGGGTGACTCC
 1141 TTCACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAA
 1201 ATCACAGGGTTTTTGTGATTTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTT
 1261 GAGAACCTAGAAATCATAACGCGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTC
 1321 GTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGAT
 1381 GTGATAATTTTCAGGAAACAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACTG
 1441 TTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAG
 1501 GCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCC
 1561 AGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAAC

FIGURA 2B

1621 CTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCA
 1681 GAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACGTATC
 1741 CAGTGTGCCCCTACATTGACGGCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATG
 1801 GGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGC
 1861 CATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGG
 1921 CCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTG
 1981 GCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGCGAAGGCGCCACATCGTTCGGAAGCGCACGCTGCGG
 2041 AGGCTGCTGCAGGAGAGGGAGCTTGTGGAGCCTCTTACACCCAGTGGAGAAGCTCCCAAC
 2101 CAAGCTCTCTTGAGGATCTTGAAGGAAACTGAATTCAAAAAGATCAAAGTGCTGGGCTCC
 2161 GGTGCGTTCGGCACGGTGTATAAGGGACTCTGGATCCAGAAAGGTGAGAAAAGTTAAAAAT
 2221 CCCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATCCTC
 2281 GATGAAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCCGCTGCTGGGCATC
 2341 TGCCTCACCTCCACCGTGCAGCTCATCACGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCCTCCTGGAC
 2401 TATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGCTCCCAGTACCTGCTCAACTGGTGTGTGCAG
 2461 ATCGCAAAGGGCATGAACTACTTGGAGGACCGTCGCTTGGTGCACCCGCGACCTGGCAGCC
 2521 AGGAACGTACTGGTGAAAAACCCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCTGCAAA
 2581 CTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAGGCAAAGTGCCTATCAAGTGG
 2641 ATGGCATTGGAATCAATTTTACACAGAATCTATACCCACCAGAGTGATGTCTGGAGCTAC
 2701 GGGGTGACTGTTTGGGAGTTGATGACCTTTGGATCCAAGCCATATGACGGAATCCCTGCC
 2761 AGCGAGATCTCCTCCATCCTGGAGAAAGGAGAACGCCTCCCTCAGCCACCCATATGTACC
 2821 ATCGATGTCTACATGATCATGGTCAAGTGTCTGGATGATAGACGCAGATAGTCGCCCCAAAG
 2881 TTCCGTGAGTTGATCATCGAATTTCTCCAAAATGGCCCGAGACCCCAGCGCTACCTTGTC
 2941 ATTCAGGGGGATGAAAGAATGCATTTGCCAAGTCCTACAGACTCCAACCTTCTACCGTGCC
 3001 CTGATGGATGAAGAAGACATGGACGACGTGGTGGATGCCGACGAGTACCTCATCCCACAG
 3061 CAGGGCTTCTTCAGCAGCCCCCTCCACGTACGGACTCCCCTCCTGAGCTCTCTGAGTGCA
 3121 ACCAGCAACAATTCACCGTGGCTTGCATTGATAGAAATGGGCTGCAAAGCTGTCCCATC
 3181 AAGGAAGACAGCTTCTTGCAGCGATACAGCTCAGACCCACAGGCGCCTTGACTGAGGAC

FIGURA 2C

3241 AGCATAGACGACACCTTCCTCCCAGTGCCTGAATACATAAAACCAGTCCGTTCCCAAAGG
3301 CCCGCTGGCTCTGTGCAGAAATCCTGTCTATCACAATCAGCCTCTGAACCCCGCGCCCAGC
3361 AGAGACCCACACTACCAGGACCCCCACAGCACTGCAGTGGGCAACCCCGAGTATCTCAAC
3421 ACTGTCCAGCCCACCTGTGTCAACAGCACATTCGACAGCCCTGCCCACTGGGCCAGAAA
3481 GGCAGCCACCAAATTAGCCTGGACAACCCTGACTACCAGCAGGACTTCTTTCCCAAGGAA
3541 GCCAAGCCAAATGGCATCTTTAAGGGCTCCACAGCTGAAAATGCAGAATACCTAAGGGTC
3601 GCGCCACAAAGCAGTGAATTTATTGGAGCATGA