

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 167**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/34** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**C07H 21/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2002 PCT/US2002/33012**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2003 WO03034029**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2002 E 02801745 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 1463825**

54 Título: **Análisis multiplexado de loci polimórficos mediante consulta simultánea y detección mediada por enzimas**

30 Prioridad:

**15.10.2001 US 329427 P**

**15.10.2001 US 329428 P**

**15.10.2001 US 329619 P**

**15.10.2001 US 329620 P**

**14.03.2002 US 364416 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.03.2018**

73 Titular/es:

**BIOARRAY SOLUTIONS LTD. (100.0%)  
35 TECHNOLOGY DRIVE, SUITE 100  
WARREN, NEW JERSEY 07059, US**

72 Inventor/es:

**LI, ALICE, XIANG;  
HASHMI, GHAZALA y  
SEUL, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 661 167 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**

Análisis multiplexado de loci polimórficos mediante consulta simultánea y detección mediada por enzimas

**5 Campo de la invención**

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional estadounidense con n.º de serie 60/329 427 presentada el 14 de octubre de 2001, la solicitud provisional estadounidense con n.º de serie 60/329 620, presentada el 15 de octubre de 2001, la solicitud provisional estadounidense con n.º de serie 60/329 428, presentada el 14 de octubre de 2001 y la solicitud provisional estadounidense con n.º de serie 60/329 619 presentada el 15 de octubre de 2001.

**Campo de la invención**

15 La presente invención se refiere en general a diagnósticos moleculares y tipificación o perfilado genético. La invención se refiere a métodos, procedimientos y sondas para el análisis multiplexado de genes altamente polimórficos. La invención también se refiere a la tipificación y el perfilado moleculares del complejo génico antígeno leucocitario humano (HLA) y el gen del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y a composiciones, métodos y diseños relacionados con ello.

**20 Antecedentes de la invención**

La capacidad para analizar de manera eficaz, rápida e inequívoca polimorfismos en las secuencias de ácido nucleico de un gen de interés desempeña un papel importante en el desarrollo de ensayos de diagnóstico molecular, cuyas aplicaciones incluyen pruebas genéticas, exámenes de portadores, genotipado o perfilado genético y pruebas de identidad. Por ejemplo, el objetivo de las pruebas genéticas y los exámenes de portadores es determinar si están presentes mutaciones asociadas con una enfermedad particular en un gen de interés. El análisis de loci polimórficos, comprendan o no estas mutaciones que se sabe que producen enfermedad, generalmente proporciona un beneficio clínico, como por ejemplo en el contexto del genotipado farmacogenómico o en el contexto de la tipificación molecular de HLA, en el que se determina el grado de coincidencia de alelos en los loci de HLA del donante y el posible receptor del trasplante en el contexto del trasplante de tejido alogénico y médula ósea.

El análisis multiplexado de polimorfismos, aunque deseable para facilitar el análisis de un alto volumen de muestras de pacientes, se enfrenta a un nivel considerable de complejidad que aumentará probablemente a medida que se identifiquen y deban incluirse en el análisis nuevos polimorfismos, marcadores genéticos y mutaciones. Las limitaciones de los métodos actuales para manejar esta complejidad en un formato multiplexado de análisis para garantizar el rendimiento fiable del ensayo a la vez que se alberga a un alto volumen de muestra, y la necesidad consiguiente de métodos nuevos de análisis multiplexado de polimorfismos y mutaciones es el objeto de la presente invención. A modo de ejemplo, se analizan los loci genéticos que codifican para el canal de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y los antígenos leucocitarios humanos (HLA) mediante los métodos de la invención. La fibrosis quística (CF) es uno de los trastornos recesivos más comunes en personas de raza blanca con una tasa de aparición en los EE. UU. de 1 en 2000 nacimientos vivos. Aproximadamente el 4 % de la población porta una de las mutaciones de la CF. El gen de CFTR es altamente variable: se han identificado más de 900 mutaciones hasta la fecha (véase <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). La caracterización del gen de CFTR proporciona la clave del diagnóstico molecular de la CF facilitando el desarrollo de sondas específicas de secuencia (Rommens et al., 1989; Riordan, et al., 1989; Kerem et al, 1989). La conferencia de desarrollo consenso patrocinada por los institutos nacionales de la salud (NIH) recomendó el estudio de portadores para mutaciones de CFTR para adultos con una historia familiar positiva de CF (NIH 1997). El comité sobre el examen de portadores del American College of Medical Genetics (ACMG) ha recomendado el uso en el examen de portadores de población general de un panel de mutaciones panétnicas que incluye un conjunto de 25 mutaciones de CF que producen enfermedad con una frecuencia alélica de >0,1% en la población general de los Estados Unidos (véase <http://www.faseb.org/genetics/acmg>). Las mutaciones en el panel de ACMG también incluyen las mutaciones más comunes en las poblaciones judía asquenazí y afroamericana.

55 Se han descrito varios métodos para la detección de mutaciones de CFTR incluyendo los siguientes: electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (Devoto et al., 1991); análisis de polimorfismo en la conformación de cadenas sencillas (Pliet et al., 1992); RFLP (Friedman et al., 1991); amplificación con cebadores específicos de alelo (ASP) (Gremonesi et al., 1992), y estudio con sonda con oligonucleótidos específicos de alelo (ASO) (Saiki et al., 1986). Un método ampliamente usado amplificación por PCR seguida por transferencia de las cadenas diana amplificadas a una membrana y el estudio con sonda de las cadenas con oligonucleótidos diseñados para coincidir o bien con la configuración normal ("de tipo natural") o bien con la mutante. Específicamente, se ha usado PCR multiplex conjuntamente con hibridación de ASO en este formato de transferencia puntual para examinar 12 mutaciones en la CF (Shuber et al., 1993). En varios casos, se usaron alineamientos de sondas de oligonucleótidos inmovilizadas a sustrato para facilitar la detección de variaciones de secuencias de ADN genómico conocidas (Saiki, RK et al., 1989) en un formato de "transferencia puntual inversa". Se usó un alineamiento de oligonucleótidos cortos sintetizados *in situ* mediante procedimientos fotolitográficos para detectar mutaciones conocidas en la región

codificante del gen de CFTR (Cronin, MT., et al., 1996). Se ha notificado la extensión de cebador usando transcriptasa inversa como método para detectar la mutación  $\Delta 508$  en CFTR (Pastinen, T., 2000). Este enfoque se describió ya tan pronto como en 1989 (Wu, D. Y. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:2757-2760 (1989), Newton, C. R. et al, Nuclei Acid Res. 17:2503-2506 (1989)). Tal como se comenta adicionalmente a continuación en el presente documento, aunque proporcionan detección razonable en un entorno de laboratorio de investigación, estos métodos requieren trabajo significativo, solo proporcionan una respuesta lenta, solo ofrecen baja producción de muestra y por tanto, requieren un alto coste por muestra.

En relación con los microalineamientos por manchas, se han descrito varios métodos de obtención de manchas, junto con muchos materiales de sustrato y métodos de inmovilización de sondas. Sin embargo, los alineamientos por manchas de los métodos actuales no solo muestran variabilidad significativa de un alineamiento a otro, sino también variabilidad significativa de una mancha a otra, un aspecto que conduce a limitaciones en la fiabilidad y la sensibilidad del ensayo. Además, los alineamientos por manchas son difíciles de miniaturizar más allá de sus dimensiones de mancha actuales normalmente de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro sobre centros de 500  $\mu\text{m}$ , aumentando de ese modo los volúmenes de muestra totales y contribuyendo a cinéticas de ensayo lentas que limitan el rendimiento de los ensayos de hibridación, cuya realización en alineamientos por manchas puede requerir hasta 18 horas. Además, el uso de alineamientos por manchas implica la lectura a través de un aparato de exploración láser confocal altamente especializado. En un enfoque alternativo, se han descrito alineamientos de oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante un procedimiento fotolitográfico. Sin embargo, la complejidad de la fabricación de alineamientos limita la adaptación de rutina y combina un gasto considerable con la falta de flexibilidad para aplicaciones de diagnóstico.

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) incluye el complejo génico antígeno leucocitario humano (HLA), ubicado en el brazo corto del cromosoma humano seis. Esta región codifica para proteínas de la superficie celular que regulan las interacciones célula-célula que subyacen a la respuesta inmunitaria. Los diversos loci de clase I del HLA codifican para polipéptidos de 44 000 dalton que se asocian con  $\beta$ -2 microglobulina en la superficie celular y median el reconocimiento de las células diana por linfocitos T citotóxicos. Los loci de clase II del HLA codifican para heterodímeros de la superficie celular, compuestos por un polipéptido de 29 000 dalton y uno de 34 000 que median el reconocimiento de las células diana por linfocitos T cooperadores. Los antígenos HLA, al presentar péptidos patógenos extraños a las células T en el contexto de una proteína "propia", median el inicio de una respuesta inmunitaria. Por consiguiente, es deseable un gran repertorio de péptidos porque aumenta el potencial de respuesta inmunitaria en el huésped. Por otra parte, el alto grado correspondiente de polimorfismo inmunogenético representa dificultades significativas en alotrasplante, representando una falta de coincidencia en loci de HLA una de las principales causas del rechazo de aloinjertos. El grado de coincidencia alélica en los loci de HLA de un donante y el posible receptor es un factor principal en el éxito del trasplante de tejido alogénico y médula ósea. Los loci de HLA-A, HLA-B y HLA-C de la región de clase I de HLA así como los loci de HLA-DRB, HLA-DQB, HLA-DQA, HLA-DPB y HLA-DPA de la región de clase II de HLA muestran un grado extremadamente alto de polimorfismo. Hasta la fecha, el comité de nomenclatura de la OMS para factores del sistema de HLA ha designado 225 alelos de HLA A (HLA A\*0101, A\*0201, etc.), 444 alelos de HLA-B, y 111 alelos de HLA-C, 358 alelos HLA-DRB, 22 alelos HLA-DQA, 47 alelos HLA-DQB, 20 alelos HLA-DPA y 96 alelos HLA-DPB (véase la base de datos de secuencias IMGT/HLA, <http://www3.ebi.ac.uk:80/imgt/hla/index.html>) y Schreuder, G.M.Th. et al, Tissue Antigens. 54:409-437 (1999).

La tipificación de HLA es un procedimiento de rutina que se usa para determinar el perfil inmunogenético de donantes de trasplante. El objetivo de la tipificación de HLA es la determinación de la configuración alélica del paciente en el nivel necesario de resolución, basándose en el análisis de un conjunto de polimorfismos designados dentro del locus genético de interés. Cada vez más, la tipificación molecular del HLA es el método de elección con respecto a la tipificación serológica tradicional, porque elimina la necesidad de células viables, ofrece una resolución alélica superior y amplía la tipificación de HLA a la clase II para la que la serología no ha sido adecuada (Erich, H. A. et al, Immunity. 14:347-356 (2001)).

Un método aplicado actualmente para la tipificación de HLA clínica usa la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) conjuntamente con sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia (SSO o SSOP), que se permite que se hibriden con secuencias diana amplificadas para producir un patrón como base para la tipificación de HLA.

La disponibilidad de información de secuencia para todos los alelos de HLA disponibles ha permitido el diseño de oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) y oligonucleótidos específicos de alelo (ASO) para la caracterización de polimorfismos de HLA conocidos, así como para la secuenciación mediante hibridación (Saiki, R.K. Nature 324:163-166 (1986), Cao, K. et al, Rev Immunogenetics, 1999: 1: 177-208).

En una realización del análisis de SSO, también denominado "formato de transferencia puntual", se extraen muestras de ADN de pacientes, se amplifican y se someten a transferencia sobre un conjunto de membranas de nailon en un formato de rejilla de 8 x 12. Se añade una sonda oligonucleotídica radiomarcada a cada mancha en cada una de estas membranas; tras la hibridación, se inspeccionan las manchas mediante autorradiografía y se puntúan como positivas (1) o como negativas (0). Para cada muestra de paciente, la serie de unos y ceros construida a partir del análisis de todas las membranas define la configuración alélica. Un formato multiplexado de análisis de SSO en el "formato de transferencia puntual inversa" emplea conjuntos de sondas oligonucleotídicas

inmovilizadas sobre soportes planos (Saiki, R. et al, Immunological Rev. 167: 193-199 (1989), Erlich, H. A. Eur. J. Immunogenet. 18: 33-55 (1991)).

5 Otro método de tipificación de HLA usa la elongación catalizada por polimerasa de cebadores específicos de  
secuencia (SSP) para discriminar entre alelos. La alta especificidad de la ADN polimerasa generalmente dota a este  
método de especificidad superior. En el método de SSP, se realiza amplificación por PCR con un par de cebadores  
específico para cada motivo o par de motivos de secuencia polimórfica y una ADN polimerasa que carece de  
actividad exonucleasa 3' -> 5', de modo que la elongación (y por tanto la amplificación) se produce solo para aquel  
10 cebador cuyo extremo 3' es perfectamente complementario ("coincide") con el molde. La presencia del producto de  
PCR correspondiente se determina mediante análisis electroforético en gel. Un ejemplo de un locus altamente  
polimórfico es el fragmento de ADN de 280 nt del gen DR de clase II de HLA que presenta una alta incidencia de  
polimorfismos

15 Se ha desarrollado la tipificación de HLA basándose en el uso de sondas específicas de secuencia (SSP), también  
denominada fototipificación (Dupont, B. Tissue Antigens. 46: 353-354 (1995)), como tecnología comercial que se usa  
de manera rutinaria para la tipificación de la clase I y la clase II (Bunce, M. et al, Tissue Antigens. 46:355-367 (1995),  
Krausa, P y Browning, M.J., Tissue Antigens. 47: 237-244 (1996), Bunce, M. et al, Tissue Antigens. 45:81-90  
(1995)). Sin embargo, la necesidad de los métodos de SSP de la técnica anterior de un análisis electroforético en gel  
extenso para la detección individual de amplicones representa un impedimento significativo a la implementación de  
20 formatos de ensayo multiplexado que pueden lograr alta producción. Esta desventaja se supera mediante los  
métodos de la presente invención.

En el contexto de las reacciones de elongación, los loci altamente polimórficos y el efecto de sitios polimórficos no  
designados como polimorfismos de interferencia no se consideraron en las aplicaciones anteriores, especialmente  
25 en el formato multiplexado. Por tanto, existe la necesidad de proporcionar métodos, composiciones y procedimientos  
para el análisis multiplexado de loci polimórficos que permitan la detección de sitios designados a la vez que se  
alberga la presencia de sitios no designados sin interferencia de tales sitios no designados.

### 30 Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos y procedimientos para la consulta simultánea de múltiples sitios  
polimórficos designados en presencia de sitios polimórficos no designados y sin interferencia de tales sitios no  
designados. Se proporcionan conjuntos de sondas que facilitan una consulta simultánea de este tipo. La presente  
invención también proporciona métodos, procedimientos y sondas para la identificación de polimorfismos del  
35 complejo génico de HLA y el gen de CFTR.

La especificidad de los métodos de detección que usan extensión o elongación de sonda es intrínsecamente  
superior a la de los métodos que usan hibridación, particularmente en un formato multiplexado, porque la  
discriminación de configuraciones de secuencia ya no depende de la hibridación diferencial, sino de la fidelidad del  
40 reconocimiento enzimático. Hasta la fecha, la inmensa mayoría de aplicaciones de análisis mediado por enzimas  
usa una extensión de sonda de una sola base. Sin embargo, la elongación de sonda, en analogía a la usada en el  
método de tipificación de HLA mediante SSP, ofrece varias ventajas para el análisis multiplexado de polimorfismos,  
tal como se divulga en el presente documento. Por tanto, los polimorfismos de un solo nucleótido así como los  
de múltiples nucleótidos se albergan fácilmente. El método, tal como se describe en el presente documento, se pone en  
45 práctica en general con detección de marcador único, se alberga una consulta simultánea así como consecutiva de  
loci polimórficos e incorpora complejidad en el diseño de sonda.

Un aspecto de esta invención proporciona un método de determinación simultánea de la composición de nucleótidos  
en sitios polimórficos designados ubicados dentro de una o más secuencias de nucleótidos diana. Este método  
50 comprende las etapas siguientes: (a) proporcionar uno o más conjuntos de sondas, siendo cada sonda capaz de  
aparearse con una subsecuencia de la una o más secuencias de nucleótidos diana ubicadas dentro de un intervalo  
de proximidad a un sitio polimórfico designado; (b) poner en contacto el conjunto de sondas con la una o más  
secuencias de nucleótidos diana para permitir la formación de complejos de hibridación colocando un sitio de  
consulta dentro de una secuencia de sonda en alineación directa con el sitio polimórfico designado; (c) para cada  
55 complejo de hibridación, determinar la presencia de una coincidencia o una falta de coincidencia entre el sitio de  
consulta y un sitio polimórfico designado; y (d) determinar la composición del sitio polimórfico designado.

Otro aspecto de esta invención es proporcionar un método de amplificación específica de secuencia de señales de  
ensayo producidas en el análisis de una secuencia de ácido nucleico de interés en una muestra biológica. Este  
60 método comprende las etapas siguientes: (a) proporcionar un conjunto de sondas inmovilizadas capaces de formar  
un complejo de hibridación con la secuencia de interés; (b) poner en contacto dicho conjunto de sondas  
inmovilizadas con la muestra biológica que contiene la secuencia de interés en condiciones que permiten que la  
secuencia de interés se aparee con al menos una de las sondas inmovilizadas para formar un complejo de  
hibridación; (c) poner en contacto el complejo de hibridación con una polimerasa para permitir la elongación o  
65 extensión de las sondas contenidas dentro del complejo de hibridación; (d) convertir la elongación o extensión de las  
sondas en una señal óptica; y (e) registrar la señal óptica del conjunto de sondas inmovilizadas en tiempo real.

5 Aún otro aspecto de esta invención es proporcionar un método de formación de un conjunto de sondas de cobertura para la consulta simultánea de un sitio polimórfico designado ubicado en una o más secuencias de ácido nucleico diana. Este método comprende las etapas de: (a) determinar la secuencia de una sonda de elongación capaz de alineación del sitio de consulta de la sonda con un sitio polimórfico designado; (b) determinar adicionalmente un conjunto completo de sondas degeneradas para albergar todos los sitios polimórficos no designados así como no designados seleccionados a la vez que se mantiene la alineación del sitio de consulta de la sonda con el sitio polimórfico designado; y (c) reducir el grado de degeneración retirando todos los polimorfismos tolerados.

10 Un aspecto de esta invención es proporcionar un método para identificar polimorfismos en uno o más sitios designados dentro de una secuencia de polinucleótido diana. Este método comprende las etapas siguientes: (a) proporcionar una o más sondas capaces de consultar dichos sitios designados; (b) asignar un valor a cada uno de tales sitios designados a la vez que se albergan sitios polimórficos no designados ubicados dentro de un intervalo de proximidad a cada uno de tales polimorfismos.

15 Otro aspecto de esta invención es proporcionar un método para determinar un polimorfismo en uno o más sitios designados en una secuencia de polinucleótido diana. Este método comprende proporcionar un conjunto de sondas para los sitios designados y agrupar el conjunto de sondas en diferentes subconjuntos de sondas según la iniciación de elongación terminal de cada sonda.

20 Otro aspecto de esta invención es proporcionar un método para la consulta simultánea de una multiplicidad de sitios polimórficos que comprende la etapa de realizar un ensayo de elongación multiplexada aplicando uno o más ciclos de temperatura para lograr la amplificación lineal de tal diana.

25 Aún otro aspecto de esta invención es proporcionar un método para la consulta simultánea de una multiplicidad de sitios polimórficos. Este método comprende la etapa de realizar un ensayo de elongación multiplexada aplicando una combinación de etapas de apareamiento y elongación en condiciones de temperatura controlada.

30 Otro aspecto de esta invención es proporcionar un método de consulta simultánea de una composición de nucleótidos en S sitios polimórficos,  $PS = \{c P(s); 1 \leq s \leq S\}$  ubicados dentro de una o más secuencias diana contiguas, asignando dicho método a cada cP uno de un conjunto limitado de posibles valores realizando las etapas siguientes: (a) proporcionar un conjunto de sondas oligonucleotídicas inmovilizadas designadas, también conocidas como sondas de elongación, siendo cada sonda capaz de aparearse en una alineación preferida con una subsecuencia de la diana ubicada proximal a un sitio polimórfico designado, colocando la alineación preferida un sitio de consulta dentro de la secuencia de sonda en yuxtaposición directa con el sitio polimórfico designado, conteniendo las sondas además una región de iniciación de elongación terminal (TEI) capaz de iniciar una reacción de elongación o extensión; (b) permitir que una o más secuencias diana se apareen con el conjunto de sondas oligonucleotídicas inmovilizadas para formar complejos de hibridación sonda-diana; y (c) para cada complejo de hibridación sonda-diana, indicar una coincidencia o una falta de coincidencia en la composición entre el sitio de consulta y el sitio polimórfico designado correspondiente.

**La invención proporciona:**

45 1. Un método de determinación simultánea de la composición de nucleótidos en sitios polimórficos designados ubicados dentro de una o más secuencias de nucleótidos diana, comprendiendo dichas secuencias de nucleótidos diana un polimorfismo no designado, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

50 (a) proporcionar un conjunto de pares de cebadores oligonucleotídicos, siendo capaz cada par de aparearse con cadenas de polinucleótidos complementarias para delinear una región de la diana correspondiente que incluye al menos un sitio polimórfico designado;

55 (b) poner en contacto dicho conjunto de cebadores oligonucleotídicos con dichas dianas en condiciones que permiten la formación de amplicones con sitios polimórficos designados correspondientes a los sitios polimórficos designados en dianas correspondientes, comprendiendo cada amplicón una cadena sentido de amplicón correspondiente a una cadena sentido diana y una cadena antisentido de amplicón correspondiente a una cadena antisentido diana;

60 (c) proporcionar uno o más conjuntos de sondas degeneradas, en el que el conjunto contiene sondas degeneradas capaces de aparearse con una subsecuencia de dicha una o más secuencias de cadena sentido y cadena antisentido de amplicón ubicadas dentro de un intervalo de proximidad a un sitio polimórfico designado en la cadena sentido o antisentido;

65 (d) poner en contacto el conjunto de sondas con dicha una o más secuencias de nucleótidos de amplicón para permitir la formación de complejos de hibridación colocando un sitio de consulta dentro de una secuencia de sonda en alineación directa con el sitio polimórfico designado en la cadena sentido y antisentido;

(e) incubar cada complejo de hibridación con una ADN polimerasa capaz de extender las sondas dentro del complejo:

5 (i) determinar la presencia de una coincidencia entre el sitio de consulta y un sitio polimórfico designado mediante elongación de sonda; y

(ii) determinar la presencia de una falta de coincidencia entre el sitio de consulta y un sitio polimórfico designado por la falta de elongación de sonda; determinando de ese modo la composición del sitio polimórfico designado;

10 en el que el uno o más conjuntos de sondas se inmovilizan sobre micropartículas codificadas, ensamblándose las micropartículas codificadas en un alineamiento codificado al azar.

2. El método de la realización 1, en el que la etapa (e) comprende añadir uno o más desoxinucleótidos trifosfato.

15 3. El método de la realización 2, en el que la polimerasa carece de actividad exonucleasa 3' -> 5'.

4. El método de la realización 2, en el que se marca al menos uno de los desoxinucleótidos trifosfato para generar una firma detectable ópticamente asociada con el producto de elongación.

20 5. El método de la realización 1, en el que se une un marcador óptico a una o más sondas apareando con las sondas una diana marcada de manera fluorescente para formar un complejo de hibridación fluorescente.

25 6. El método de la realización 5, que comprende además identificar productos de elongación detectando la estabilidad de firmas ópticas en condiciones en las que la temperatura se fija a un valor por encima de la temperatura de fusión de cualquier complejo hibridación formado por sonda no coincidente y diana pero por debajo de la temperatura de fusión de cualquier complejo de hibridación extendido formado por sonda elongada y diana.

7. El método de la realización 1, en el que los alineamientos se disponen de una manera codificada espacialmente.

30 8. El método de la realización 5, en el que se detecta el cambio en la firma óptica y se determina la identidad de partículas.

Otros objetos, características y ventajas de la invención se entenderán más claramente cuando se tomen junto con la siguiente descripción detallada de una realización que se tenderá que es únicamente ilustrativa.

35 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1a es una ilustración de conjuntos de sondas diseñados para consultar sitios designados en HLA-DR, y un control interno.

40 La figura 1b es una ilustración de un diseño de cebador escalonado.

La figura 2 es una ilustración de una modificación de patrón de unión de alelo basándose en el efecto de tolerancia.

45 La figura 3 es una ilustración del uso de estructura de cebador unida para separar la secuencia de anclaje y la secuencia de detección de polimorfismo.

La figura 4 muestra ambigüedad simulada en la identificación de alelos debido a la combinación de alelos.

50 La figura 5 muestra un método para disminuir la ambigüedad en la identificación de alelos que surge de la combinación de alelos.

La figura 6 es una ilustración de una combinación de hibridación y elongación.

55 La figura 7 muestra una reacción modelo usando oligonucleótidos sintéticos como dianas.

La figura 8 muestra los resultados obtenidos usando pruebas de muestras de pacientes reales en un formato eMAP.

60 La figura 9 muestra los resultados obtenidos a partir de extensión de cebador mediante eMAP para el locus DR.

La figura 10 muestra los resultados obtenidos a partir de eMAP para el locus DR.

La figura 11 muestra los resultados obtenidos a partir de eMAP para el exón 3 del locus A.

65 La figura 12 muestra los resultados obtenidos a partir de eMAP SSP para el exón 3 del locus A y es un ejemplo de tolerancia para el polimorfismo no designado.

La figura 13 es una ilustración de elongación de sonda inmovilizada por perlas de sitios mutantes variables.

La figura 14 es una ilustración de PCR usando cebadores inmovilizados sobre la superficie de perlas.

La figura 15 es una ilustración de elongación de múltiples sondas usando productos de PCR combinados.

La figura 16 es una ilustración de resultados para la elongación de sonda de una mutación de CF multiplexada. La figura 16a es una ilustración de elongación de sonda usando una diana sintética. La figura 16b es una ilustración de elongación de sonda usando perlas en una reacción de PCR.

La figura 17 es una ilustración de una elongación de una etapa con resultados de ciclación a temperatura controlada.

La figura 18 es una ilustración de elongación de cebador con dNTP marcado y otros tres dNTP no marcados.

La figura 19 es una ilustración de elongación de cebador con ddNTP marcado y otros tres dNTP no marcados.

La figura 20 es una ilustración de elongación de cebador, donde se usan cuatro dNTP no marcados para la elongación y el producto se detecta mediante una sonda oligonucleotídica marcada que se hibrida con el producto no marcado extendido.

La figura 21 es una ilustración de una extensión de cebador en la que se añaden una diana marcada y cuatro dNTP no marcados. Esta ilustración que muestra que solo con el producto extendido puede retenerse la diana marcada con las perlas cuando se aplica alta temperatura al chip.

La figura 22 es una ilustración de amplificación lineal donde se inmovilizan sondas específicas de secuencia.

La figura 23 es una ilustración de la utilización de sondas de horquilla.

La figura 24 es una ilustración de la aplicación de esta invención al análisis de mutaciones de enfermedad de judíos asquenazíes y fibrosis quística.

### Descripción detallada de la invención

Esta divulgación proporciona composiciones, métodos y diseños para el análisis multiplexado de loci altamente polimórficos; es decir, loci que presentan una alta densidad de sitios polimórficos específicos ("designados"), así como sitios polimórficos no designados de interferencia. Por tanto, el análisis multiplexado de tales sitios implica generalmente solapamiento en las secuencias de sondas dirigidas a sitios adyacentes en la misma diana, de manera que sondas diseñadas para cualquier sitio específico o designado generalmente también cubrirán sitios polimórficos vecinos. No se ha abordado la interferencia en el análisis de genes importantes incluyendo CFTR y HLA en la técnica anterior. Para ejemplificar los métodos de la invención, se analizan el complejo génico de HLA y el gen de CFTR.

La presente divulgación proporciona composiciones y métodos para el análisis paralelo o multiplexado de polimorfismos ("MAP") en secuencias de ácido nucleico que presentan una alta densidad de sitios polimórficos. En una secuencia de ácido nucleico dada, cada sitio polimórfico comprende una diferencia que comprende uno o más nucleótidos.

Esta invención proporciona métodos y composiciones para la consulta simultánea de un conjunto entero de polimorfismos designados dentro de una secuencia de ácido nucleico. Esta invención proporciona composiciones, métodos y diseños para determinar la composición en cada uno de tales sitios y proporcionar de ese modo la información necesaria para seleccionar, a partir del conjunto de posibles configuraciones para la secuencia de interés, la configuración real en una muestra específica dada. La invención también sirve para reducir el conjunto de posibles secuencias en esa muestra. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, será útil o necesario determinar la composición de secuencia signando a un sitio designado uno de los posibles valores correspondientes a la identidad del nucleótido. En otras realizaciones, será suficiente determinar si la composición del sitio es o bien coincidente o bien no coincidente con una secuencia de referencia conocida, como en la asignación de "tipo natural" o "mutación" en el contexto del análisis de mutaciones. La capacidad de determinación de secuencia proporcionada de ese modo se denomina en el presente documento secuenciación de confirmación o nueva secuenciación. En una realización preferida, la presente invención proporciona el análisis multiplexado de polimorfismos mediado por elongación (eMAP) del gen del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y para el complejo génico antígeno leucocitario humano (HLA).

Los métodos y las composiciones de esta invención son útiles para mejorar la fiabilidad y la exactitud del análisis de polimorfismos de regiones diana que contienen sitios polimórficos además de los sitios polimórficos designados para la consulta. Estos sitios no designados representan una fuente de interferencia en el análisis. Dependiendo de las

aplicaciones específicas del ensayo, pueden designarse una o más sondas de composición diferente para el mismo sitio polimórfico, tal como se elabora en varios ejemplos facilitados en el presente documento. Un objetivo específico de la presente invención es proporcionar composiciones y métodos para el análisis eficaz, rápido e inequívoco de polimorfismos en genes de interés. Este análisis es útil en ensayos de diagnóstico molecular, tales como los diseñados, por ejemplo, para pruebas genéticas, exámenes de portador, genotipado o perfilado genético, pruebas de identidad, pruebas de paternidad y pruebas forenses.

La preparación de secuencias diana puede llevarse a cabo usando métodos conocidos en la técnica. En un ejemplo no limitativo, se obtiene una muestra de células o tejido de un paciente. Entonces se amplifican las regiones de ácido nucleico que contienen secuencias diana (por ejemplo, los exones 2 y 3 de HLA) usando técnicas convencionales tales como PCR (por ejemplo, PCR asimétrica).

Las sondas para detectar sitios polimórficos funcionan como el punto de inicio de una reacción de elongación catalizada por polimerasa cuando la composición de un sitio polimórfico que está analizándose es complementaria ("coincide") con la del sitio alineado en la sonda. Generalmente, las sondas de la invención deben ser suficientemente largas para evitar el apareamiento con secuencias diana de ADN no relacionadas. En determinadas realizaciones, la longitud de la sonda puede ser de aproximadamente 10 a 50 bases, más preferiblemente de aproximadamente 15 a 25, y más preferiblemente de 18 a 20 bases. Las sondas pueden inmovilizarse sobre los soportes sólidos a través de restos de ligador usando métodos y composiciones bien conocidos en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" u "oligonucleótido" se refiere a ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico en forma mono o bicatenaria. El término también cubre estructuras similares a ácido nucleico con estructuras principales sintéticas. Los análogos de estructuras principales de ADN incluyen fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidato, alquilfosfotriéster, sulfamato, 3'-tiocetal, metil(metilimino), 3'-N-carbamato, carbamato de morfolino y ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Véase *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach* (editor: F. Eckstein), IRL Press at Oxford University Press (1991); *Antisense Strategies, Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 600, Eds.; Baserga y Denhardt (NYAS 1992); Milligan, *J. Med. Chem.*, vol. 36, págs. 1923-1937; *Antisense Research and Applications* (1993, CRC Press). Los PNA contienen estructuras principales no iónicas, tales como unidades de N-2(2-aminoetil)glicina. Se describen uniones de fosforotioato en los documentos WO 97/03211; WO 96/39159; y Mata, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144: 189-197 (1997). Otras estructuras principales sintéticas englobadas por el término incluyen uniones de metilfosfonato o uniones alternas de metilfosfonato y fosfodiéster (Strauss-Soukup, *Biochemistry*, 36: 8692-8698 (1997), y uniones de bencilfosfonato (Samstag, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 6: 153-156 (1996)). El término ácido nucleico incluye genes, ADNc y ARNm.

Tal como se usa en el presente documento, el término "hibridación" se refiere a la unión, duplexación o hibridación de una molécula de ácido nucleico preferentemente con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas. El término "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones en las que una sonda se hibridará preferentemente con la secuencia diana correspondiente, y en menor grado o en absoluto con otras secuencias. Una "hibridación rigurosa" es dependiente de secuencia, y es diferente en condiciones diferentes. Puede encontrarse una amplia guía para la hibridación de ácidos nucleicos en, por ejemplo Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier, NY (1993). Generalmente, las condiciones de lavado e hibridación altamente rigurosas se seleccionan a aproximadamente 5°C por debajo del punto de fusión térmico (Tm) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La Tm es la temperatura (a la fuerza iónica y el pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia diana se hibrida con una sonda de coincidencia perfecta. Se seleccionan condiciones muy rigurosas realizando el ensayo a una temperatura fijada para que sea igual a la Tm para una sonda particular. Un ejemplo de condición de lavado altamente rigurosa es NaCl 0,15 M a 72 °C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado con 0,2 × SSC a 65 °C durante 15 minutos. Véase Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2.<sup>a</sup> Ed), vol. 1-3 (1989).

Tal como se usa en el presente documento, el término "sitio designado" se define como un sitio polimórfico de interés (es decir, un sitio polimórfico que se pretende identificar) en un ácido nucleico dado. El término "sitio no designado" se refiere a cualquier sitio polimórfico que coexiste con un sitio o sitios designados en un ácido nucleico dado pero que no es de interés.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sitios designados correlacionados" se refiere a sitios polimórficos con apariciones correlacionadas. Normalmente, debe identificarse cada miembro de un conjunto de sitios polimórficos de este tipo con el fin de identificar el alelo al que pertenece el conjunto.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sitio designado seleccionado" se refiere a un sitio polimórfico de interés en un ácido nucleico dado que también se solapa con el extremo 3' de una secuencia de sonda de esta invención. Un "sitio designado no seleccionado" se refiere a un sitio polimórfico de interés que no se solapa con un extremo 3' de una secuencia de sonda de esta invención.

Tal como se usa en el presente documento, un "sitio no designado de interferencia" se refiere a un sitio polimórfico no designado que está dentro de 1-5 bases desde el extremo 3' de una secuencia de sonda de esta invención. Un

“sitio no designado de interferencia” se refiere a un sitio no designado que es mayor de 5 bases desde el extremo 3' de una secuencia de sonda de esta invención. El sitio no designado de interferencia puede estar más cerca del extremo 5' de la secuencia de sonda que del extremo 3'.

5 En determinadas realizaciones, las sondas de esta invención comprenden una región de “iniciación de elongación terminal” (también denominada región “TEI”) y una región de anclaje dúplex (“DA”). La región TEI se refiere a una sección de la secuencia de sonda, normalmente las tres o cuatro posiciones en el extremo 3' terminal de la sonda. La región TEI está diseñada para alinearse con una parte de secuencia de ácido nucleico diana en un sitio polimórfico designado para iniciar la elongación de la sonda catalizada por polimerasa. La región DA comprende normalmente las posiciones restantes dentro de la secuencia de sonda y está diseñada preferiblemente para alinearse con una parte de la secuencia diana en una región ubicada cerca (dentro de 3-5 bases) del polimorfismo designado.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término un “estrecho intervalo de proximidad” se refiere a una distancia de entre 1-5 bases a lo largo de una cadena de ácido nucleico dada. Un “intervalo de proximidad” se refiere a una distancia dentro de 1-10 bases a lo largo de una cadena de ácido nucleico dada. El término “intervalo de tolerancia” se refiere al número total de faltas de coincidencia en la región TEI de una sonda hibridada con una secuencia diana que todavía permite el apareamiento y la elongación de la sonda. Normalmente, más de 2 faltas de coincidencia en la región TEI de una sonda hibridada está más allá del intervalo de tolerancia.

20 Los términos “microesferas”, “micropartículas”, “perlas” y “partículas” se usan en el presente documento de manera intercambiable. La composición de las perlas incluye, pero no se limita a, plásticos, cerámicas, vidrio, poliestireno, metilmetacrilato, polímeros acrílicos, materiales paramagnéticos, toria sol, grafito de carbono, dióxido de titanio, látex o dextranos reticulados tales como Sepharose, celulosa, nailon, micelas reticuladas y teflón. Véase “Microsphere Detection Guide” de Bangs Laboratories, Fishers EN. No es necesario que las partículas sean esféricas y pueden ser porosas. Los tamaños de perla pueden oscilar entre nanómetros (por ejemplo, 100 nm) y milímetros (por ejemplo, 1 mm), prefiriéndose las perlas desde aproximadamente 0,2 micrómetros hasta aproximadamente 200 micrómetros, siendo particularmente preferidas más preferiblemente desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5 micrómetros.

30 Esta invención proporciona la consulta simultánea de un conjunto de sitios polimórficos designados dentro de una o más cadenas diana apareando en primer lugar un conjunto de sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia inmovilizadas con cadenas de ácido nucleico diana y estudiando mediante sonda la configuración de sitios polimórficos designados por medio de elongación catalizada por polimerasa del conjunto apareado de sondas oligonucleotídicas inmovilizadas específicas de secuencia. Una sonda de elongación se diseña para consultar un sitio designado apareando con una secuencia en una diana dada, formando de ese modo un complejo de hibridación (“dúplex”). El extremo 3' terminal de la sonda se coloca en o cerca del sitio designado dentro de la diana y la elongación de la sonda catalizada por polimerasa se inicia si la composición de la sonda en el extremo 3' terminal coincide (es decir, si es complementaria a) con la de la diana en el sitio de consulta. Tal como se describe en el presente documento, la sonda puede diseñarse para aparearse de tal manera que el sitio designado esté dentro de un intervalo de proximidad del extremo 3' terminal.

45 En una realización de la invención, pueden proporcionarse dos o más sondas para la consulta de un sitio designado específico. Las sondas se diseñan para tener en cuenta la posibilidad de polimorfismos o mutaciones en el sitio de consulta y sitios polimórficos no designados dentro de un determinado intervalo de proximidad del sitio polimórfico designado. En este contexto, el término “polimorfismo” se refiere a cualquier variación en una secuencia de ácido nucleico, mientras que el término “mutación” se refiere a una variación de secuencia en un gen que está asociada o que se cree que está asociada con un fenotipo. En una realización preferida, esta multiplicidad de secuencias de sonda contiene al menos una sonda que coincide con la secuencia diana específica en todas las posiciones dentro del intervalo de proximidad para garantizar la elongación.

50 En determinadas realizaciones, la invención divulga composiciones y métodos para la consulta paralela de sitios polimórficos S seleccionados de una secuencia diana de longitud N mediante un conjunto de cebadores oligonucleotídicos  $L \geq S$ .

55 Según los requisitos de las aplicaciones de ensayo específicas, pueden designarse una o más sondas de composición diferente para el mismo sitio polimórfico, tal como se elabora en varios ejemplos facilitados en el presente documento.

60 Cada sonda designada está compuesta por una secuencia de nucleótidos de longitud M que contiene un sitio de consulta (uno que, tras la hibridación, se alinea con el sitio polimórfico que está analizándose) en o cerca del extremo 3' terminal. Aunque se prefiere el extremo 3', pueden usarse las que están dentro de 3-4 bases desde el extremo 3'. El cebador se inmoviliza sobre un portador en fase sólida (puede unirse a través de una secuencia de ligador u otro resto de ligador) y se identifica mediante su asociación con ese portador. La secuencia de sonda se diseña para permitir el apareamiento del cebador con la diana para formar un complejo de hibridación entre la sonda y la diana y para garantizar la alineación del sitio de consulta con el sitio polimórfico designado, proporcionando la

5 configuración preferida un sitio de consulta en el extremo 3' terminal de la sonda y la alineación del extremo 3' terminal con el sitio polimórfico designado. La etapa de consultar la composición de nucleótidos del sitio polimórfico designado con una sonda designada de composición de sitio de consulta dado asigna a ese sitio uno de dos valores, concretamente con coincidencia, representado numéricamente con 1, o sin coincidencia, representado numéricamente con 0. En la tipificación molecular de HLA, la serie binaria resultante de longitud L identifica un alelo con una resolución de tipificación deseada.

10 En una realización preferida, la etapa de consulta usa la extensión de la sonda designada. Esta reacción, catalizada por una polimerasa, produce un complejo de hibridación extendido añadiendo a la secuencia de sonda uno o más nucleósidos trifosfato en el orden que refleja la secuencia de la secuencia diana en el complejo de hibridación existente. Con el fin de que esta reacción de extensión avance, un cebador designado de longitud M debe contener una región de iniciación de extensión terminal de longitud  $M^* \leq M$ , denominado también en el presente documento secuencia de iniciación de extensión terminal (o secuencia TEI), que contiene el sitio de consulta. La extensión avanza si la composición del sitio de consulta designado coincide con la del sitio polimórfico designado.

15 Se ha descrito que los métodos de la técnica anterior de detección de extensión satisfactoria implican el uso de desoxinucleósidos trifosfato (dNTP) o didesoxinucleósidos trifosfato (ddNTP) marcados. La presente invención también divulga métodos nuevos de proporcionar firmas ópticas para la detección de extensión satisfactoria eliminando la necesidad de dNTP o ddNTP marcados, una ventaja que surge de la reducción en la eficacia de polimerasas disponibles en albergar dNTP o ddNTP marcados.

20 Sin embargo, la densidad de sitios polimórficos en loci altamente polimórficos considerados en relación con la presente invención hace probablemente que los cebadores designados dirigidos a sitios polimórficos seleccionados, cuando se aparean con la subsecuencia diana proximal al sitio polimórfico designado, se solapen con sitios polimórficos adyacentes.

25 Es decir, una sonda oligonucleotídica, diseñada para consultar la configuración de la diana en uno de los sitios polimórficos seleccionados, y construida con longitud suficiente para garantizar la especificidad y la estabilidad térmica en el apareamiento con la subsecuencia diana correcta, se alineará con otros sitios polimórficos cercanos. Estos sitios polimórficos de interferencia pueden incluir los sitios no designados así como sitios designados no seleccionados en la secuencia diana.

30 En una reacción de SSP multiplexada llevada a cabo en disolución, el solapamiento parcial entre sondas designadas dirigidas a polimorfismos seleccionados cercanos puede conducir a competición mutua entre sondas por la misma diana. La presente invención reduce significativamente esta complicación por medio de inmovilización de sonda.

35 Como con la hibridación diferencial multiplexada en general, la falta de coincidencia en una o más posiciones entre una sonda designada y la diana puede afectar a la estabilidad térmica del complejo de hibridación. Es decir, cualquier conjunto de condiciones de apareamiento aplicadas a toda la mezcla de reacción puede producir diversos grados de apareamiento entre la sonda y la diana y puede afectar al resultado de la reacción de extensión de sonda posterior, introduciendo de ese modo ambigüedades en el ensayo que pueden requerir una nueva secuenciación posterior.

40 Sitios polimórfico no designados ubicados en proximidad inmediata al sitio de consulta cerca o en el extremo 3' terminal de la sonda designada son particularmente perjudiciales para la eficacia de la secuencia TEI de la sonda en el inicio de la reacción de extensión.

45 La potencia de las enzimas polimerasas disponibles en la actualizad que catalizan la reacción de extensión para discriminar entre una coincidencia y una falta de coincidencia en la composición entre el sitio de consulta dentro del cebador designado y el sitio polimórfico depende del desplazamiento del sitio de consulta del extremo 3' terminal del cebador, considerando polimorfismos de un solo nucleótido así como de múltiples nucleótidos.

50 En una realización preferida que produce potencia de discriminación óptima, el sitio de consulta se proporciona en el extremo 3' terminal de la sonda. Dada una secuencia de sonda de longitud M designada para un sitio seleccionado  $s^*$  en la representación  $PM(s^*) := \{cP(m); 1 \leq m \leq M\}$ , aumentando el índice m en la dirección de 5' a 3' del cebador, esta configuración proporciona la alineación del sitio designado  $s^*$  con la posición M en la secuencia de sonda; en el caso de los polimorfismos de múltiples nucleótidos, también están implicadas las posiciones M-1 (para un polimorfismo de dinucleótido) y M-2 (para un polimorfismo de trinucleótido), etc.

55 En estas circunstancias tal como se prevén en el análisis multiplexado de loci altamente polimórficos, la ventaja de la especificidad potenciada permitida por la aplicación de una reacción de extensión catalizada por polimerasa está enormemente disminuida o perdida como resultado de las complicaciones que surgen de las condiciones de apareamiento "subóptimas" estrechamente relacionadas con las que limitan el rendimiento del análisis de SSO.

60 En relación con la optimización del diseño de múltiples secuencias de sonda que comparten la misma composición de sitio de consulta para cualquier sitio polimórfico designado dado, será útil considerar el concepto de tolerancia de

- polimorfismos de interferencia. Considerando sin limitación de generalidad el ejemplo del polimorfismo de un solo nucleótido, un cambio en la alineación de  $s^*$  alejándose del extremo 3' terminal hacia las posiciones M-1, M-2, ..., M- $m^*$  conduce a una potencia discriminatoria disminuida gradualmente. Es decir, cuando el sitio polimórfico designado se alinea con una posición de sonda interior,  $m^*$ , la reacción de extensión ya no discrimina entre coincidencia y falta de coincidencia. A la inversa, en la realización preferida de colocar el sitio de consulta en el extremo 3' terminal de la sonda, el efecto perjudicial de polimorfismos no designados cercanos sobre la eficacia de la reacción de extensión disminuye asimismo con la distancia desde el extremo 3' terminal. Es decir, los polimorfismos no designados alineados con la posición entre 1 y  $m^*$  no afectarán a la reacción de extensión.
- 5
- 10 La secuencia terminal de longitud  $M-m^*+1$  dentro de la sonda se denomina en el presente documento la secuencia TEI de un cebador dado. En general,  $1 < m^* < M$ , y la secuencia TEI pueden comprender solo un pequeño número de posiciones de sonda terminales; en determinados casos,  $m^* = 1$ , de modo que la secuencia de sonda engloba toda la secuencia de la sonda.
- 15 La presente invención alberga la presencia de sitios polimórficos de interferencia dentro de la longitud de una secuencia de sonda designada teniendo en cuenta estas variaciones de secuencia conocidas en el diseño de múltiples sondas. En particular, el número de configuraciones de secuencia de sonda alternativas que van a proporcionarse para una longitud de sonda dada M está significativamente reducido como resultado de la existencia de una secuencia TEI de longitud  $M-m^*+1$ . Es decir, con el fin de garantizar la potencia discriminatoria eficaz de la
- 20 reacción de extensión, basta con restringir las configuraciones de secuencia de sonda alternativas previstas a la longitud de la secuencia TEI. En una realización preferida, se prevén todas las secuencias alternativas posibles de modo que una de estas secuencias de sonda alternativas coincidirán con la diana en todas las posiciones  $m^*$ ,  $m^*+1, \dots, M-1, M$ .
- 25 Proporcionar, para cada sitio polimórfico seleccionado, una multiplicidad de sondas designadas con secuencias previstas aumenta la complejidad de la codificación si todas estas sondas se codifican por separado por la asociación única con los portadores en fase sólida codificados. Sin embargo, esta complejidad se reduce colocando este conjunto de sondas sobre un portador en fase sólida común. Es decir, solo se codifica la composición del sitio de consulta de cualquier sonda designada, un concepto denominado en el presente documento combinación de
- 30 secuencias TEI o combinación de sondas. La combinación de secuencias de sonda completa reduce la complejidad de la codificación a la del diseño original porque no se proporcionan secuencias de sonda previstas. También es posible la combinación parcial.
- 35 En determinadas realizaciones preferidas, la polimerasa usada en la elongación de sonda es una ADN polimerasa que carece de actividad exonucleasa 3' a 5'. Los ejemplos de tales polimerasas incluyen ADN polimerasa de T7, ADN polimerasa de T4, ThermoSequenase y Taq polimerasa. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana es ARN, puede usarse transcriptasa inversa. Además de la polimerasa, se añaden nucleósidos trifosfato, preferiblemente las cuatro bases. Por ejemplo, pueden añadirse dNTP, o análogos. En otras realizaciones determinadas, pueden añadirse ddNTP. También pueden usarse análogos de nucleótidos, tales como Cy3-dUTP para facilitar la
- 40 detección.
- 45 Se han descrito métodos de la técnica anterior para detectar la elongación satisfactoria que usan desoxinucleósidos trifosfato (dNTP) o didesoxinucleósidos trifosfato (ddNTP) marcados. Esta invención divulga métodos nuevos para proporcionar firmas ópticas para detectar elongación satisfactoria, eliminando así la necesidad de dNTP o ddNTP marcados. Esto es ventajoso porque las polimerasas disponibles actualmente son menos eficaces para albergar dNTP o ddNTP marcados. Esta invención proporciona métodos y composiciones para el análisis preciso del polimorfismo de regiones diana altamente polimórficas. Tal como se usa en el presente documento, secuencias altamente polimórficas son aquellas que contienen, dentro de una parte de la secuencia que entra en contacto con la sonda, no solo el sitio polimórfico designado o consultado, sino también sitios polimórficos no designados que
- 50 representan una fuente potencial de error en el análisis. Consideraciones adicionales se refieren a diseños, composiciones y métodos de reacciones de PCR de multiplexación. En una realización preferida, se presentan conjuntos de cobertura de sondas de PCR compuestas por subsecuencias de cebado y apareamiento sobre micropartículas codificadas para producir amplicones presentados en perlas mediante elongación de sonda. Pueden formarse ensamblajes de perlas sobre sustratos planos, antes o después de la amplificación para facilitar la decodificación y la obtención de imágenes de las sondas.
- 55 En una realización, esta invención proporciona sondas que están diseñadas para contener una subsecuencia de "cebado" en el extremo 3' terminal, también denominada en el presente documento región de iniciación de elongación terminal (TEI), y una subsecuencia de apareamiento, también denominada en el presente documento región de anclaje dúplex (DA). La región TEI normalmente comprende las tres o cuatro posiciones del extremo 3' terminal de una secuencia de sonda. La región TEI está diseñada para alinearse con una parte de la secuencia diana en un sitio polimórfico designado para iniciar la elongación de la sonda catalizada por polimerasa. La elongación de sonda indica una coincidencia perfecta en la composición de toda la región TEI y la parte correspondiente de la secuencia diana. La región DA, que comprende las posiciones restantes dentro de la
- 60 secuencia de sonda, está diseñada preferiblemente para alinearse con una parte de la secuencia diana en una región ubicada cerca (dentro de 3-5 bases) del polimorfismo designado. La región de anclaje dúplex está diseñada
- 65

para garantizar apareamiento específico y fuerte, y no está diseñada para el análisis de polimorfismos. Tal como se describe en el presente documento, las regiones DA y TEI pueden estar ubicadas inmediatamente adyacentes entre sí dentro de la sonda o pueden unirse mediante un anclaje molecular. Este último enfoque permite flexibilidad en la colocación de la región DA para evitar polimorfismos no designados ubicados inmediatamente adyacentes al sitio designado. La composición y la longitud de la región DA se eligen para facilitar la formación de un complejo de hibridación específico de secuencia estable ("dúplex"), mientras que se alberga (es decir, se tiene en cuenta) la presencia de uno o más polimorfismos no designados ubicados en la región de la diana. La longitud de la subsecuencia de apareamiento se elige para minimizar la hibridación cruzada minimizando las homologías de secuencia entre la sonda y las subsecuencias no seleccionadas de la diana. La longitud de la subsecuencia de apareamiento generalmente supera la de la subsecuencia de cebado de modo que la no formación de un dúplex generalmente implica no producir un producto de elongación.

La reacción de elongación proporciona alta especificidad en la detección de polimorfismos ubicados dentro de la región TEI. Para polimorfismos no designados en la región DA, la reacción de elongación avanzará a un nivel o bien comparable con, o bien inferior al de la coincidencia perfecta en determinadas condiciones. Esto se denomina el efecto de tolerancia de la reacción de elongación. La tolerancia se utiliza en el diseño de sondas para analizar polimorfismos designados y no designados tal como se describe en ejemplos en el presente documento.

La densidad de sitios polimórficos en los loci altamente polimórficos considerados en determinadas realizaciones de esta invención hace probablemente que las sondas dirigidas a sitios polimórficos designados se solapen con sitios polimórficos adyacentes, cuando se aparean con una subsecuencia diana proximal al sitio polimórfico designado. Es decir, una sonda oligonucleotídica diseñada para consultar la configuración de la diana en un sitio polimórfico designado seleccionado, y construida con longitud suficiente para garantizar la especificidad y la estabilidad térmica en el apareamiento con la subsecuencia diana correcta, se alineará con sitios polimórficos cercanos. Estos sitios polimórficos de interferencia pueden incluir sitios no designados en la secuencia diana así como sitios polimórficos designados pero no seleccionados.

Específicamente, los polimorfismos no designados tal como se contempla en la presente invención pueden interferir con la formación de dúplex, interfiriendo de ese modo con o inhibiendo completamente la elongación de la sonda. En una realización, la presente invención proporciona diseños de conjuntos de sondas de cobertura para albergar tales polimorfismos no designados. Un conjunto de sondas de cobertura contiene sondas para consultar simultáneamente una multiplicidad dada de sitios polimórficos designados dentro de una secuencia de ácido nucleico. Un conjunto de sondas de cobertura comprende, para cada sitio, al menos una sonda capaz de hibridarse con la diana para permitir, basándose en una reacción de elongación posterior, la asignación de uno de dos posibles valores para ese sitio: "con coincidencia" (elongación) o "sin coincidencia", (no elongación).

El conjunto de sondas de cobertura asociado con cada sitio designado puede contener dos o más sondas que difieren en una o más posiciones, también denominado en el presente documento un conjunto degenerado. En determinadas realizaciones, la secuencia de sonda puede contener nucleótidos universales capaces de formar un par de bases con cualquiera de los nucleótidos encontrados en el ADN. En determinadas realizaciones, las sondas pueden unirse a micropartículas codificadas, y específicamente, dos o más de las sondas en un conjunto de cobertura o un conjunto degenerado pueden unirse al mismo tipo de micropartícula. El procedimiento de unir dos o más sondas a una micropartícula o perla se denomina "combinación de sondas".

El diseño de conjuntos de sondas de cobertura se describe en el presente documento en relación con el análisis multiplexado de polimorfismos mediado por elongación en dos áreas representativas del análisis genético: (1) la puntuación de múltiples polimorfismos designados no correlacionados y mutaciones, como en el caso del análisis de mutaciones para CF y el examen de portadores de enfermedad en judíos asquenazíes (AJ), y (2) la puntuación de un conjunto de polimorfismos relacionados como en el caso de la tipificación molecular de HLA. En el primer caso, el conjunto de cobertura para toda la multiplicidad de mutaciones contiene múltiples subconjuntos, estando asociado cada subconjunto con un sitio designado. En tal caso, se proporcionan dos o más sondas para determinar la heterocigosidad. Para el fin de la identificación de SNP general y la secuenciación de confirmación, pueden proporcionarse conjuntos de sondas degenerados para contener hasta cuatro sondas marcadas (por ejemplo, presentadas en perlas) por sitio polimórfico. En el segundo caso, el conjunto de cobertura contiene subconjuntos contruidos para minimizar el número de sondas en el conjunto, tal como se elabora en el presente documento. El conjunto de sondas designadas está diseñado para identificar configuraciones de secuencia específicas de alelo basándose en el patrón de elongación.

Aunque este método de albergar o identificar sitios polimórficos no designados es especialmente útil en relación con la elongación multiplexada de sondas específicas de secuencia, también puede usarse conjuntamente con la extensión de una sola base de sondas, también conocida como minisequenciación (véase por ejemplo, Pastinen, et al. Genome Res. 7: 606-614 (1997).

El método de análisis mediado por elongación de la presente invención, a diferencia del método de extensión de sonda de una sola base, puede usarse para detectar no solo SNP, sino también para detectar otros tipos de polimorfismos tales como polimorfismos de múltiples nucleótidos (por ejemplo, dobles, triples, etc.), así como

inserciones y deleciones observadas comúnmente en la tipificación de loci genéticos altamente polimórficos tales HLA. En estos sistemas complejos, la elongación de sonda específica de secuencia según los métodos de esta invención, simplifica la etapa de detección porque se proporcionan dos o más sondas para cada ubicación de diana polimórfica de interés y la etapa de detección se realiza solo para determinar cuál de las dos o más sondas se elongó, en lugar de para distinguir entre dos sondas extendidas, como en el caso de la extensión de sonda de una sola base. Por tanto, aunque los métodos de esta invención albergan el uso de múltiples marcadores de fluoróforo o cromóforo en la etapa de detección, generalmente bastará un solo marcador universal para la elongación de sonda específica de secuencia. Esto es en contraposición a los métodos de extensión de una sola base cuya aplicación en un formato multiplexado requiere al menos dos marcadores de fluoróforo o cromóforo.

**Metilación del ADN:** En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos y composiciones para determinar el estado de metilación del ADN. Desde hace mucho tiempo se reconoce la metilación de citosina como un factor importante en el silenciamiento de genes en células de mamífero. La metilación de citosina en dinucleótidos de CpG individuales dentro de los sitios de reconocimiento de varios factores de transcripción es suficiente para bloquear la unión y está relacionada con varias enfermedades. Puede usarse eMAP para determinar el estado de metilación del ADN genómico para fines de diagnóstico y otros. El ADN se modifica mediante tratamiento con bisulfito de sodio que convierte citosinas no metiladas en uracilo. Tras la retirada del bisulfito y la finalización de la conversión química, se usa este ADN modificado como molde para la PCR. Se diseña un par de sondas, una específica para ADN que originalmente estaba metilado para el gen de interés, y una específica para el ADN no metilado. Se realiza eMAP con ADN polimerasa y un dNTP marcado y una mezcla sin marcar de 3 dNTP o ddNTP. El producto elongado sobre la superficie de perla específica puede indicar el estado de metilación.

**Secuenciación selectiva:** En otras realizaciones determinadas de esta invención, se usa secuenciación selectiva (también denominada "secuenciación") para la consulta simultánea de un conjunto entero de polimorfismos designados dentro de una secuencia de ácido nucleico con el fin de determinar la composición en cada uno de tales sitios. Puede usarse secuenciación selectiva para proporcionar la información necesaria para seleccionar, a partir del conjunto de posibles configuraciones para la secuencia de interés, la configuración real en una muestra específica dada o para estrechar el conjunto de posibles secuencias en esa muestra. En la secuenciación selectiva, la longitud de las sondas usadas en una reacción de extensión determina la longitud de las secuencias que pueden determinarse. Para secuencias de ADN más largas, pueden usarse diseños de sonda escalonada para unir las secuencias entre sí. Por tanto, pueden confirmarse combinaciones de secuencia conocidas, mientras que las combinaciones de secuencia desconocidas pueden identificarse como nuevos alelos.

**Examen de portadores de fibrosis quística** - Una aplicación práctica de esta invención implica el análisis de un conjunto de mutaciones designadas dentro del contexto de un gran conjunto de mutaciones y polimorfismos no designados en el gen de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). Cada una de las mutaciones diseñadas en el conjunto se asocia con la enfermedad y debe puntuarse de manera independiente. En el caso más sencillo de una mutación puntual, se proporcionan dos sondas codificadas para garantizar la alineación de sus extremos 3' terminales respectivos con el sitio designado, previendo una sonda el tipo natural, y previendo la otra la secuencia diana alterada ("mutada").

Sin embargo, para garantizar la elongación independientemente de la configuración de secuencia diana específica encontrada cerca del sitio designado, se proporcionan sondas adicionales para coincidir con cualquiera de las configuraciones posibles o probables, tal como se describe en varios ejemplos en el presente documento. En una realización preferida, el conjunto de sondas de cobertura se construye para contener sondas que presentan secuencias TEI correspondientes a todas las variaciones conocidas o probables de la subsecuencia diana correspondiente. Esto garantiza la elongación en presencia de polimorfismos no designados que inhiben la elongación de otro modo ubicados dentro de un intervalo de proximidad del sitio designado.

En determinadas realizaciones, no es necesaria la identificación de la configuración diana específica encontrada en los sitios no designados siempre que una de las secuencias prevista en el conjunto de sondas de cobertura coincida con la secuencia diana de manera suficientemente estrecha para garantizar la elongación, y por tanto que coincida con la secuencia diana exactamente dentro de la región TEI. En este caso, todas o algunas de las sondas de cobertura que comparten el mismo extremo 3' terminal pueden asignarse al mismo código. En una realización preferida, tales sondas pueden asociarse con el mismo soporte sólido ("combinación de sondas"). La combinación de sondas reduce el número de soportes sólidos distinguibles requeridos para representar el número de secuencias TEI necesario. En una realización particularmente preferida, se proporcionan soportes sólidos en forma de un conjunto o alineamiento de micropartículas distinguibles que pueden decodificarse *in situ*. La inclusión de sondas adicionales en el conjunto de sondas de cobertura para identificar polimorfismos adicionales en la región diana es un método útil para elucidar haplotipos para diversas poblaciones.

**HLA** - Otra aplicación de esta invención implica el análisis genético del complejo antígeno leucocitario humano (HLA), que permite la identificación de uno o más alelos dentro de regiones de HLA que codifican para antígenos de HLA de clase I (preferiblemente HLA-A, HLA-B, HLA-C o cualquier combinación de los mismos) y antígenos de HLA de clase II (que incluyen preferiblemente HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP o cualquier combinación de los mismos). Los loci de los genes de clase I y II también pueden analizarse simultáneamente. En contraposición con la puntuación

independiente de múltiples mutaciones designadas no correlacionadas, la identificación de alelos (o grupos de alelos) se basa en la puntuación de un conjunto entero de las reacciones de elongación. Cada una de estas reacciones implica una o más sondas dirigidas a un miembro de un conjunto seleccionado de sitios polimórficos designados. El conjunto de estas reacciones de elongación produce un patrón de señales de elongación característica. En una realización preferida, se produce un patrón binario, que asigna un valor de "1" a sondas que coinciden (y por tanto elongadas), y un valor de "0" a sondas no elongadas. El patrón binario ("serie") de longitud dada identifica únicamente un alelo o un grupo de alelos.

El número total de sondas requeridas para la tipificación de HLA depende de la resolución deseada. El término "resolución" se usa en el presente documento para indicar el grado de discriminación alélica. Preferiblemente, el método de esta invención permite la tipificación de un alelo de HLA que es suficiente para distinguir diferentes grupos de antígenos. Por ejemplo, A\*01 y A\*03 son diferentes grupos de antígenos que han de distinguirse en aplicaciones clínicas. El Programa Nacional de Donantes de Médula Ósea (NMDP) recomendó un panel para la tipificación molecular de los donantes. La resolución de baja a media requerida por el panel de NMDP significa que deben distinguirse diferentes grupos de antígenos en todo momento. Además, al menos deben distinguirse algunos de los alelos dentro de un grupo, aunque no necesariamente todos los alelos. En determinadas realizaciones, la presente invención permite la tipificación del alelo de HLA a una resolución de baja a media, tal como se define por los criterios del NMDP ([www.NMDPresearch.org](http://www.NMDPresearch.org)).

Con tal resolución siempre se identificará A\*01, A\*03 etc. A\*0101 y A\*0102 pueden no ser distinguibles necesariamente. Para el método de SSO, el panel de NMDP actual contiene 30 sondas para HLA-A; 48 para HLA-B y 31 para HLA-DR-B. La tipificación de HLA de alta resolución se refiere a la situación en la que se identificarán la mayoría de los alelos dentro de cada grupo. En este caso, se distinguirán A\*0101 y A\*0102. Para alcanzar tal resolución, se requerirán aproximadamente de 500 a 1000 sondas tanto para la tipificación de clase I como para la de clase II. En determinadas realizaciones, el método de la presente invención proporciona tipificación de HLA de alta resolución, al menos hasta el grado descrito en Cao, et al., *Rev. Immunogenetics*, 1:177-208 (1999).

Esta invención también proporciona estrategias para designar sitios y para diseñar conjuntos de sondas para tales sitios designados con el fin de producir asignaciones de alelo únicas basadas en los patrones de señal de reacción de elongación. El diseño de sondas de cobertura tiene en cuenta explícitamente las distintas funciones respectivas de las regiones TEI y DA de cada sonda.

Se construye un conjunto de sondas de cobertura asociado con un sitio designado dado para que contenga subconjuntos. Cada subconjunto contiene a su vez sondas que presentan regiones TEI idénticas. Una falta de coincidencia en una sola posición dentro de la región TEI, o una falta de coincidencia en tres o más posiciones dentro de la región DA impide la elongación. Por consiguiente, la elongación de dos sondas que presentan tales diferencias en la composición producirá en general distintos patrones de elongación. Todas estas sondas pueden multiplexarse en una reacción de elongación en paralelo siempre que se codifiquen individualmente. En una realización preferida, la codificación se lleva a cabo uniendo sondas a perlas codificadas por colores.

Las sondas que presentan subsecuencias de TEI idénticas y que presentan subsecuencias de DA que difieren en no más de dos posiciones producirán generalmente reacciones de elongación con un rendimiento (y por tanto intensidad de señal) o bien comparable a, o bien inferior que el de una coincidencia perfecta. En el primer caso que indica tolerancia de la falta de coincidencia, el conjunto de alelos que coinciden con la sonda en cuestión se expandirá para incluir alelos que presentan las configuraciones de secuencia con falta de coincidencia toleradas dentro de la región DA. En el segundo caso, que indica solo tolerancia parcial, se describen tres enfoques en el presente documento para elucidar adicionalmente el patrón de coincidencia de alelos. En el primer enfoque, las sondas que presentan uno o dos polimorfismos de nucleótido en sus respectivas regiones DA están incluidas en el conjunto de cobertura. La información con respecto a la secuencia diana se obtienen comparando cuantitativamente las intensidades de señal producidas por las diferentes sondas dentro del conjunto de cobertura. En el segundo enfoque, se usan sondas que comprenden regiones TEI y DA separadas unidas mediante un anclaje para colocar la región DA alejada de la región TEI con el fin de evitar polimorfismos de la diana. En el tercer enfoque, las sondas se combinan opcionalmente en tales casos ofreciendo solo una modesta expansión del conjunto de alelos de coincidencia.

En determinadas realizaciones de esta invención, las sondas se diseñan preferiblemente para ser complementarias a determinadas secuencias diana que se sabe que se correlacionan con combinaciones de alelos dentro del locus génico de HLA. Los polimorfismos conocidos son aquellos que han aparecido en la bibliografía o que están disponibles de una base de datos de secuencias que puede consultarse (por ejemplo, [www.NMDProcessing.org](http://www.NMDProcessing.org)). En determinadas realizaciones, el gen de HLA de interés pertenece al grupo de clase I de HLA, (por ejemplo, HLA-A, HLA-B o HLA-C o una combinación de los mismos). En otras realizaciones determinadas, el gen de HLA de interés pertenece al grupo de clase II de HLA, (por ejemplo, DR, DQ, DP o una combinación de los mismos). Los loci de clase I y clase II de HLA pueden examinarse en combinación y a modo de consulta simultánea. En esta invención también pueden usarse las sondas empleadas anteriormente en el método de SSP/gel. Preferiblemente, las sondas expuestas en Bunce et al., *Tissue Antigen*, 46: 355-367 (1995) y/o Bunce et al., *Tissue Antigen*, 45:81-90 (1995), se usan para preparar las sondas para esta invención. La información de las secuencias de sonda o la secuencia de

HLA proporcionada en el documento WO 00/65088; solicitud europea n.º 98111696,5; documento WO 00/70006; y Erlich et al., *Immunity*, 14: 347-356 (2001), puede usarse en el diseño de las sondas para esta invención.

5 La complejidad de un alineamiento de perlas codificadas se ajusta fácilmente para albergar la resolución de tipificación necesaria. Por ejemplo, cuando se usan 32 tipos de perlas para cada uno de cuatro subalineamientos distintos, estará disponible un total de 128 sondas para lograr un nivel medio de resolución para la tipificación de clase I y clase II de HLA en una reacción de elongación multiplexada. De manera análoga, con 128 tipos de perlas y cuatro subalineamientos, o 64 tipos de perlas y 8 subalineamientos, estará disponible un total de 512 sondas para lograr una alta resolución de tipificación de clase I y clase II de HLA en una reacción de elongación multiplexada. El formato de alineamiento de perlas codificadas es compatible con un análisis de alta producción. Por ejemplo, determinadas realizaciones de esta invención proporcionan un portador que alberga múltiples muestras en un formato que es compatible con las dimensiones de microplacas de 96 pocillos, de modo que la distribución de muestras puede manejarse por un aparato de manejo de fluido robótico convencional. Este formato puede albergar múltiples alineamientos de perlas codificadas montadas en chips y permite la finalización simultánea de múltiples reacciones de tipificación para cada una de múltiples muestras de pacientes en un solo portador de múltiples chips. En un portador de 96 pocillos que somete a prueba 128 tipos por paciente, pueden determinarse más de 10 000 genotipos a una velocidad de producción que no puede lograrse mediante la metodología de SSP o SSO actual. En determinadas realizaciones de esta invención, la reacción de elongación puede combinarse con una reacción de hibridación posterior para correlacionar subsecuencias en la misma cadena diana de ADN, una capacidad denominada en el presente documento "ajuste de fase". El ajuste de fase resuelve las ambigüedades en la asignación de alelos que surgen de la posibilidad de que se genere un patrón de elongación dado mediante diferentes combinaciones de alelos. De manera similar, el ajuste de fase es útil en el contexto de obtener el haplotipo para asignar polimorfismos a la misma cadena de ADN o cromosoma.

25 En determinadas realizaciones de esta invención, las etapas de apareamiento y elongación de la reacción de elongación pueden combinarse como una reacción de una etapa. Además, pueden incorporarse medios para crear variaciones de temperatura continuas o diferenciadas en el sistema para albergar múltiples condiciones óptimas para sondas con diferentes temperaturas de fusión en una reacción multiplexada. En determinadas realizaciones de esta invención, se forman alineamientos de perlas codificadas sobre sustratos sólidos. Estos sustratos sólidos pueden comprender cualquier material sólido adecuado, tal como vidrio o un semiconductor, que tiene resistencia mecánica suficiente y puede someterse a etapas de fabricación, si se desea. En algunas realizaciones, los sustratos sólidos se dividen en unidades diferenciadas conocidas como "chips". Los chips que comprenden alineamientos de perlas codificadas pueden procesarse individualmente o en grupos, si se cargan en un portador de múltiples chips. Por ejemplo, se aplican fácilmente métodos convencionales de control de temperatura para ajustar la temperatura de funcionamiento de, o para aplicar una secuencia programada previamente de cambios de temperatura a, portadores de un solo chip o de múltiples chips. Además, los chips pueden analizarse con la capacidad de obtención de imágenes directa de la Random Encoded Array Detection (detección de alineamiento codificado al azar) ("READ"), tal como se divulga en el documento PCT/US01/20179. Usando READ, es posible el análisis multiplexado de todos los alineamientos de perlas codificadas en chips. Además, en el formato de READ, la aplicación de ciclos de temperatura programados previamente proporciona amplificación en chip en tiempo real de productos de elongación. Dado ADN genómico, mitocondrial u otro, la amplificación en chip lineal puede obviar la necesidad de amplificación de ADN previa al ensayo tal como PCR, acortando de ese modo espectacularmente el tiempo requerido para completar todo el ensayo de tipificación. Por tanto, son posibles aplicaciones urgentes tales como la tipificación de un cadáver. Y lo que es más importante, este enfoque elimina las complejidades de la multiplexación de PCR, que es una etapa limitante en muchos análisis de examen y polimorfismo genéticos. En una realización preferida, un cartucho de fluido proporciona la inyección de muestra y reactivo así como el control de temperatura.

50 En una realización, la invención proporciona un método para el análisis de polimorfismos en el que cada secuencia de ácido nucleico diana se usa como molde en múltiples reacciones de elongación aplicando uno o más ciclos de temperatura de "apareamiento-extensión-detección-desnaturalización". Este método logra amplificación lineal con detección *in situ* de los productos de elongación. Esta capacidad adicional obvia la necesidad de una primera etapa de amplificación específica de secuencia de una muestra de polinucleótido.

55 La integración del procedimiento de ensayo y la amplificación de señales mediante ciclación no solo simplifica y acelera la finalización del análisis genético, sino que también elimina la necesidad de desarrollar, someter a prueba e implementar procedimientos de PCR multiplexada. Los métodos de esta invención también proporcionan un formato de alta producción para el análisis genético simultáneo de múltiples muestras de pacientes.

60 Se proporcionan varias realizaciones de esta invención para la elongación multiplexada de sondas específicas de secuencia para permitir la evaluación simultánea de varias dianas diferentes. En determinadas realizaciones, se inmovilizan sondas oligonucleotídicas sobre un soporte sólido para crear patrones densos de sondas sobre una sola superficie, por ejemplo, una superficie de silicio o vidrio. En determinadas realizaciones, se inmovilizan sondas oligonucleotídicas sintetizadas previamente sobre un soporte sólido, ejemplos de los cuales incluyen silicio, silicio modificado químicamente, vidrio, vidrio modificado químicamente o plástico. Estos soportes sólidos pueden estar en forma de perlas microscópicas. La resolución del alineamiento de oligonucleótidos se determina tanto mediante la resolución espacial del sistema de administración como mediante las necesidades de espacio físico del volumen de

disolución de nucleótido administrado. [Véase Guo, et al., Nuclei Acid Res. 22: 5456-5465 (1994); Fahy, et al., Nucleic Acid Res. 21:1819-1826 (1993); Wolf, et al., Nuc. Acids Res. 15: 2911-2926 (1987); y Ghosh, et al., Nuc. Acids Res. 15: 5353-5372 (1987).]

5 Esta invención proporciona métodos para ensayos multiplexados. En determinadas realizaciones, se inmovilizan conjuntos de sondas de elongación sobre una fase sólida de un modo que se conserva su identidad, por ejemplo, separando espacialmente diferentes sondas y/o codificando químicamente las identidades de sonda. Entonces se permite que una o más dianas que portan disolución se pongan en contacto con una multiplicidad de sondas inmovilizadas en las reacciones de apareamiento y elongación. Esta separación espacial de sondas entre sí  
10 mediante inmovilización reduce ambigüedades en la identificación de productos de elongación. Por tanto, esta invención ofrece ventajas con respecto al método de PCR-SSP existente, que no es adaptable para un formato de alta producción debido a (i) su necesidad de dos sondas para cada amplificación por PCR; (ii) la competencia entre sondas solapantes para los genes altamente polimórficos, tales como HLA, en una reacción homogénea multiplexada; y (iii) la dificultad para distinguir entre los productos específicos en tal reacción multiplexada.

15 En una realización preferida, las sondas se unen, a través de sus extremos 5' terminales respectivos, a micropartículas codificadas ("perlas") que tienen una característica distinguible química o físicamente que identifica de manera única la sonda unida. Las sondas capturan secuencias diana de interés contenidas en una disolución que entra en contacto con las perlas. La elongación de la sonda presentada sobre una perla particular produce una firma detectable ópticamente o una firma química que puede convertirse en una firma detectable ópticamente. En una  
20 reacción de elongación multiplexada, la firma óptica de cada perla participante corresponde únicamente a la sonda presentada sobre esa perla. Posteriormente a la etapa de elongación de sonda, puede determinarse la identidad de las sondas mediante la identificación y detección de partículas, por ejemplo, mediante citometría de flujo.

25 En determinadas realizaciones, las perlas pueden disponerse en un alineamiento plano sobre un sustrato antes de la etapa de elongación. Las perlas también pueden ensamblarse sobre un sustrato plano para facilitar la obtención de imágenes tras la etapa de elongación. El procedimiento y el sistema descritos en el presente documento proporcionan un formato de ensayo de alta producción que permite la obtención de imágenes instantánea de todo un  
30 alineamiento de perlas y el análisis genético simultáneo de múltiples muestras de pacientes.

El alineamiento de perlas puede ser un alineamiento codificado al azar, en el que una característica distinguible química o físicamente de las perlas dentro del alineamiento indica la identidad de las sondas oligonucleotídicas unidas a las perlas. El alineamiento puede formarse según el formato de READ.

35 El alineamiento de perlas puede prepararse empleando procedimientos por lotes separados para producir sustratos específicos de aplicación (por ejemplo, un chip en la escala de oblea). Las perlas que se codifican y se unen a sondas oligonucleotídicas (por ejemplo, en la escala de aproximadamente 108 perlas/100  $\mu$ l de suspensión) se combinan con un sustrato (por ejemplo, chip de silicio) y se ensamblan para formar alineamientos densos sobre una zona designada del sustrato. En determinadas realizaciones, el alineamiento de perlas contiene 4000 perlas de  
40 3,2  $\mu$ m de diámetro y tiene una dimensión de 300  $\mu$ m por 300  $\mu$ m. Con perlas de tamaño diferente, la densidad variará. También pueden formarse múltiples alineamiento de perlas simultáneamente en compartimentos de fluido diferenciados mantenidos en el mismo chip. Tales métodos se divulgan en la solicitud estadounidense con n.º de serie 10/192 351, presentada el 9 de julio de 2002.

45 Pueden formarse alineaciones de perlas mediante los métodos denominados colectivamente "LEAPS", tal como se describe en la patente estadounidense n.º 6.251 691 y la solicitud internacional PCT n.º PCT/US 00/25466).

El sustrato (por ejemplo, un chip) usado en esta invención puede estar en forma de un electrodo plano modelado según los métodos de modelado interfacial de LEAPS. Por ejemplo, el sustrato puede modelarse con óxido u otros  
50 materiales dieléctricos para crear una configuración deseada de gradientes de impedancia en presencia de un campo eléctrico de CA aplicado. Los patrones pueden diseñarse para producir una configuración deseada de flujo de fluido inducido por campo de CA y el transporte de partículas correspondiente. Los sustratos pueden modelarse en una escala de oblea usando tecnología de procesamiento de semiconductores. Además, los sustratos pueden compartimentalizarse depositando una película delgada de un polímero transparente ópticamente, que puede  
55 modelarse mediante UV, para fijar al sustrato una disposición deseada de compartimentos y conductos de fluido. Estos compartimentos y conductos confinan fluido en uno o varios compartimentos diferenciados, albergando de ese modo múltiples muestras sobre un sustrato dado.

Pueden prepararse alineamientos de perlas usando LEAPS proporcionando un primer electrodo plano que es sustancialmente paralelo a un segundo electrodo plano (configuración de "sándwich") estando los dos electrodos separados por un hueco y conteniendo un medio líquido polarizable, tal como una disolución de electrolito. La superficie o el interior del segundo electrodo plano pueden modelarse con el método de modelado interfacial. Las perlas se introducen en el hueco. Cuando se aplica un voltaje de CA al hueco, las perlas forman un alineamiento  
60 codificado al azar en el segundo electrodo (por ejemplo, un "chip").

65

En otra realización de LEAPS, puede formarse un alineamiento de perlas en un electrodo sensible a la luz (por ejemplo, un "chip"). Preferiblemente, la configuración en sándwich descrita anteriormente también se usa con un electrodo sensible a la luz plano y otro electrodo plano. De nuevo, los dos electrodos están separados por un hueco y contienen una disolución de electrolito. Las perlas funcionalizadas y codificadas se introducen en el hueco. Tras la aplicación de un voltaje de CA en combinación con luz, las perlas forman un alineamiento en el electrodo sensible a la luz.

En determinadas realizaciones de la presente invención, las perlas pueden asociarse con una característica distinguible química o físicamente. Esto puede proporcionarse, por ejemplo, tiñendo perlas con conjuntos de etiquetas distinguibles ópticamente, tales como las que contienen uno o más colorantes de fluoróforo o cromóforo que pueden distinguirse espectralmente mediante longitud de onda de excitación, longitud de onda de emisión, vida útil en estado excitado o intensidad de emisión. Pueden usarse las etiquetas distinguibles ópticamente para teñir perlas en razones especificadas, tal como se divulga, por ejemplo, en Fulwiler, documento US 4 717 655 (5 de enero de 1988). La tinción también puede llevarse a cabo hinchando las partículas según métodos conocidos por los expertos en la técnica, (Molday, Dreyer, Rembaum & Yen, J. Mol Biol 64, 75-88 (1975); L. Bangs, "Uniform latex Particles, Seragen Diagnostics, 1984). Por ejemplo, se codificaron hasta doce tipos de perlas hinchando y tiñendo en masa con dos colores, cada uno individualmente en cuatro niveles de intensidad, y se mezclaron en cuatro razones molares nominales. Alternativamente, pueden usarse los métodos de codificación por colores combinatorios descritos en la solicitud internacional n.º PCT/US 98/10719 para dotar a los alineamientos de perlas de etiquetas distinguibles ópticamente. Además de la codificación química, las perlas también pueden hacerse magnéticas mediante los procedimientos descritos en el documento PCT/US0/20179.

Además de la codificación química con colorantes, las perlas que tienen cebadores oligonucleotídicos pueden separarse espacialmente ("codificación espacial"), de manera que la ubicación de las perlas proporciona información en cuanto a la identidad de las perlas. La codificación espacial, por ejemplo, puede llevarse a cabo dentro de una sola fase de fluido en el transcurso del ensamblaje de alineamientos usando ensamblaje electrocinético controlado por luz de superficies próximas a partículas (LEAPS). Puede usarse LEAPS para ensamblar alineamientos de perlas planos en una configuración deseada en respuesta a campos eléctricos alternos y/o según patrones de luz proyectada sobre el sustrato.

Puede usarse LEAPS para crear gradientes laterales en la impedancia en la superficie de contacto entre un chip de silicio y una disolución para modular las fuerzas electrohidrodinámicas que median el ensamblaje de alineamientos. Las necesidades eléctricas son modestas: se aplican bajos voltajes de CA normalmente de menos de 10 Vpp a través de un hueco de fluido entre dos electrodos planos que normalmente tiene 100 µm. Este procedimiento de ensamblaje es rápido y puede programarse ópticamente: se forman alineamientos que contienen miles de perlas en el plazo de segundos bajo el campo eléctrico aplicado. La formación de múltiples subalineamientos también puede producirse en múltiples fases de fluido mantenidas sobre una superficie de chip compartimentalizada.

Posteriormente a la formación de un alineamiento, puede inmovilizarse el alineamiento. Por ejemplo, los alineamientos de perlas pueden inmovilizarse, por ejemplo, mediante la aplicación de un voltaje de CC para producir alineamientos codificados al azar. El voltaje de CC, fijado normalmente a 5-7 V (para perlas en el intervalo de 2-6 µm y para un tamaño de hueco de 100-150 µm) y aplicado durante < 30 s en configuración de "polarización inversa" de modo que un sustrato de silicio dopado en n forme el ánodo, hace que el alineamiento se comprima hasta un grado que facilita el contacto entre perlas adyacentes dentro del alineamiento y simultáneamente hace que las perlas se muevan hacia la región del alto campo eléctrico en proximidad inmediata de la superficie del electrodo. Una vez en proximidad suficientemente estrecha, las perlas se anclan mediante fuerzas de van der Waals que median adsorción física. Este proceso de adsorción se facilita proporcionando sobre la superficie de las perlas una población de "anclajes" que se extienden desde la superficie de las perlas; se ha usado polilisina y estreptavidina para este fin.

En determinadas realizaciones, los alineamientos de partículas pueden inmovilizarse mediante medios químicos, por ejemplo, formando una película compuesta de gel-partículas. En un método a modo de ejemplo para formar tales películas compuestas de gel-partículas, se proporciona una suspensión de micropartículas que también contiene monómero, agente de reticulación e iniciador para la formación de gel *in situ*. Las partículas se ensamblan para dar un ensamblaje plano sobre un sustrato usando LEAPS. Se aplican voltajes de CA de 1-20 Vp-p en un intervalo de frecuencia de desde centenares de hercios hasta varios kilohercios entre los electrodos a través del hueco de fluido. En presencia del voltaje de CA aplicado, se desencadena la polimerización de la fase de fluido tras el ensamblaje de alineamientos mediante el calentamiento térmico de la célula hasta ~ 40 °C-45 °C usando una lámpara de infrarrojos (IR) o sometiendo la reacción a fotoiniciación usando una fuente de lámpara de mercurio. El gel resultante atrapa eficazmente el alineamiento de partículas. Los geles pueden estar compuestos por una mezcla de acrilamida y bisacrilamida de diversas concentraciones de monómero de desde el 20 % hasta el 5 % (acrilamida:bisacrilamida = 37,5:1, razón molar), pero también puede usarse cualquier otro monómero soluble en agua de baja viscosidad o mezcla de monómeros. Los alineamientos de micropartículas químicamente inmovilizadas funcionalizadas mediante este procedimiento pueden usarse para una variedad de bioensayos, por ejemplo, ensayos de unión de ligando-receptor.

En un ejemplo, se forman hidrogeles térmicos usando diclorhidrato de azodiisobutiramidina como iniciador térmico a una baja concentración para garantizar que la fuerza iónica global de la mezcla de polimerización se encuentre en el intervalo de ~ 0,1 mM a 1,0 mM. El iniciador usado para la polimerización por UV es Irgacure 2959® (2-hidroxi-4'-hidroxietoxi-2-metilpropiofenona, Ciba Geigy, Tarrytown, NY). El iniciador se añade al monómero para dar una disolución al 1,5 % en peso.

En determinadas realizaciones, los alineamientos de partículas pueden inmovilizarse mediante medios mecánicos. Por ejemplo, puede producirse un alineamiento de micropocillos mediante métodos de procesamiento de semiconductor convencionales en las regiones de baja impedancia de un sustrato de silicio. Pueden formarse alineamientos de partículas usando tales estructuras. En determinadas realizaciones se utilizan fuerzas ponderomotrices e hidrodinámicas mediadas por LEAPS para transportar y acumular partículas sobre el alineamiento de huecos. Entonces se desconecta el campo de CA y las partículas quedan atrapadas en micropocillos y por tanto confinadas mecánicamente. Se retiran las perlas en exceso dejando un alineamiento de perlas al azar ordenado espacialmente sobre la superficie del sustrato.

Los sustratos (por ejemplo, chips) pueden colocarse en uno o más compartimentos cerrados que permiten que las muestras y los reactivos se transporten en y fuera de los compartimentos a través de interconexión de fluido. También pueden realizarse reacciones en un formato de compartimento abierto tal como una placa de microtitulación. Los reactivos pueden pipetarse sobre el chip mediante equipo de manejo de líquidos robótico y pueden procesarse múltiples muestras simultáneamente. Un formato de este tipo se adapta al procesamiento de muestras convencional y al manejo de líquidos para el formato de placa de microtitulación existente e integra procesamiento de muestras y detección de alineamientos.

En determinadas realizaciones de esta invención, se ensamblan perlas codificadas sobre la superficie del sustrato, pero no en un alineamiento. Por ejemplo, obteniendo manchas de suspensiones de perlas en múltiples regiones del sustrato y permitiendo que las perlas sedimenten por gravedad, pueden formarse ensamblajes de perlas formados sobre el sustrato. En contraposición con los alineamientos de perlas formados mediante LEAPS, estos ensamblajes generalmente adoptan configuraciones desordenadas de configuraciones de baja densidad o no planas que implican apilamiento o aglutinación de perlas, impidiendo de ese modo la obtención de imágenes de las perlas afectadas. Sin embargo, la combinación de codificación espacial y por colores obtenida obteniendo manchas de mezclas de perlas codificadas químicamente dando una multiplicidad de posiciones diferencias sobre el sustrato permite todavía la multiplexación.

En determinadas realizaciones, puede usarse una comparación de una imagen de un alineamiento tras el ensayo con una imagen decodificada del alineamiento para revelar características distinguibles química o físicamente, así como la elongación de sondas. Esta comparación puede lograrse usando, por ejemplo, un microscopio óptico con un detector de imágenes y equipos de captura y análisis de imágenes computerizado. La imagen de ensayo del alineamiento se toma para detectar la firma óptica que indica la elongación de sonda. La imagen decodificada se toma para determinar las características distinguibles química y/o físicamente que identifican de manera única la sonda presentada sobre la superficie de la perla. De este modo, puede identificarse la identidad de la sonda sobre cada partícula en el alineamiento mediante una característica distinguible.

Pueden usarse algoritmos de análisis de imágenes para analizar los datos obtenidos a partir de la decodificación y las imágenes de ensayo. Estos algoritmos pueden usarse para obtener datos cuantitativos para cada perla dentro del alineamiento. El software de análisis ubica automáticamente los centros de perlas usando una imagen de campo claro del alineamiento como molde, agrupa las perlas según el tipo, asigna intensidades cuantitativas a perlas individuales, rechaza "imperfecciones" tales como las producidas por materiales de "matriz" de conformación irregular en muestras de suero, analiza estadísticas de intensidad de fondo y evalúa las intensidades medias corregidas por el fondo para todos los tipos de perlas junto con las varianzas correspondientes. Ejemplos de tales algoritmos se exponen en el documento PCT/US01/20179.

La elongación de sonda pueden indicarse por un cambio en la firma óptica, o un cambio en la firma química que puede convertirse en un cambio en la firma óptica, que se origina a partir de las perlas que presentan sondas elongadas, por ejemplo. Para este fin se dispone de métodos de marcaje directo e indirecto bien conocidos en la técnica. El marcaje directo se refiere a un cambio en la firma óptica que resulta de la elongación; el marcaje indirecto se refiere a un cambio introducido por la elongación que requiere una o más etapas adicionales para producir una firma óptica detectable. En determinadas realizaciones, pueden unirse colorantes de fluoróforo o cromóforo a uno de los nucleótidos añadidos como componente de la elongación de sonda, de manera que la elongación de sonda cambia la firma óptica de las perlas cambiando, por ejemplo, las intensidades de fluorescencia o proporcionando otros cambios en las firmas ópticas de perlas que presentan productos de elongación.

### Ejemplos

La presente invención se entenderá mejor a partir de los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos son con propósitos ilustrativos y no han de interpretarse como que limitan esta invención de ninguna manera.

**EJEMPLO 1 - Diseño escalonado de sonda para análisis multiplexado de SSP**

Se inmovilizan sondas para cada polimorfismo sobre un soporte de fase sólida para proporcionar un formato en el que múltiples reacciones de apareamiento y extensión concurrentes pueden avanzar con mínima interferencia mutua. Específicamente, este método proporciona un diseño que alberga sondas solapantes, tal como se ilustra en la figura 1. En este ejemplo, se consideran tres alelos: el alelo A, el alelo B y el alelo C. Las sondas 1 y 2 detectan SNP que se alinean con sus extremos terminales 3' respectivos mientras que las sondas 3 y 4 detectan polimorfismos de dos nucleótidos que se alinean con sus extremos terminales 3' respectivos. Los sitios polimórficos seleccionados como diana por las sondas 1 y 2 están ubicados cinco nucleótidos en el sentido de 5' con respecto a los seleccionados como diana por las sondas 3 y 4. Este diseño permite que cada sonda se una a su diana correspondiente y permite que avance la elongación cuando existe una coincidencia perfecta en el sitio polimórfico designado. Por tanto, las sondas 1 y 3 coinciden para el alelo A, la sonda 2 y posiblemente la sonda 3 coinciden para el alelo B, y las sondas 1 y 4 coinciden para el alelo C.

**EJEMPLO 2: Diseño de sonda para la tipificación de HLA**

Para diseñar sondas para el análisis de la región polimórfica que va de la base 106 a la base 125 del gen DRB, se ubicaron veintidós tipos diferentes de secuencias para el fragmento de 20 bases de longitud en la base de datos DRB. Estos se enumeran en la tabla a continuación:

7	DRB1*0101	TTCTTGTGGCAGCTTAAGTT
104	DRB1*03011	TTCTTGGAGTACTCTACGTC
26	DRB1*04011	TTCTTGGAGCAGGTTAAACA
1	DRB1*0434	TTCTTGGAGCAGGTTAAACC
3	DRB1*07011	TTCTTGTGGCAGGGTAAGTA
1	DRB1*07012	TTCTTGTGGCAGGGTAAATA
28	DRB1*0801	TTCTTGGAGTACTCTACGGG
1	DRB1*0814	TTCTTGGAGTACTCTAGGGG
1	DRB1*0820	TTCTTGGAGTACTCTACGGC
1	DRB1*0821	TTCTTGGAGTACTCTATGGG
1	DRB1*09012	TTCTTGAAGCAGGATAAGTT
2	DRB1*10011	TTCTTGGAGGAGGTTAAGTT
1	DRB1*1122	TTCTTGGAGCAGGCTACACA
1	DRB1*1130	TTCTTGGAGTTCTTAAGTC
18	DRB1*15011	TTCTTGTGGCAGCCTAAGAG
9	DRB3*01011	TTCTTGGAGCTGCGTAAGTC
1	DRB3*0102	TTCTTGGAGCTGTGTAAGTC
1	DRB3*0104	TTCTCGGAGCTGCGTAAGTC
16	DRB3*0201	TTCTTGGAGCTGCTTAAGTC
1	DRB3*0212	TTCTTGCAGCTGCTTAAGTC
6	DRB4*01011	TTCTTGGAGCAGGCTAAGTG
14	DRB5*01011	TTCTTGCAGCAGGATAAGTA

La primera columna contiene el número de alelos que comparten la secuencia indicada en la tercera columna, la segunda columna contiene uno de los nombres de alelo. Se seleccionaron las últimas tres bases del fragmento de 20 bases como la región TEI y se clasificó el conjunto de secuencias según su región TEI para obtener los siguientes grupos:

ES 2 661 167 T3

e1	1	104	DRB1*03011	TTCTTGGAGTACTCTACGTC
		1	DRB1*1130	TTCTTGGAGTgCctTAaGTC
		9	DRB3*01011	TTCTTGGAGctgCGTAaGTC
		1	DRB3*0102	TTCTTGGAGctgTgTAaGTC
		1	DRB3*0104	TTCTcGGAGctgCGTAaGTC
		16	DRB3*0201	TTCTTGGAGctgctTAaGTC
e2		1	DRB3*0212	TTCTTGcAGctgctTAaGTC
	2	7	DRB1*0101	TTCTTGTGGCAGCTTAAGTT
		1	DRB1*09012	TTCTTGaaGCAGgaTAAGTT
		2	DRB1*10011	TTCTTGgaGGAGgTTAAGTT
	3	26	DRB1*04011	TTCTTGGAGCAGGTAAACA
		1	DRB1*1122	TTCTTGGAGCAGGcTAcACA
	4	1	DRB1*0434	TTCTTGGAGCAGGTAAACC
	5	3	DRB1*07011	TTCTGTGGCAGGGTAAGTA
		14	DRB5*01011	TTctTGcaGCAGGaTAAGTA
	6	1	DRB1*07012	TTCTGTGGCAGGGTAAATA
e3	7	28	DRB1*0801	TTCTTGGAGTACTCTACGGG
		1	DRB1*0814	TTCTTGGAGTACTCTAgGGG
		1	DRB1*0821	TTCTTGGAGTACTCTAtGGG
		1	DRB1*0820	TTCTTGGAGTACTCTACGGC
	9	18	DRB1*15011	TTCTGTGGCAGCCTAAGAG
	10	6	DRB4*01011	TTCTTGGAGCAGGCTAAGTG

5

Para secuencias del mismo grupo, las variaciones entre la primera secuencia del grupo y el resto se indican en minúsculas. Se usan tres secuencias de sonda para ilustrar la aplicación de estas reglas de diseño de sondas. La

primera secuencia en el primer grupo se selecciona como sonda e1; la 6.<sup>a</sup> secuencia del primer grupo se selecciona como sonda e2; y el primer grupo en la 7.<sup>a</sup> secuencia se selecciona como sonda e3.

5 Debido al requisito de una complementariedad perfecta de la diana y la región TEI de la sonda, las secuencias del grupo 2 al grupo 10 no producen productos de elongación para e1 y e2. De manera similar, las secuencias de grupos distintos al 7.<sup>o</sup> grupo no producen productos de elongación para e3. Cada grupo es distinto de los demás con respecto a los patrones de reacción de elongación.

10 Para secuencias del mismo grupo, existen dos tipos de situaciones. Por ejemplo, e1 y e2 difieren en un nucleótido en 6 posiciones dentro de la región de apareamiento. Por tanto, las dianas que coinciden para e1 y e2 no producirán productos de elongación para las demás secuencias, y e1 y e2 también son sondas distintas. De manera similar, las dianas para las secuencias segunda a 7.<sup>a</sup> del grupo 1 no producirán productos de elongación para la sonda e1.

15 Excepto para la coincidencia de diana e1, las 5 secuencias restantes solo difieren de e2 en uno o dos nucleótidos tal como se indica a continuación:

		1,2 .....M	
16	DRB3*0201	TTCTTGGAGCTGCTTAAGTC	e2
1	DRB1*1130	TTCTTGGAGtTcCTTAAGTC	a
9	DRB3*01011	TTCTTGGAGCTGCgTAAGTC	b
1	DRB3*0102	TTCTTGGAGCTGtgTAAGTC	c
1	DRB3*0104	TTCTcGGAGCTGCgTAAGTC	d
1	DRB3*0212	TTCTTGcAGCTGCTTAAGTC	e

20 Estas secuencias producen reacción cruzada. Cuando las dianas para las secuencias b y e, que difieren de e2 en una base en las posiciones M-7 y M-14 respectivas se aparean con la sonda e2, se tolerará(n) el/los polimorfismo(s) no designado(s) en la región de apareamiento y la reacción de elongación avanzará sustancialmente hasta el mismo grado que para secuencias con coincidencia perfecta. Cuando las dianas para las secuencias a, c y d, que difieren de e2 en dos nucleótidos se aparean con la sonda e2, la reacción de elongación presentará solo tolerancia parcial del/los polimorfismo(s) no designado(s). Un enfoque para mejorar esta situación es proporcionar sondas independientes para a, c y d, luego analizar cuantitativamente el rendimiento de productos de elongación analizando las intensidades de señal para identificar las secuencias correctas. Una alternativa sería formar un puente entre los polimorfismos no designados en la región de apareamiento completamente añadiendo un ligador físico (por ejemplo, un anclaje) a la sonda e2 para ser capaz de separar las regiones de apareamiento y TEI.

30 Para las secuencias en el 7.<sup>o</sup> grupo, las otras dos secuencias se tolerarán parcialmente por la sonda e3. Estas tres secuencias pueden combinarse. La sonda e2 proporcionará productos de elongación para 30 alelos en vez de 28 alelos.

**EJEMPLO 3: Utilización de tolerancia de falta de coincidencia para modificar patrones de unión de alelos**

35 Se usó la sonda DR-13e, GGACATCCTGGAAGACGA, para seleccionar como diana las bases 281-299 del gen DRB. Treinta y cuatro alelos, incluyendo el alelo DRB1\*0103, coinciden perfectamente con esta secuencia. Por tanto, en el patrón de unión, 13e es positivo para estos 34 alelos (es decir, 13e proporcionará productos de elongación con estos 34 alelos). Varios alelos adicionales presentan la misma región TEI pero presentan los polimorfismos no designados en sus regiones de apareamiento respectivas. Por ejemplo, cinco alelos, tales como DRB1\*0415, contienen T en vez de A en la posición 4 mientras que cuatro alelos, tales como DRB1\*1136, contienen C en esa posición. Debido a la tolerancia de falta de coincidencia en la región de apareamiento, secuencias diana complementarias a estos nueve alelos producirán patrones de reacción de elongación similares a los de la secuencia de coincidencia perfecta. Se muestra el resultado en la figura 2. TO-3 y TO-4 son secuencias completamente complementarias al alelo \*0415 y \*1136, respectivamente.

DRB1*0103	GACATCCTGGAAGACGA	34 alelos
DRB1*0415	GACTTCCTGGAAGACGA	5 alelos
DRB1*1136	GACCTCCTGGAAGACGA	4 alelos

50 **EJEMPLO 4: Diseño de estructura de ligador en las sondas para formar un puente entre los polimorfismos no designados**

Tal como se ilustra en la figura 3, se deriva una secuencia de anclaje de regiones de secuencia conservadas para garantizar un apareamiento específico y fuerte. No está diseñado para la detección de polimorfismos. Con ese propósito, se une una secuencia más corta para la detección de polimorfismos a la secuencia de anclaje por medio de un ligador químico neutro. La longitud más corta de la secuencia diseñada para la detección de polimorfismos limitará la posible interferencia para los polimorfismos no designados en las proximidades del sitio designado y, por tanto, disminuye el número de posibles combinaciones de secuencias requeridas para albergar tales polimorfismos de interferencia. Este enfoque evita sitios polimórficos de alta densidad en determinadas situaciones. Por ejemplo, sería posible distinguir entre las secuencias indicadas en el ejemplo 3 usando una sonda que tenga en cuenta el/los polimorfismo(s) adicional(es). A continuación se indican diseños ilustrativos del ligador y las secuencias:

ligador 13-5	AGCCAGAAGGAC/espaciador 18/espaciador 18/GGAAGACGA
ligador 13-8	AGCCAGAAGGAC/espaciador 18/espaciador 18/AGACGA
ligador 13-11	AGCCAGAAGGAC/espaciador 18/espaciador 18/CGA

### EJEMPLO 5: AJUSTE DE FASE

La presente invención también es útil en la reducción de ambigüedades que surgen cuando dos o más combinaciones de alelos pueden producir el mismo patrón de reacción. En una situación simulada mostrada en las figuras 4 y 5, el alelo A que coincide, y así produce un producto de elongación con, la sonda 1 y la sonda 3 y el alelo B, que coincide con la sonda 2 y la sonda 4 cuando están presentes en la misma reacción multiplexada, generan el mismo patrón de reacción total que la combinación del alelo C que coincide con las sondas 1 y 2 y el alelo D que coincide con la sonda 3 y la sonda 4. Tal ambigüedad puede reducirse o eliminarse usando los métodos de detección proporcionados en esta invención para analizar el producto de elongación de la sonda 1 mediante hibridación usando una sonda de detección marcada que está diseñada para seleccionar como diana el mismo sitio polimórfico como sonda 3. Si el resultado del análisis es positivo, solo es posible una combinación de alelos, concretamente la combinación 1, porque la sonda 1 y la sonda 3 se asocian con el mismo alelo. La sonda de detección puede marcarse usando cualquiera de los métodos divulgados en esta invención o métodos conocidos en la técnica. Si esta etapa de detección de identificación se realiza junto con la detección con la reacción multiplexada de elongación, se usan diferentes marcadores para la detección de elongación y la detección de hibridación de sonda tal como se muestra en la figura 5.

En este método, la ambigüedad se resuelve mediante la asignación de dos o más polimorfismos a la misma "fase" usando elongación conjuntamente con hibridación. El ajuste de fase está surgiendo rápidamente como una preocupación importante para el análisis de haplotipos en otros estudios genéticos diseñados en la técnica. Pueden incluirse más sondas haciéndolas reaccionar secuencialmente con la diana, o pueden disponerse en la misma reacción con diferentes marcadores para detección.

La capacidad de combinar las reacciones de elongación e hibridación de sonda se demuestra en experimentos que usan una secuencia de muestra del exón 3 de HLA-B. Se muestra el resultado en la figura 6. Se elongó una sonda SB3P en la reacción y se detectó el producto elongado usando una sonda de ADN marcada. Para las dos muestras presentadas en las figuras 6A y 6B, SB 127r y SB3P y SB285r y SB3P están en la misma fase, respectivamente.

### EJEMPLO 6 - Reacción de tipificación de HLA modelo usando alineamientos de sonda codificados al azar

Para ilustrar la discriminación de polimorfismos, se realizó una reacción modelo usando una cadena individual sintética como diana. Se usaron perlas funcionalizadas con tosilo, con codificación por colores de 3,2 µm de diámetro como portadores de fase sólida. Se generó un conjunto de 32 códigos de color distinguibles mediante la tinción de partículas usando métodos habituales conocidos en la técnica (Bangs. L. B., "Uniform Latex Particles", Seragen Diagnostics Inc., pág. 40) y usando diferentes combinaciones de colorante azul (absorción/emisión 419/466 nm) y colorante verde (absorción/emisión 504/511). Se funcionalizaron las perlas teñidas con Neutravidin (Pierce, Rockford, IL), una proteína de unión a biotina, para mediar en la inmovilización de sondas biotiniladas. En una reacción de acoplamiento a pequeña escala típica, se lavaron 200 µl de suspensión que contenía perlas al 1 % tres veces con 500 µl de tampón fosfato 100 mM/pH 7,4 (tampón A) y se resuspendieron en 500 µl de ese tampón. Después de aplicar 20 µl de Neutravidin 5 mg/ml a la suspensión de perlas, se selló la reacción y se permitió que avanzase durante la noche a 37 °C. Entonces se lavaron las perlas acopladas una vez con 500 µl de PBS/pH 7,4 con BSA 10 mg/ml (tampón B), se resuspendieron en 500 µl de ese tampón y se hicieron reaccionar durante 1 hora a 37 °C para bloquear los sitios que no reaccionaron en la superficie de la perla. Después del bloqueo, se lavaron las perlas tres veces con tampón B y se almacenaron en 200 µl de ese tampón.

En el sistema de reacción modelo, se sintetizaron dos pares de sondas para que contuviesen SNP en sus extremos terminales 3' respectivos. Las secuencias respectivas eran las siguientes:

SSP13: AAGGACATCCTGGAAGACG;

SSP24: AAGGACATCCTGGAAGACA;

SSP16: ATAACCAGGAGGAGTTCC

SSP36: ATAACCAGGAGGAGTTTCG.

- 5 Se biotinilaron las sondas en el extremo 5'; se insertó un ligador de trietilenglicol de 15 carbonos entre biotina y el oligonucleótido para minimizar los efectos disruptivos de la inmovilización en superficie en las reacciones posteriores. Para cada sonda, se realizó el acoplamiento a perlas codificadas usando 50 µl de la suspensión de perlas. Se lavaron las perlas una vez con 500 µl de Tris 20 mM/ pH 7,4, NaCl 0,5 M (tampón C) y se resuspendieron en 300 µl de ese tampón. Se añadieron 2,5 µl de una disolución de sonda 100 µM a la suspensión de perlas y se permitió que reaccionase durante 30 min a temperatura ambiente. Entonces se lavaron las perlas tres veces con Tris 20 mM/pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton al 0,01 % y se almacenaron en Tris 20 mM/pH 7,4, NaCl 150 mM.

Se proporcionaron las siguientes dianas sintéticas de 33 bases de longitud:

TA16: GTCGAAGCGCAGGAACTCCTCCTGGTTATGGAA

TA36: GTCGAAGCGCACGAACTCCTCCTGGTTATAGAA

TA13: GGCCCGCTCGTCTTCCAGGATGTCCTTCTGGCT

TA24: GGCCCGCTTGTCTTCCAGGATGTCCTTCTGGCT

- 15 Se permitió que reaccionasen las dianas con cuatro sondas (SSP13, SSP24, SSP16, SSP36) en el chip. Se aplicó una alícuota de 10 µl de una disolución 100 nM de la diana en tampón de apareamiento de NaCl 0,2 M, Triton X-100 al 0,1 %, Tris 10 mM/pH 8,0, EDTA 0,1 mM al chip y se permitió que reaccionase durante 15 min a 30 °C. Entonces se lavó el chip una vez con el mismo tampón y luego se cubrió con una mezcla de reacción de extensión que incluía: 100 nM de TAMRA-ddCTP (absorción/emisión: 550/580) (PerkinElmer Bioscience, Boston, MA), 10 µM de dATP-dGTP-dTTP, ThermoSequenase (Amersham, Piscataway, NJ) en el tampón asociado suministrado por el fabricante. Se permitió que avanzase la reacción durante 5 min a 60 °C, y entonces se lavó el chip en H<sub>2</sub>O. Se adquirieron imágenes de ensayo y decodificación del chip usando un microscopio de fluorescencia E800 de Nikon con un cambiador de filtro automatizado que contenía filtros de hidroxycumarina, GFP de banda estrecha HQ y Cy3 HQ para imágenes de decodificación de color azul, verde y para la imagen de ensayo, respectivamente. Se usó una cámara Apogee CCD KX85 (Apogee Instruments, Auburn, CA) para la adquisición de imágenes. En cada reacción, solo se extendió la diana de coincidencia perfecta produciendo, en el caso de los SNP sometidos a prueba en este caso, la discriminación entre dianas con coincidencia y sin coincidencia en el intervalo desde 13 veces hasta 30 veces; esto se ilustra en la figura 7 para TA13.

#### EJEMPLO 7 – Tipificación de HLA-DR de muestra de paciente

- 35 Se procesó una muestra de ADN extraída de un paciente usando un protocolo de PCR habitual. Se usaron los siguientes cebadores para la amplificación de DR general:

cebador directo: GATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG

cebador inverso: GCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC.

- 40 El protocolo de PCR fue el siguiente: un ciclo de 95 °C durante 7 min, 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min y un ciclo de 72 °C durante 7 min.

- 45 Se desnaturalizó el producto de PCR, de 287 bases de longitud y que cubre el locus DR, a 100 °C durante 5 min, se enfrió bruscamente en hielo y se mezcló con tampón de apareamiento tal como se describe en el ejemplo 6 para la reacción modelo. Se aplicó una alícuota de 10 µl a cada chip y se hizo reaccionar a 40 °C durante 15 min. La reacción de elongación y la posterior adquisición de imágenes avanzaron como en el ejemplo 6 anterior.

- 50 La extensión multiplexada de sondas específicas de secuencia usando el producto de PCR producido a partir de la muestra de paciente produjo resultados según el diseño de sonda. De las cuatro sondas sometidas a prueba en paralelo (SSP13, SSP16, SSP24, SSP36), SSP13 se elongó mientras que la sonda con SNP SSP24 solo mostró

unión de fondo como lo hicieron las sondas no relacionadas SSP16 y SSP36. Tal como se ilustra en la figura 8, la elongación multiplexada de SSP potenció significativamente la discriminación entre SNP con coincidencia y sin coincidencia en aproximadamente dos veces para un análisis basado en la hibridación de sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia con coincidencia y sin coincidencia hasta al menos 20 veces.

5

#### EJEMPLO 8: Amplificación específica de grupo

Los cebadores para la amplificación específica de grupo (GSA, *group-specific amplification*) son los usados con más frecuencia cuando la hibridación multiplexada con SSO produce asignaciones ambiguas de combinaciones heterocigotas de alelos. En tal situación, se seleccionan los cebadores de GSA para amplificar conjuntos seleccionados de alelos específicos de modo que se eliminen las ambigüedades, una etapa de ensayo adicional que requiere mucha mano de obra, lo que retrasa el análisis. Usando los métodos de la presente invención, preferiblemente una realización de presentación de sondas en alineamientos de perlas codificados al azar, pueden incorporarse cebadores de GSA como sondas en la reacción multiplexada, eliminando de ese modo toda la segunda etapa de análisis.

10

15

#### EJEMPLO 9: Análisis de loci de HLA-DR, -A y -B usando líneas celulares

Se diseñaron sondas para el análisis multiplexado mediado por elongación de HLA-DR, HLA-A y HLA-B y se sometieron a prueba usando líneas celulares habituales. Las sondas derivaron de sondas con SSP notificadas previamente en la bibliografía (Bunce, M. et al, *Tissue Antigens*. 46:355-367 (1995), Krausa, P y Browning, M.J., *Tissue Antigens*. 47: 237-244 (1996), Bunce, M. et al, *Tissue Antigens*. 45:81-90 (1995)).

20

Las sondas usadas para DR fueron:

25

```
SR2:  ACGGAGCGGGTGCGGTTG
SR3:  GCTGTCTGAAGCGCACGG
SR11: CGCTGTCTGAAGCGCACGTT
SR19: GTTATGGAAGTATCTGTCCAGGT
SR23: ACGTTTCTTGGAGCAGGTTAAAC
SR32: CGTTTCCTGTGGCAGGGTAAGTATA
SR33: TCGCTGTCTGAAGCGCACGA
SR36: CGTTTCTTGGAGTACTCTACGGG
SR39: TCTGCAGTAGGTGTCCACCA
SR45: CACGTTTCTTGGAGCTGCG
SR46: GGAGTACCGGGCGGTGAG
SR48: GTGTCTGCAGTAATTGTCCACCT
SR52: CTGTTCCAGGACTCGGCGA
SR57: CTCTCCACAACCCCGTAGTTGTA
SR58: CGTTTCCTGTGGCAGCCTAAGA
SR60: CACCGCGGCCCGCGC
SR67: GCTGTCTGAAGCGCAAGTC
SR71: GCTGTCTGAAGCGCACGTA
NEG  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Algunas de las sondas tienen un sitio de SNP en sus extremos terminales 3' respectivos, por ejemplo: SR3 y SR33 (G y A, respectivamente); SR11, SR67 y SR71 (T, C y A, respectivamente). Además, las sondas SR3 y 33 se escalonan en el extremo 3' con respecto a las sondas del grupo de SR11, 67 y 71 en una base.

30

```
SR3      GCTGTCTGAAGCGCACGG
SR33     TCGCTGTCTGAAGCGCACGA
SR11     CGCTGTCTGAAGCGCACGTT
SR67     GCTGTCTGAAGCGCAAGTC
SR71     GCTGTCTGAAGCGCACGTA
```

Las condiciones de reacción fueron tal como se describen en el ejemplo 7 excepto en que la temperatura de apareamiento fue de 55 °C en vez de 40°C, y la temperatura de extensión fue de 70 °C en vez de 60 °C. Se usó ADN bicatenario como en el ejemplo 7. El ADN monocatenario generó mejores resultados en las condiciones actuales. Se generó ADN monocatenario volviendo a amplificar el producto de PCR inicial en el mismo programa de PCR solo con una de las sondas. Se muestran los resultados para dos líneas celulares, W51 y SP0010, en la

35

figura 9 y la figura 10. Se acopló NEG, un control negativo, a un tipo de perla seleccionado. Se consideró que la intensidad de señal para las otras sondas menos NEG era la señal real para la sonda y se representaron gráficamente los valores en las figuras. La unidad del eje Y fue la unidad de señal para la cámara usada en el experimento. La distinción entre las sondas positiva y negativa fue inequívoca para cada muestra. En particular, y a diferencia de la situación que se encuentra normalmente en el análisis de SSO, no fue necesario realizar comparaciones con otras muestras para determinar un umbral fiable para cada sonda.

Las sondas usadas para HLA-A fueron:

SAD CACTCCACGCACGTGCCA  
 SAF GCGCAGGTCCTCGTTCAA  
 SAQ CTCCAGGTAGGCTCTCAA  
 SAR CTCCAGGTAGGCTCTCTG  
 SAX GCCCGTCCACGCACCG  
 SAZ GGTATCTGCGGAGCCCG  
 SAAP CATCCAGGTAGGCTCTCAA  
 SA8 GCCGGAGTATTGGGACGA  
 SA13 TGGATAGAGCAGGAGGGT

SA16 GACCAGGAGACACGGAATA

Los resultados para el locus A, exón 3, mostrados en las figuras 11 y la figura 12, también fueron inequívocos. La figura 12 también muestra un ejemplo de la tolerancia de falta de coincidencia para un polimorfismo no designado. Es decir, mientras que el alelo 0201, que presenta C en vez de A en la posición M-18, no tiene coincidencia perfecta con la sonda SAAP, la reacción de elongación avanzó no obstante porque la polimerasa detectó una coincidencia perfecta para el polimorfismo designado en el extremo 3' de la sonda y toleró la falta de coincidencia en la posición M-18.

Las sondas usadas para HLA-B fueron:

SB220 CCGCGCGCTCCAGCGTG  
 SB246 CCACTCCATGAGGTATTTC  
 SB229 CTCCAAGTTCGCTGGGA  
 SB272 CGCCACGAGTCCGAGGAA  
 SB285 GTCGTAGGCGTCCTGGTC  
 SB221 TACCAGCGCGCTCCAGCT  
 SB197 AGCAGGAGGGGCCGGAA  
 SB127 CGTCGCAGCCATACATCCA  
 SB187 GCGCCGTGGATAGAGCAA  
 SB188 GCCGCGAGTCCGAGGAC  
 SB195 GACCGGAACACACAGATCTT

Se realizaron experimentos usando estas sondas para la tipificación del exón 2 de HLA-B usando líneas celulares de referencia. Como con HLA-A, se obtuvieron resultados inequívocos (no se muestra en este caso).

#### **EJEMPLO 10: Análisis de mutaciones de CF - Diseño de sonda y alineamiento para la elongación de sonda**

Este ejemplo describe el diseño y la aplicación de un alineamiento plano de sondas, presentado sobre partículas con codificación por colores, estando diseñadas estas sondas para presentar varias (con la mayor frecuencia dos) composiciones de bases seleccionadas en o cerca de sus extremos 3' respectivos y diseñadas para alinearse con regiones de interés designadas dentro del gen diana de CFTR.

Se usó la secuencia del gen de CFTR de Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) para diseñar sondas de dieciséis meros para el análisis multiplexado de las 25 mutaciones de CFTR en el panel de mutaciones de ACMG-CF. Se diseñaron las secuencias de sonda usando PROBE 3.0 (<http://www.genome.wi.mit.edu>) y se alinearon con secuencias de exón respectivas (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/alignment.html>). Se diseñaron oligonucleótidos para que comprendiesen de 15 a 21 nucleótidos, con una composición de bases rica en G+C al 30-50 % y se sintetizaron para que contuviesen una biotina-TEG en 5' (Synthegen TX); para manipular pequeñas deleciones, se situó la secuencia variable de la región TEI en o dentro de las 3-5 posiciones desde el extremo terminal 3' de la sonda. Se indica las composiciones de sonda en la tabla a continuación.

Se usó una combinación de 17 perlas teñidas o bien de color azul puro o bien de color verde azulado con análisis de mutaciones de CF. Se sintetizó el gen de  $\beta$ -actina humana de 48 bases de largo (n.º de registro X00351) y se usó en cada reacción como control positivo interno. Se incluyeron sondas complementarias de dieciséis bases de largo en

## ES 2 661 167 T3

5 cada alineamiento. Se usó la secuencia del gen de CFTR de Genebank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) para el diseño de sonda para el análisis de 25 mutaciones de CFTR en el panel de mutaciones de ACMG-CF. Se diseñaron las secuencias de sonda mediante PROBE 3.0 (<http://www.genome.wi.mit.edu>). Se alineó cada secuencia de sonda con secuencias de exón respectivas (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/alignment.html>). Se sintetizaron oligonucleótidos con una biotina-TEG en 5' (Synthegen TX) y se acoplaron en la superficie de perlas en presencia de NaCl 0,5 M. Se inmovilizaron las perlas en la superficie de un chip mediante LEAPS.

### SECUENCIA DE MUTACIONES DE EXÓN

3	G85E	CCC CTA AAT ATA AAA AGA TTC
	G85E-X	CCC CTA AAT ATA AAA AGA TTT
4	1148	ATT CTC ATC TCC ATT CCA A
	1148-X	ATT CTC ATC TCC ATT CCA G
	621+1G>T	TGT GTG CAA GGA AGT ATT AC
	621+1G>T-X	TGT GTG CAA GGA AGT ATT AA
	R117H	TAG ATA AAT CGC GAT AGA GC
	R117H-X	TAG ATA AAT CGC GAT AGA GT
5	711+1G>T	TAA ATC AAT AGG TAC ATA C
		TAA ATC AAT AGG TAC ATA A

10

ES 2 661 167 T3

7	R334W	ATG GTG GTG AAT ATT TTC CG
	R334W-X	ATG GTG GTG AAT ATT TTC CA
	R347P	ATT GCC GAG TGA CCG CCA TGC
	R347P-X	ATT GCC GAG TGA CCG CCA TGG
	1078delT	CAC AGA TAA AAA CAC CAC AAA
	1078delT-X	CAC AGA TAA AAA CAC CAC AA
	1078delT-X-2	CAC AGA TAA AAA CAC CAC A
9	A455E	TCC AGT GGA TCC AGC AAC CG
	A455E-X	TCC AGT GGA TCC AGC AAC CT
10	508	CAT AGG AAA CAC CAA AGA T
	I507	CAT AGG AAA CAC CAA A
	F508	CAT AGG AAA CAC CAA T
11	1717-1G>A	CTG CAA ACT TGG AGA TGT CC
	1717-1G>A	CTG CAA ACT TGG AGA TGT CT
	551D	TTC TTG CTC GTT GAC
	551D-X	TTC TTG CTC GTT GAT
	R553	TAAAGAAATTCTTGCTCG
	R553X	TAAAGAAATTCTTGCTCA
	R560	ACCAATAATTAGTTATTCACC
	R560X	ACCAATAATTAGTTATTCACG
	G542	GTGTGATTCCACCTTCTC C
	G542X	GTGTGATTCCACCTTCTC A
INT-12	1898	AGG TAT TCA AAG AAC ATA C
	1898-X	AGG TAT TCA AAG AAC ATA T
13	2183deLA	TGT CTG TTT AAA AGA TTG T

ES 2 661 167 T3

	2183delA-X	TGT CTG TTT AAA AGA TTG C
INT 14B	2789	CAA TAG GAC ATG GAA TAC
	2789-X	CAA TAG GAC ATG GAA TAC T
INT 16	3120	ACT TAT TTT TAC ATA C
	3120-X	ACT TAT TTT TAC ATA T
18	D1152	ACT TAC CAA GCT ATC CAC ATC
	D1152	ACT TAC CAA GCT ATC CAC ATG
INT 19	3849+10kbC>T-WT1	CCT TTC Agg GTG TCT TAC TCG
	3849+10kbC>T-M1	CCT TTC Agg GTG TCT TAC TCA
19	R1162	AAT GAA CTT AAA GAC TCG
	R1162-X	AAT GAA CTT AAA GAC TCA
	3659delC-WT1	GTA TGG TTT GGT TGA CTT GG
	3659delCX-M1	GTA TGG TTT GGT TGA CTT GTA
	3659delC-WT2	GTA TGG TTT GGT TGA CTT GGT A
	3659delCX-M2	GTA TGG TTT GGT TGA CTT GT A
20	W1282	ACT CCA AAG GCT TTC CTC
	W1282-X	CT CCA AAG GCT TTC CTT
21	N1303K	TGT TCA TAG GGA TCC AAG
	N1303K-X	TGT TCA TAG GGA TCC AAC
b	$\beta$ -actina	AGG ACT CCA TGC CCA G

5 Se unieron las sondas, en presencia de NaCl 0,5 M, a perlas codificadas de manera diferencial, se tiñeron o bien con color azul puro o bien con color verde azulado. Se inmovilizaron las perlas en la superficie de un chip usando LEAPS. Se incluyó un gen de  $\beta$ -actina humana de 48 bases sintético (n.º de registro X00351) en cada reacción como control positivo interno.

10 **Diseño de alineamiento** - En una realización preferida, se dividieron las 25 mutaciones de CF en cuatro grupos diferentes para minimizar las homologías de secuencia entre los miembros de cada grupo. Es decir, se clasificaron las mutaciones en grupos independientes para minimizar el solapamiento entre secuencias de sonda en cualquiera de tales grupos y para minimizar de ese modo la hibridación cruzada en condiciones de análisis multiplexado. Se ensambló cada grupo, presentado en perlas con codificación por colores, en un alineamiento independiente. (Se describen los resultados para este diseño de alineamiento en 4 chips en el siguiente ejemplo). También se divulgan  
15 diseños de alineamiento robustos alternativos en el presente documento.

**EJEMPLO 11: Análisis multiplexado de mutaciones de CF mediante elongación de sonda usando READ**

5 Se amplificó ADN genómico, extraído de varios pacientes, con sondas correspondientes en una reacción PCR múltiplex (mPCR) usando el método descrito en L. McCurdy, Thesis, Mount Sinai School of Medicine, 2000. Esta reacción mPCR usa cebadores quiméricos etiquetados con una secuencia universal en el extremo 5'. Se fosforilaron  
 10 cebadores antisentido en el extremo 5' (Synthegen, TX). Se realizaron veintiocho ciclos de amplificación usando un ciclador térmico 9600 de Perkin Elmer, comprendiendo cada ciclo una etapa de desnaturalización de 10 segundos a 94 °C con una rampa de 48 segundos, una etapa de apareamiento de 10 segundos a 60 °C con una rampa de 36 segundos y una etapa de extensión de 40 segundos a 72 °C con una rampa de 38 segundos, conteniendo cada  
 15 reacción (50 µl) 500 ng de ADN genómico, tampón para PCR 1X (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, Triton X-100 al 0,1 %), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP de calidad para PCR y 5 unidades de ADN polimerasa Taq. Se determinaron concentraciones de sonda óptimas para cada par de sondas. Tras la amplificación, se purificaron los productos para retirar todos los reactivos usando un kit disponible comercialmente (Qiagen). Se determinó la concentración de ADN mediante análisis espectrofotométrico.

20 Se amplificaron los productos de PCR con cebadores antisentido fosforilados en 5'. Para producir moldes de ADN monocatenario, se incubaron los productos de la reacción PCR con 2,5 unidades de exonucleasa en tampón 1X a 37 °C durante 20 min, seguido por inactivación enzimática mediante calentamiento hasta 75 °C durante 10 min. En estas condiciones, la enzima digiere una cadena del ADN dúplex del extremo fosforilado 5' y libera 5'-fosfomononucleótidos (J. W. Little, et al., 1967). También pueden producirse dianas monocatenarias mediante otros métodos conocidos en la técnica.

25 Se añadieron productos de PCR individuales o combinados (20 ng de cada uno) a una mezcla de apareamiento que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) EDTA 1 mM, NaCl 0,2 M, Triton X-100 al 0,1 %. Se puso la mezcla de apareamiento en contacto con el alineamiento codificado de sondas de CF presentadas en perla (del ejemplo 10) y se incubó a 37 °C-55 °C durante 20 minutos. Entonces se añadió la mezcla de extensión, que contenía 3 U de Thermo Sequenase (Amersham Pharmacia Biotech NJ), tampón enzimático 1X con análogos de desoxinucleótidos (dNTP) o bien marcados con fluoresceína o bien marcados con TAMRA (NEN Life Sciences) y 1 µmol de cada tipo de dNTP no marcados, y se permitió que avanzase la reacción de elongación durante 3 minutos a 60 °C. Se lavó el  
 30 alineamiento de perlas con agua desionizada, esterilizada (dsH<sub>2</sub>O) durante 5-15 minutos. Se registró una imagen que contenía la señal de fluorescencia de cada perla dentro del alineamiento usando un microscopio de fluorescencia equipado con una cámara CCD. Se analizaron las imágenes para determinar la identidad de cada una de las sondas elongadas. Se muestran los resultados en la figura 15.

#### 35 EJEMPLO 12: Uso de sondas de cobertura

Se han identificado varios SNP dentro del exón 10 del gen de CFTR. Se indican los polimorfismos en el exón 10 al final de este ejemplo. Se han identificado los siguientes nueve SNP en la secuencia de Δ508, la mutación más común en el gen de CFTR (<http://snp.cshl.org>):

dbSNP213450 A/G

dbSNP180001 C/T

dbSNP1800093 G/T

1648 A/G

dbSNP100092 C/G

dbSNP1801178 A/G

dbSNP1800094 A/G

40 dbSNP1800095 G/A

Se diseñan las sondas para albergar todos los posibles SNP se sintetizan y se acoplan a perlas con codificación por colores. También se modifican los cebadores para la amplificación de la diana (descrito en el ejemplo 11) para tener en cuenta todos los posibles SNP. La diana amplificada por PCR media en la elongación de sondas con coincidencia terminal. La información recopilada del análisis es doble: identificación de mutaciones y SNP.

#### POLIMORFISMOS DEL EXÓN 10

1 cactgtagct gtactacctt ccactcctc aacctattcc aactatctga atcatgtgcc  
 61 ctctctgtg aacctctatc ataactctg tcacactgta ttgtaattgt ctctttact  
 121 tccccttgta tctttgtgc atagcagagt acctgaaaca ggaagtattt taaatattt  
 181 gaatcaaatg agttaataga atctttacaa ataagaatat acacttctgc ttaggatgat  
 241 aattggaggc aagtgaatcc tgagcgtgat tgataatga cctaataatg atgggttta  
 301 ttccagact tcaCttctaa tgAtgattat gggagaactg gaggcttcag agggtaaaat  
 361 taagcacagt ggaagaattt cattctgttc tcagtttcc tggattatgc ctggcaccat  
 421 taaagaaaat AtCActTtg gtgttcccta tgatgaatat agatacagaa gcgtcatcaa  
 481 agcatgcaa ctagaAgagG taagaaacta tgtgaaaact tttgattat gcatatgaac  
 541 cctcacact acccaaatta tatattggc tccatattca atcggttagt ctacatat  
 601 ttatgttcc tctatgggta agctactgtg aatggatcaa ttaataaac acatgaccta  
 661 tgcttaaga agcttgcaaa cacatgaaat aatgcaatt ttttttaa ataatgggtt  
 721 cattgatca caataatgc atttatgaa atggtgagaa tttgttcac tcattagtga  
 781 gacaaacgtc tcaatggta tttatatggc atgcatatag tgatatgtgg t

**EJEMPLO 13: Análisis de mutaciones de CF - Elongación en perla de sonda con sistema modelo**

- 5 La figura 13 proporciona una visión general de la detección de la mutación del gen de CF, R117H. Se amplificó la diana mediante PCR tal como se describe en el ejemplo 11. Se inmovilizaron dos sondas de 17 bases variables en sus extremos 3' en perlas con codificación por colores. Se añadió la secuencia diana de ácido nucleico junto con dCTP marcado con TAMRA, dNTP no marcados y ADN polimerasa termoestable.
- 10 Se sintetizaron sondas oligonucleotídicas de 17 meros complementarias variables en el extremo 3' por un proveedor comercial (Synthegen TX) para que contuviesen 5'-biotina unida por medio de un espaciador de 12 C (biotina-TEG) y se purificaron mediante HPLC de fase inversa. Se inmovilizaron las sondas en perlas codificadas por colores. Se unieron las sondas a perlas codificadas por colores. También se proporcionó un oligonucleótido de 48 meros sintético que contenía cualquiera de A, T, C o G a un sitio variable designado, correspondiente a una mutación del
- 15 gen de fibrosis quística en el exón 4 (R117H).

Se añadió 1  $\mu$ M de diana sintética a una mezcla de apareamiento que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) EDTA 1 mM, NaCl 0,2 M, Triton X-100 al 0,1 %. Se puso la mezcla de apareamiento en contacto con el alineamiento de perlas codificado y se incubó a 37 °C durante 20 minutos. Entonces se añadió una mezcla de elongación que contenía 3 U de Thermo Sequenase (Amersham Pharmacia Biotech NJ), tampón enzimático 1X con análogos de desoxinucleótidos (dNTP) marcados con TAMRA (NEN Life Sciences) y 1  $\mu$ M de cada tipo de dNTP no marcado, y se permitió que avanzase la reacción de elongación durante 3 minutos a 60 °C. Entonces se lavó el alineamiento de perlas con dsH<sub>2</sub>O durante 5-15 minutos y se registró una imagen que contenía la señal de fluorescencia de cada perla dentro del alineamiento usando un microscopio de fluorescencia equipado con una cámara CCD. Se analizaron las imágenes para determinar la identidad de cada una de las sondas elongadas. Se analizó la señal capturando la imagen mediante una cámara CCD y comparando la intensidad de señal entre dos sondas que pueden decodificarse mediante el color de la perla. La sonda de tipo natural coincidió exactamente con la diana añadida y, por tanto, produjo producto de elongación, mientras que no se observó elongación para la sonda mutante. Se muestran los resultados en la figura 16a.

30 **EJEMPLO 14: Análisis de mutaciones de CF - PCR con cebadores etiquetados con perlas y detección integrada**

35 Este ejemplo ilustra la elongación de sonda en la superficie de perlas en suspensión, seguido por el ensamblaje de y la inmovilización de perlas en la superficie de un chip para análisis de imágenes. Se diseñaron oligonucleótidos correspondientes a la mutación del gen de CFTR, R117H con extremos 3' variables (figura 14) y se sintetizaron para que contuviesen una 5'-biotina-TEG con un espaciador de 12 C (Synthegen, Texas). Se unieron las sondas a perlas teñidas de color azul de la siguiente manera: se añadieron 2  $\mu$ M de sonda a una disolución de perlas en TE 1X (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM), NaCl 500 mM y se hicieron reaccionar durante 45 min a temperatura ambiente. Se

lavaron las perlas con TE 1X, 150 mM de NaCl para 3X, y se suspendieron en 50  $\mu$ l de la misma disolución. Se añadió un  $\mu$ l de cada tipo de perla a la mezcla de PCR que contenía tampón 1X (Tris-HCl 100 mM, pH 9,0, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 500 mM), dCTP marcado con Cy5 40  $\mu$ M (Amersham Pharmacia Biotech NJ), y 80  $\mu$ M de los otros tres tipos de dNTP y 3 U de ADN polimerasa Taq (Amersham Pharmacia Biotech NJ). Se añadió diana complementaria de tipo natural (40 ng) a la mezcla de PCR justo antes de la amplificación. Se realizaron once ciclos de amplificación por PCR en un ciclador térmico 9600 de Perkin Elmer, consistiendo cada ciclo en desnaturalización durante 30 s a 90 °C, apareamiento durante 30 s a 55 °C y elongación a 72 °C durante 20 s. Después de la amplificación, se lavaron las perlas cuatro veces mediante centrifugación en tampón TE 1X y se pusieron en la superficie del chip. Se registraron imágenes como en los ejemplos anteriores y se analizaron usando el software descrito en el documento WO 01/98765. Los resultados muestran amplificación específica para perlas acopladas con la sonda de tipo natural, pero sin amplificación para perlas acopladas con la sonda mutante. Se muestran los resultados en la figura 16b.

Este ejemplo demuestra la integración de PCR multiplexada usando sondas etiquetadas con perlas con el posterior ensamblaje de las perlas en superficies planas para el análisis mediante obtención de imágenes instantáneo. En una realización preferida, puede usarse un dispositivo de múltiples compartimentos conectado de manera microfluidica para la amplificación de moldes tal como se describe en este caso. Por ejemplo, puede usarse una pluralidad de compartimentos capaces de permitir el alojamiento y ciclos de temperatura, en cada compartimento, produciendo una reacción mPCR un subconjunto de todos los amplicones deseados, de la siguiente manera: (1) realizar PCR con diferentes pares de sondas en cada uno de cuatro compartimentos, usando cebadores codificados etiquetados con perlas tal como se describe en este ejemplo; (2) tras completarse todas las reacciones PCR, combinar las perlas que presentan amplicones; (3) ensamblar el alineamiento al azar; y (4) registrar imágenes y analizar los datos. Puede lograrse el ensamblaje del alineamiento mediante uno de varios métodos de la técnica anterior incluyendo LEAPS.

#### **EJEMPLO 15: Análisis de mutaciones de CF - Apareamiento y elongación en una etapa en reactor de temperatura controlada**

Se amplificó ADN genómico, extraído de varios pacientes, con cebadores correspondientes en una reacción PCR multiplexada (mPCR), tal como se describe en el ejemplo 11. Tras la amplificación, se purificaron los productos para retirar todos los reactivos usando un kit disponible comercialmente (Qiagen). Se determinó la concentración de ADN mediante análisis espectrofotométrico. Se añadieron productos de PCR individuales o combinados (20 ng de cada uno) a una mezcla de apareamiento que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) EDTA 1 mM, NaCl 0,2 M, Triton X-100 al 0,1 %. Se mezcló la mezcla de apareamiento con mezcla de elongación que contenía 3 U de Thermo Sequenase (Amersham Pharmacia Biotech, NJ), tampón enzimático 1X con análogos de desoxinucleótidos (dNTP) o bien marcados con fluoresceína o bien marcados con TAMRA (NEN Life Sciences) y 1-10  $\mu$ mol de cada tipo de dNTP no marcados y se pusieron en contacto con un alineamiento de sondas oligonucleotídicas presentadas en un alineamiento con codificación por colores. Se diseñaron oligonucleótidos y se sintetizaron como en los ejemplos anteriores. Se permitió que avanzasen las reacciones de apareamiento y de elongación en un ciclador de temperatura controlada. Las etapas de temperatura fueron las siguientes: tres minutos cada una a 65 °C, 60 °C, 55 °C, 50 °C y 45 °C, con una rampa entre temperaturas de menos de 30 segundos. Entonces se lavó el alineamiento de perlas con dsH<sub>2</sub>O durante de 5 a 15 min. y se registró una imagen que contenía la señal de fluorescencia de cada perla dentro del alineamiento usando un microscopio de fluorescencia equipado con una cámara CCD. Se analizaron las imágenes para determinar la identidad de cada una de las sondas elongadas. Se muestran resultados típicos en la figura 17.

#### **EJEMPLO 16: Combinación de sondas de cobertura**

Para analizar los polimorfismos designados, se diseñaron sondas de elongación oligonucleotídicas de 20 meros de una composición de bases G+C del 30-50 % para que contuviesen un sitio variable (G/T) en el extremo 3', para alinearse con el sitio polimórfico designado. Se previeron dos sitios polimórficos no designados en la posición 10 (C/A) y en la 15 (T/G). Sigue un resumen del diseño:

Secuencia de sonda de tipo natural:

Oligo 1: "G" en la posición 20, "C" en la 10, y "T" en la 15.

Oligo 2: "G" en la posición 20, "C" en la 10, y "G" en la 15.

Oligo 3: "G" en la posición 20, "A" en la 10, y "T" en la 15.

Oligo 4: "G" en la posición 20, "A" en la 10, y "G" en la 15.

Secuencia de sonda mutante:

Oligo 1: "T" en la posición 20, "C" en la 10, y "T" en la 15.

Oligo 2: "T" en la posición 20, "C" en la 10, y "G" en la 15.

Oligo 3: "T" en la posición 20, "A" en la 10, y "T" en la 15.

Oligo 4: "T" en la posición 20, "A" en la 10, y "G" en la 15.

Se combinaron todas las sondas y se unieron a un único tipo de perla con codificación por colores usando los protocolos de los ejemplos anteriores. Cuando se añade diana monocatenaria a estas perlas que presentan sondas combinadas, una de las sondas proporcionará producto de elongación siempre que se alinee perfectamente con el polimorfismo designado.

**EJEMPLO 17: Polimorfismos designados en configuraciones heterocigotas y homocigotas:**

Para distinguir entre configuraciones heterocigotas y homocigotas, se aumenta el diseño del ejemplo anterior para que contenga un segundo conjunto de sondas para permitir la identificación del polimorfismo designado C/A alineado con los extremos 3' de las sondas, y para permitir la indicación de mutaciones heterocigotas frente a homocigotas.

Como en el ejemplo anterior, se prevén dos sitios polimórficos no designados en las posiciones 10 (C/A) y 15 (T/G). Sigue un resumen del diseño:

Conjunto n.º 1:

Oligo 1: "C" en la posición 20, "C" en la 10, y "T" en la 15.

Oligo 2: "C" en la posición 20, "C" en la 10, y "G" en la 15.

Oligo 3: "C" en la posición 20, "A" en la 10, y "T" en la 15.

Oligo 4: "C" en la posición 20, "A" en la 10, y "G" en la 15.

Conjunto n.º 2:

Oligo 5: "A" en la posición 20, "C" en la 10, y "T" en la 15.

Oligo 6: "A" en la posición 20, "C" en la 10, y "G" en la 15.

Oligo 7: "A" en la posición 20, "A" en la 10, y "T" en la 15.

Oligo 8: "A" en la posición 20, "A" en la 10, y "G" en la 15.

Se combinan los oligonucleótidos del conjunto n.º 1 y se unen a un único tipo de perla con codificación por colores (por ejemplo, verde) usando los protocolos de los ejemplos anteriores. Se combinaron los oligonucleótidos del conjunto n.º 2 y se unieron a un segundo tipo de perla con codificación por colores (por ejemplo, naranja) usando los protocolos de los ejemplos anteriores. Se combinaron las perlas y se inmovilizaron en la superficie del chip tal como se describió anteriormente. A continuación, se introdujo la diana, y se realizaron reacciones en chip tal como se describió en los ejemplos anteriores. Si solo se elongan las sondas en perlas verdes, el individuo tiene un alelo normal (o de tipo natural). Si solo se elongan las sondas en perlas naranjas, el individuo es homocigoto para la mutación. Si se elongan las sondas en perlas verdes así como naranjas, el individuo es heterocigoto para ese alelo. Este diseño es útil para la identificación de mutaciones conocidas y desconocidas.

**EJEMPLO 18 – Secuenciación de confirmación ("Nueva secuenciación")**

El diseño de la presente invención puede usarse para una nueva secuenciación de un área específica. Esta prueba puede usarse cuando la reacción de elongación de sonda en chip requiere confirmación, como en el caso de pruebas de reflejos para I506V, I507V, F508C y 7T en el panel de mutaciones de CF. La secuencia en cuestión, en este caso de 20 bases a 30 bases de longitud, se secuencia en chip mediante consulta multiplexada de todos los sitios variables. Esto se logra diseñando sondas específicas para ubicaciones ambiguas, y mediante combinación de sondas tal como se describe en los ejemplos 16 y 17.

**EJEMPLO 19: Elongación con un dNTP marcado y tres dNTP no marcados.**

Por medio de la incorporación de al menos un dNTP marcado, se detectan todos los productos de elongación en tiempo real y se identifican mediante su asociación con portadores de fase sólida codificados. Usando las condiciones de ensayo descritas en relación con los ejemplos 6 y 7, se proporcionaron tetrametil-rodamina-6-dCTP y dATP, dTTP y dGTP no marcados en una reacción de elongación para producir un producto de elongación marcado de manera fluorescente tal como se ilustra en la figura 18. Puede usarse un marcaje con colorante de dNTP (como

en dUTP marcado con BODIPI y dUTP marcado con Cy5). De manera similar, puede usarse cualquier otro dNTP marcado. La longitud del producto de elongación depende de la cantidad de dNTP marcado tolerado por la ADN polimerasa. Las enzimas disponibles muestran generalmente una mayor tolerancia para restos de modificación de cadena tales como biotina y digoxigenina que pueden hacerse reaccionar entonces en una segunda etapa con avidinas o anticuerpos marcados para lograr el marcaje indirecto de productos de elongación. Cuando se usan estas moléculas pequeñas, se producen productos de elongación que miden varios cientos de bases de longitud.

**EJEMPLO 20: Extensión con un ddNTP marcado, tres dNTP no marcados.**

Puede incorporarse ddCTP marcado con TAMRA para terminar la reacción de extensión, tal como se ilustra en la figura 19. Se realizaron reacciones en chip usando ddCTP marcado con TAMRA tal como se describe en los ejemplos 6 y 7. En una mezcla de reacción que contiene TAMRA-ddCTP y dTTP, dATP y dGTP no marcados, tras el apareamiento de la diana a la sonda coincidente, la reacción de extensión termina cuando se completa la incorporación del primer ddCTP. Esto puede producirse con la primera base incorporada, produciéndose una extensión de un producto de una sola base, o puede producirse después de haberse incorporado varios dNTP no marcados.

**EJEMPLO 21: Elongación con cuatro dNTP no marcados, detección mediante hibridación de sonda marcada**

Se elongan sondas usando un conjunto completo de cuatro tipos de dNTP no marcados, produciéndose en estas condiciones "nativas" para la polimerasa, productos de elongación que miden varios cientos de bases de longitud, limitados solo por la longitud del molde apareado y las condiciones de reacción en chip. Se detecta el producto de elongación, tras desnaturalización a alta temperatura, en una segunda etapa mediante hibridación con una sonda oligonucleotídica marcada cuya secuencia está diseñada para ser complementaria a una parte del producto de elongación. Este procedimiento se ilustra en la figura 20.

**EJEMPLO 22: Elongación con cuatro dNTP no marcados, detección mediante molde marcado**

Como con los protocolos habituales de uso rutinario en ensayos de hibridación multiplexada, la diana de ADN que va a analizarse puede marcarse a su vez en el transcurso de la PCR mediante la incorporación de sondas marcadas. En condiciones tales como las descritas en los ejemplos 6 y 7, se aparea una diana marcada con sondas. Se elongan sondas con coincidencia usando dNTP no marcados. Tras completarse la reacción de elongación, se realiza la detección estableciendo la temperatura ( $T_{det}$ ) en un valor por encima de la temperatura de fusión ( $T_{sin\ coincidencia}$ ) del complejo formado por sonda no coincidente y diana, pero por debajo de la temperatura de fusión ( $T_{coincidencia}$ ) del complejo formado por diana y sonda coincidente, y por tanto alargada. Este último complejo, que presenta un largo tramo de región de dúplex, será significativamente más estable que el primero de modo que ( $T_{sin\ coincidencia} < T < (T_{coincidencia})$ ). Los valores típicos para T están en el intervalo de 70 °C a 80 °C. En estas condiciones, solo el complejo formado por sonda elongada y diana será estable, mientras que el complejo formado por diana y sonda no coincidente, y por tanto se perderá la señal de fluorescencia del portador de fase sólida correspondiente. Es decir, a diferencia de otros diseños, lo que se detecta es la disminución de la intensidad de señal asociada con la sonda no coincidente, más que el aumento de intensidad asociado con la sonda con coincidencia. La figura 21 ilustra el diseño que elimina la necesidad de dNTP o ddNTP marcados. Esto es útil en las realizaciones preferidas de esta invención, en las que dNTP o ddNTP marcados pueden absorber de manera no específica para partículas codificadas, aumentando de ese modo el fondo de la señal y disminuyendo el poder de discriminación de los ensayos. Además, usando una diana marcada, este protocolo es compatible directamente con métodos de análisis de polimorfismos mediante hibridación de oligonucleótidos específicos de secuencia.

**EJEMPLO 23: Amplificación de señal en chip en tiempo real**

Un aparato de control de temperatura habitual usado con una geometría plana tal como el que se ilustra en la figura 22 permite la aplicación de perfiles de temperatura programados a una extensión multiplexada de SSP. En las condiciones de los ejemplos 6 y 7, un molde dado media en la elongación de una sonda en cada uno de múltiples ciclos repetidos de "desnaturalización-apareamiento-extensión". En el primer ciclo, una molécula diana se une a una sonda y la sonda se elonga o se extiende. En el siguiente ciclo, la molécula diana se disocia de la primera sonda en la fase de "desnaturalización" (a una temperatura típica de 95 °C), luego se aparea con otra molécula de sonda en la fase de "apareamiento" (a una temperatura típica de 55 °C) y media en la extensión de la sonda en la fase de "extensión" (a una temperatura típica de 72 °C). En N ciclos, cada molde media en la extensión de N sondas, un protocolo correspondiente a la amplificación lineal (figura 30). En una realización preferida de esta invención, en la que se usan alineamientos planos de perlas codificadas para presentar sondas en una reacción de extensión multiplexada, se aplica una serie de ciclos de temperatura a la mezcla de reacción contenida entre dos sustratos planos, paralelos. Un sustrato permite el acceso óptico directo y la obtención de imágenes directa de todo un alineamiento de perlas codificadas. La realización preferida proporciona amplificación en tiempo real permitiendo que se registren imágenes de todo el alineamiento de perlas instantáneamente al completarse cada ciclo.

Puede usarse ADN genómico, mitocondrial u otro enriquecido para la detección directa usando amplificación lineal en chip sin amplificación específica de secuencia. Esto es posible cuando se proporciona en la muestra una cantidad

de ADN suficiente para la detección. En el formato de alineamiento de perlas, si se requieren  $10^4$  fluoróforos para la detección de la señal de cada perla, 30 ciclos de amplificación lineal reducirán el número requerido a  $\sim 300$ . Suponiendo el uso de 100 perlas del tipo requerido dentro del alineamiento, el número total requerido de fluoróforos sería de  $\sim 10^5$ , un número disponible normalmente en muestras clínicas. Por ejemplo, las reacciones PCR típicas para tipificación molecular clínica de HLA se realizan con de 0,1 a 1  $\mu\text{g}$  de ADN genómico. Un  $\mu\text{g}$  de ADN genómico humano corresponde a aproximadamente  $10^{-18}$  moles, por tanto,  $6 \times 10^5$  copias del gen de interés. Esta pequeña cantidad de muestra requerida por la plataforma miniaturizada de alineamiento de perlas y amplificación en chip hace que sea posible el uso directo de muestras antes de la PCR. Esto no solo simplifica la preparación de muestras sino que, de manera más importante, elimina la complejidad de la PCR multiplexada, frecuentemente una etapa limitante de la velocidad en el desarrollo de análisis genético multiplexado.

#### **EJEMPLO 24: Construcción de una biblioteca de sondas para polimorfismos designados y no seleccionados para el análisis de mutaciones de CF**

Para aumentar la especificidad de sondas de elongación y evitar falsos positivos, se diseñaron las sondas de elongación para albergar todos los polimorfismos conocidos presentes en una secuencia diana. Además, se diseñaron cebadores para PCR teniendo en cuenta los polimorfismos designados y no designados.

Se seleccionó la mutación G/C en la posición 1172 de R347P en el exón 7 dentro del gen de CFTR, una de 25 mutaciones dentro del panel de examen de portadores de la población habitual para fibrosis quística, como polimorfismo designado. Existen 3 mutaciones de CF dentro del exón 7 incluidas en el panel de mutaciones para el examen de portadores de la población general (<http://www.faseb.org/genetics/acmg>). Se ha notificado un polimorfismo G/T/A en el mismo sitio (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>), y además, se han notificado polimorfismos no designados en las posiciones 1175, 1178, 1186, 1187 y 1189. Todos estos polimorfismos pueden interferir en la elongación de sonda deseada.

A continuación se ilustra la construcción de un conjunto de sondas degeneradas para eMAP, para R347P (indicado mediante la **G** en negrita) que está rodeado por numerosos polimorfismos no designados, indicados mediante letras en mayúsculas:

	5'	3'
<b>Secuencia diana normal para la elongación:</b>	Gca Tgg Cgg tca ctC GgC a	
<b>Conjunto de sondas de elongación degeneradas:</b>	Ngt Ycc Ycc agt gaY RcY t	
	3'	5'

donde N = a, c, g o t; R (purinas) = a o g e Y (pirimidinas) = c o t, implicando una degeneración de 128 para el conjunto.

**Combinación de cebadores para análisis de mutaciones** - el principal objetivo en la construcción de un conjunto degenerado es proporcionar al menos una secuencia de sonda que coincida con la secuencia diana de manera suficientemente próxima como para garantizar apareamiento y elongación de sonda. Aunque esto puede lograrse siempre, en principio, proporcionando todo el conjunto de posibles secuencias de sonda asociadas con el polimorfismo designado, como en el modo de construcción preferido de conjuntos de cobertura, el grado de degeneración de ese conjunto, 128 en el ejemplo, conduciría a una reducción correspondiente de la intensidad de señal de ensayo en dos órdenes de magnitud si todas las sondas tuvieran que situarse sobre un único tipo de perla para la combinación completa de sondas. La división de las combinaciones mejoraría la situación distribuyendo el conjunto de sondas sobre múltiples tipos de perla, pero solo a expensas de aumentar la complejidad del alineamiento.

En primer lugar, se dividió la combinación de sondas en un mínimo de dos o más combinaciones, proporcionando cada combinación la composición complementaria, una posición de sonda M (es decir, el extremo terminal 3' de la sonda), para cada una de las posibles composiciones del sitio polimórfico designado. En el ejemplo, se requieren cuatro de tales combinaciones para una identificación positiva de la composición de diana designada. A continuación, se examinaron los sitios polimórficos no designados sucesivamente en orden de distancia desde el sitio designado.

Entre estas, las posiciones dentro de la región TEI son de especial importancia para garantizar la elongación. Es decir, se construye cada combinación para que contenga todas las posibles composiciones de sonda para aquellos sitios no designados que se encuentran dentro de la región TEI. Finalmente, como con la construcción de sondas degeneradas para la clonación y la secuenciación de genes variables, se minimiza la degeneración del conjunto

colocando bases neutras tales como inosina en aquellas posiciones de sonda que están ubicadas fuera de la región TEI región siempre que se sepa que estas nunca se yuxtaponen a G en la diana. En el ejemplo, los polimorfismos no designados en las posiciones de sonda M-16 y M-18 cumplen las condiciones. Es decir, la mínima degeneración de cada una de las cuatro combinaciones aumentaría hasta cuatro, produciendo una reducción correspondiente de la intensidad de señal. Como directriz empírica, la reducción de señal se limitará preferiblemente a un factor de ocho.

En total, cuatro combinaciones, cada asignada de manera única a un tipo de perla y que contiene ocho secuencias de sonda degeneradas, cubrirán la secuencia diana. Estas secuencias son análogas a las mostradas a continuación para combinaciones variables en M:

Combinación de sondas para la mutación de CF, R347P:

R347P	Cgt	Acc	Gcc	agt	gaG	GgC
	3'					5'
COMBINACIÓN 1	Cgt	Acc	Gcc	agt	gaG	IgI
	Cgt	Acc	Gcc	agt	gaC	IgI
	Cgt	Acc	Ccc	agt	gaG	IgI
	Cgt	Acc	Ccc	agt	gaC	IgI
COMBINACIÓN 2	Cgt	Tcc	Gcc	agt	gaG	IgI
	Cgt	Tcc	Gcc	agt	gaC	IgI
	Cgt	Tcc	Ccc	agt	gaG	IgI
	Cgt	Tcc	Ccc	agt	gaC	IgI
	Ggt	Acc	Gcc	agt	gaG	IgI
	Ggt	Acc	Gcc	agt	gaC	IgI
	Ggt	Acc	Ccc	agt	gaG	IgI
	Ggt	Acc	Ccc	agt	gaC	IgI
COMBINACIÓN 3	Ggt	Tcc	Gcc	agt	gaG	IgI
	Ggt	Tcc	Gcc	agt	gaC	IgI
	Ggt	Tcc	Ccc	agt	gaG	IgI
	Ggt	Tcc	Ccc	agt	gaC	IgI
	Agt	Acc	Gcc	agt	gaG	IgI
	Agt	Acc	Gcc	agt	gaC	IgI
	Agt	Acc	Ccc	agt	gaG	IgI
	Agt	Acc	Ccc	agt	gaC	IgI
COMBINACIÓN 4	Agt	Tcc	Gcc	agt	gaG	IgI
	Agt	Tcc	Gcc	agt	gaC	IgI
	Agt	Tcc	Ccc	agt	gaG	IgI
	Agt	Tcc	Ccc	agt	gaC	IgI
	Tgt	Acc	Gcc	agt	gaG	IgI
	Tgt	Acc	Gcc	agt	gaC	IgI
	Tgt	Acc	Ccc	agt	gaG	IgI
	Tgt	Acc	Ccc	agt	gaC	IgI
	Tgt	Tcc	Gcc	agt	gaG	IgI
	Tgt	Tcc	Gcc	agt	gaC	IgI
	Tgt	Tcc	Ccc	agt	gaG	IgI
	Tgt	Tcc	Ccc	agt	gaC	IgI

En general, el tipo de los polimorfismos no designados en la cadena antisentido puede diferir del que hay en la cadena sentido, y entonces puede ser ventajoso construir conjuntos de sondas degenerados para la cadena antisentido. Como con la construcción de sondas de elongación degeneradas, pueden construirse conjuntos de sondas de hibridación degenerados mediante reglas análogas para minimizar la degeneración.

#### 5 **EJEMPLO 25: Análisis de mutaciones de CF “de tubo único” mediante eMAP**

Este ejemplo se refiere a métodos y composiciones para realizar un ensayo de eMAP, en el que las etapas de apareamiento y elongación tienen lugar en el reactor. Esta realización es útil porque obvia la necesidad de transferencia de muestra entre reactores así como procedimientos de purificación o extracción, simplificando por tanto el ensayo y reduciendo la posibilidad de error. Sigue un protocolo a modo de ejemplo no limitativo.

Se amplificó ADN genómico extraído de varios pacientes con cebadores correspondientes en una reacción PCR múltiplex (mPCR). Las condiciones de PCR y composiciones de reactivos fueron las siguientes.

15 **DISEÑO DE CEBADORES:** Se sintetizaron cebadores sentido sin ninguna modificación y cebadores antisentido con “fosfato” en el extremo 5'. Se realizó PCR múltiplex en dos grupos. La amplificación del grupo uno incluye los exones 5, 7, 9, 12, 13, 14B, 16, 18 y 19. Las amplificaciones para el grupo 2 incluyen cebadores para los exones 3, 4, 10, 11, 20, 21 y el intrón 19. Se incluyó la modificación con el grupo fosfato en 5' en los exones 5, 7 y 11 en el cebador directo para usar diana antisentido para la elongación de sonda. Mientras que se usó la diana sentido para todos los demás amplicones colocando un grupo fosfato en el cebador inverso.

#### Composición de mezcla maestra de PCR

25 Para 10 ul de reacción/muestra:

Componentes	Volumen (μl)
Tampón para PCR 10X	1,0
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0,7
dNTP (2,5 mM)	2,0
Mezcla de cebadores (Múltiplex 10x)	1,5
ADN polimerasa Taq	0,3
ddH <sub>2</sub> O	1,5
ADN	0,3
<b>Total</b>	<b>10</b>

#### 30 Ciclos de PCR

94 °C 5 min, 94 °C 10 s, 60 °C 10 s, 72 °C 40 s

72 °C 5 min., número de ciclos: 28-35

35 Puede ajustarse el volumen de reacción según la necesidad experimental. Se realizan amplificaciones usando un ciclador térmico 9600 de Perkin Elmer. Se determinaron las concentraciones de cebador óptimas para cada par de cebadores. Tras las amplificaciones, se retiraron 5 ul del producto para electroforesis en gel. Se generaron dianas de ADN monocatenario tal como sigue: se añadieron dos microlitros de exonucleasa a 5 μl de producto de PCR, se incubó a 37 °C durante 15 minutos y se desnaturalizó la enzima a 80 °C durante 15 minutos. Después de la desnaturalización, a 1 μl de tampón de exonucleasa 10X se le añadió con 1 μl de exonucleasa λ (5 U/μl) y se incubó a 37 °C durante 20 minutos y se detuvo la reacción mediante calentamiento a 75 °C durante 10 minutos.

#### 45 **ELONGACIÓN EN CHIP**

Se acoplaron sondas de tipo natural y mutantes para 26 mutaciones de CF en la superficie de la perla y se ensamblaron en el alineamiento de chip. También se dividieron las sondas en dos grupos. Se ensambló un tercer grupo para la prueba de reflejos incluyendo los polimorfismos 5T/7T/9T.

50 Grupo de elongación 1, 31 grupos en total en la superficie del chip.

N.º de agrupación de perlas	Mutación
1	G85E-WT
2	G85E-M

ES 2 661 167 T3

3	621+1G>T-WT
4	621+1G>T-M
5	R117H-WT
6	R117H-M
7	$\beta$ -actina
8	I148T-WT
9	I148T-M
10	508-WT
11	F508
12	I507
13	G542X-WT
14	G542X-M
15	G551D-WT
16	G551D-M
17	R553X-WT
18	R553X-M
19	BIOTINA
20	1717-1G>A-WT
21	1717-1G>A-M
22	R560T-WT
23	R560T-M
24	3849+10kbT-WT
25	3849+10kbT-M
26	W1282X-WT
27	W1282X-M
28	N1303K-WT
29	N1303K-M
30	OLIGO-C

Grupo de elongación 2, 28 grupos en total en la superficie del chip.

5

<u>N.º de agrupación</u>	Mutación
1	711+1G>T-WT
2	711+1G>T-M
3	3 R334W-WT 4 5 6 7
4	R334W-M
5	1078delT-WT
6	1078delT-M
7	$\beta$ -actina
8	R347P-WT
9	R347P-M
10	A455E-WT
11	A455E-M
12	1898+1G>A-WT
13	1898+1G>A-M
14	2184delA-WT
15	2184delA-M
16	2789+5G-WT
17	2789+5G-M
18	BIOTINA
19	3120+1G>A-WT
20	3120+1G>A-M
21	R1162X-WT
22	R1162X-M
23	3659delC-WT
24	3659delC-M
25	D1152-WT
26	D1152-M
27	OLIGO-C

mPCR, grupo 2:

N.º de agrupación	Mutación
1	β-actina
1	Oligo C
2	5T
3	7T
4	9T
5	Biotina

5 Se ha optimizado el tampón de reacción de elongación para su uso en ensayos de elongación de diana uniplex y/o múltiplex y se compone de, Tris-HCl (pH 8,5) 1,2 mM, EDTA 1 uM, DTT 10 mM, KCl 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 13 μM, 2-mercaptoetanol 10 μM, glicerol al 0,5 %, Tween-20 al 0,05 % y Nonidet al 0,05 %. Se añadieron diez microlitros de reacción de elongación mezcla en cada chip que contenía tampón de reacción 1X 0,1 mM de dNTP marcado, 1,0 mM de mezcla de dNTP, 3 U de ADN polimerasa y 5 μl (~5 ng) de ADN diana (muestra de paciente). Se añadió la mezcla de reacción en la superficie del chip y se incubó a 53 °C durante 15 min y luego a 60 °C durante 3 min. Se lavó el chip con tampón de lavado que contenía ADS al 0,01 %, se cubrió con un cubreobjetos limpio y se analizó usando un sistema de obtención de imágenes de Bioarray Solutions. Se analizan las imágenes para determinar la identidad de cada una de las sondas elongadas.

15 **EJEMPLO 26: Análisis de mutaciones de CF – Elongación en una sola etapa en chip de tubo único.**

Se acoplaron sondas para 26 mutaciones de CF y controles en la superficie de 51 tipos de perlas. Se ensamblaron las perlas acopladas a sonda en la superficie de un único chip. Se extrajo ADN genómico de varios pacientes y se amplificó con cebadores correspondientes en una reacción PCR multiplexada (mPCR), tal como se describe en el ejemplo anterior. Tras la amplificación, se produjeron productos de ADN monocatenario usando exonucleasa λ. Se añadieron productos de PCR individuales o combinados (~5 ng) a una mezcla de reacción que contenía tampón de reacción, análogos de desoxinucleótidos (dNTP) (NEN Life Sciences), cada tipo de dNTP no marcado, y ADN polimerasa (Amersham Pharmacia Biotech, NJ). Se permitió que avanzase la reacción de apareamiento / elongación en un ciclador de temperatura controlada. Las etapas de temperatura fueron las siguientes: 20 minutos a 53 °C, y 3 minutos a 60 °C. Entonces se lavó el alineamiento de perlas con dSH<sub>2</sub>O que contenía SDS al 0,01 % durante de 5 a 15 minutos. Se registró una imagen que contenía la señal de fluorescencia de cada perla dentro del alineamiento usando un microscopio de fluorescencia y una cámara CCD. Se analizaron las imágenes para determinar la identidad de cada una de las sondas elongadas.

30 Se proporciona a continuación la composición del chip de perla que contenía 26 mutaciones de CF.

Grupo de elongación 4, 51 grupos en total

N.º de agrupación	Mutación
1	β-actina
2	G85E-WT
3	G85E-M
4	621+1G>T-WT
5	621+1G>T-M
6	R117H-WT
7	R117H-M
8	I148T-WT
9	I148T-M
10	711+1G>T-WT
11	711+1G>T-M
12	A455E-WT
13	A455E-M
14	508-WT
15	F508
16	I507
17	R533-WT
18	R533-M
19	G542-WT
20	G542-M
21	G551D-WT
22	G551D-M
23	R560-WT
24	R560-M

25	1898+1G-WT
26	1898+1G-M
27	2184delA-WT
28	2184delA-M
29	2789+5G>A-WT
30	2789+5G>A-M
31	3120+1G-WT
32	3120+1G-WT
33	D1152-WT
34	D1152-M
35	R1162-WT
36	R1162-M
37	OLIGO-C
38	W1282X-WT
39	W1282-M
40	N1303K-WT
41	N1303-M
42	R334-WT
43	R334-M
44	1078delT-WT
45	1078delT-M
46	3849-10kb-WT
47	3849-10kb-M
49	1717-1G>A-WT
50	1717-1G>A-WT
51	Biotina

**EJEMPLO 27: Identificación de deleciones y/o inserciones de tres o más bases mediante eMAP:**

5 Se usó elongación para analizar mutaciones con deleciones o inserciones de más de 3 bases. Se diseñaron sondas colocando bases mutantes 3-5 bases antes del extremo 3'. Se diseñaron las sondas de tipo natural para que o bien incluyesen o bien excluyesen bases mutantes (terminando antes de las mutaciones). Lo siguiente es un ejemplo de mutaciones provocadas por una deleción de ATCTC y/o inserción de AGGTA. Los diseños de sonda fueron los siguientes:

- 10
1. WT1- -----ATCTCgca
  2. WT2- -----
  - 15 3. M1- -----gca (deleción solo)
  4. M2- -----AGGTAgca (deleción e inserción)

20 O bien se acoplaron sondas de tipo natural en la superficie de perlas codificadas de manera diferencial o bien se combinaron tal como se describe en esta invención. Se acoplaron sondas para la mutación 1 (M1: deleción) y 2 (M2: inserción) en diferentes perlas. Ambas sondas de tipo natural proporcionan información similar, mientras que las sondas mutantes pueden mostrar el tipo de mutación identificada en una muestra específica.

**EJEMPLO 28. Sondas de horquilla**

25 En determinadas realizaciones de esta invención, las sondas de cebado presentadas en perlas forman estructuras en horquilla. Una estructura en horquilla puede incluir un fragmento de secuencia en el extremo 5' que es complementario a la región TEI y la secuencia DA, tal como se muestra en la figura 23. Durante una reacción de hibridación competitiva, la estructura en horquilla se abre siempre que la región DA hibrida preferentemente con la secuencia diana. En estas condiciones, la región TEI se alinearé con el sitio polimórfico designado y tendrá lugar la reacción de elongación. Puede usarse la naturaleza competitiva de la reacción para controlar el nivel de tolerancia de las sondas.

35 **EJEMPLO 29 Análisis de mutaciones de fibrosis quística y enfermedad de los judíos asquenazíes mediante elongación multiplexada de oligonucleótidos específicos de alelo presentados en alineamientos de perlas personalizados**

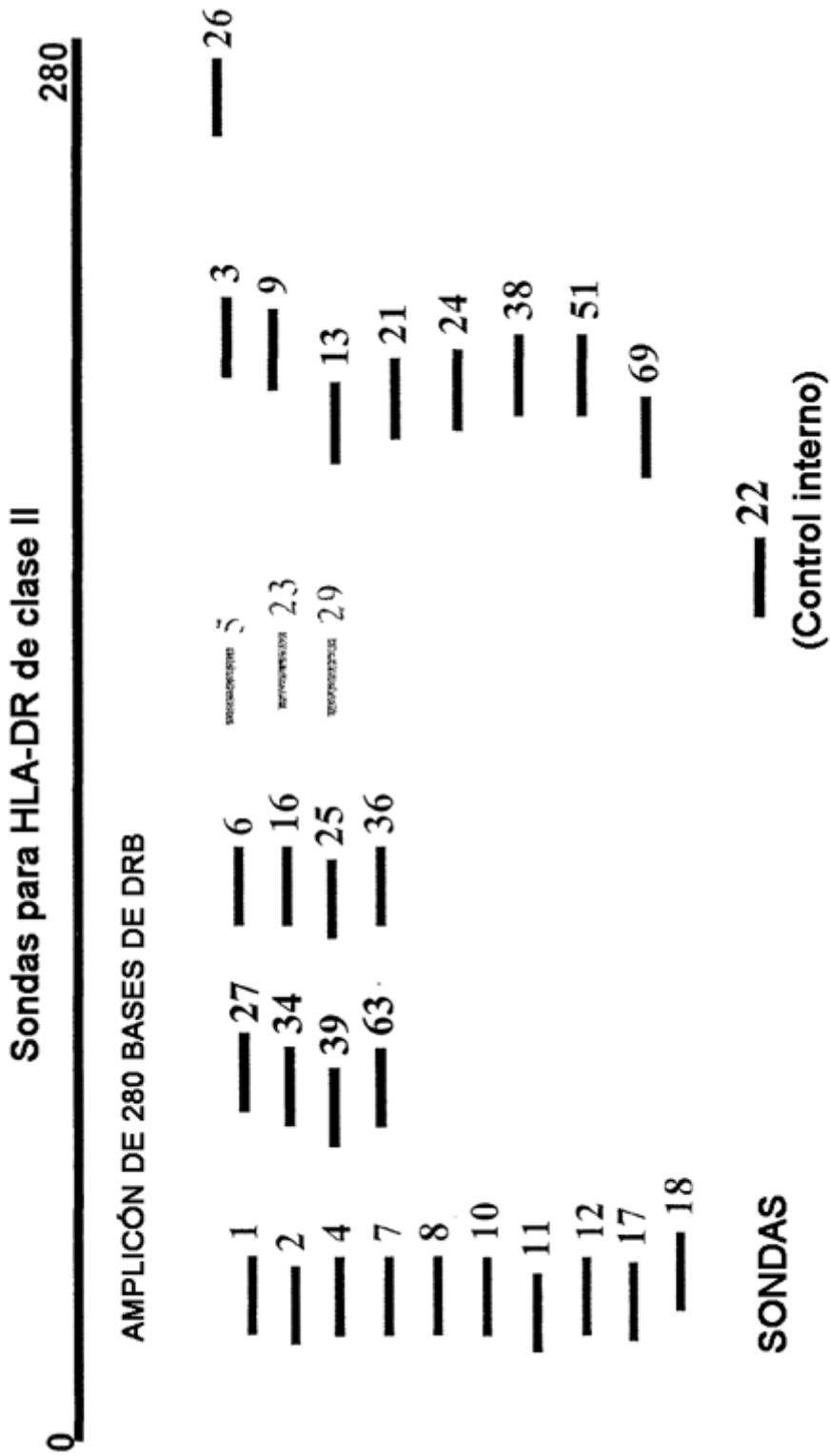
40 Se ha evaluado un nuevo ensayo para el análisis multiplexado de alta producción de mutaciones para un panel ACMG+ de mutaciones de fibrosis quística. Además, también se ha desarrollado un panel para la enfermedad de los judíos asquenazíes para detectar mutaciones comunes que se sabe que provocan enfermedad de Tay-Sachs,

Canavan, Gaucher, Niemann-Pick, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi, disautonomía familiar y mucopolidosis IV.

- 5 En análisis multiplexado de polimorfismos mediado por elongación (eMAP), se unen oligonucleótidos específicos de alelo (ASO) que contienen secuencias 3' terminales variables a perlas codificadas por colores que se alinean a su vez en chips de silicio. Se detectan simultáneamente los productos de elongación para secuencias normales y mutantes mediante obtención de imágenes instantánea de señales de fluorescencia procedentes de todo el alineamiento.
- 10 En este ejemplo, se usaron varios cientos de muestras clínicas de paciente para evaluar chips de perla de ACMG CF. Tal como se muestra en la figura 24, el ensayo puntuó correctamente todas las mutaciones identificadas mediante análisis de ADN habitual.
- 15 En resumen, se usó un ensayo de elongación multiplexada que comprende perlas personalizadas para estudiar las mutaciones correspondientes a paneles ACMG+ y de enfermedad de judíos asquenazíes. Pueden usarse las perlas personalizadas para análisis de ADN y proteína. El uso de estas perlas personalizadas es ventajoso por varios motivos incluyendo (1) obtención de imágenes instantánea: el tiempo total necesario para el ensayo es un plazo de dos horas (2) adquisición y análisis de imágenes automatizados (3) miniaturización, que significa bajo consumo de reactivos, y (4) se sintetizan los chips de perlas usando tecnología de oblea, de modo que pueden producirse en serie millones de chips, si se desea.
- 20

**REIVINDICACIONES**

1. Método de determinación simultánea de la composición de nucleótidos en sitios polimórficos designados ubicados dentro de una o más secuencias de nucleótidos diana, comprendiendo dichas secuencias de nucleótidos diana un polimorfismo no designado, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:
- (a) proporcionar un conjunto de pares de cebadores oligonucleotídicos, siendo capaz cada par de aparearse con cadenas de polinucleótidos complementarias para delinear una región de la diana correspondiente que incluye al menos un sitio polimórfico designado;
- (b) poner en contacto dicho conjunto de cebadores oligonucleotídicos con dichas dianas en condiciones que permiten la formación de amplicones con sitios polimórficos designados correspondientes a los sitios polimórficos designados en dianas correspondientes, comprendiendo cada amplicón una cadena sentido de amplicón correspondiente a una cadena sentido diana y una cadena antisentido de amplicón correspondiente a una cadena antisentido diana;
- (c) proporcionar uno o más conjuntos de sondas degeneradas, en el que el conjunto contiene sondas degeneradas capaces de aparearse con una subsecuencia de dicha una o más secuencias de cadena sentido y cadena antisentido de amplicón ubicadas dentro de un intervalo de proximidad a un sitio polimórfico designado en la cadena sentido o antisentido;
- (d) poner en contacto el conjunto de sondas con dicha una o más secuencias de nucleótidos de amplicón para permitir la formación de complejos de hibridación colocando un sitio de consulta dentro de una secuencia de sonda en alineación directa con el sitio polimórfico designado en la cadena sentido y antisentido;
- (e) incubar cada complejo de hibridación con un ADN polimerasa capaz de extender las sondas dentro del complejo:
- (i) determinar la presencia de una coincidencia entre el sitio de consulta y un sitio polimórfico designado mediante elongación de sonda; y
- (ii) determinar la presencia de una falta de coincidencia entre el sitio de consulta y un sitio polimórfico designado por la falta de elongación de sonda; determinando de ese modo la composición del sitio polimórfico designado;
- en el que el uno o más conjuntos de sondas se inmovilizan sobre micropartículas codificadas, ensamblándose las micropartículas codificadas en un alineamiento codificado al azar.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (e) comprende añadir uno o más desoxinucleótidos trifosfato.
3. Método según la reivindicación 2, en el que la polimerasa carece de actividad exonucleasa 3' -> 5'.
4. Método según la reivindicación 2, en el que se marca al menos uno de los desoxinucleótidos trifosfato para generar una firma detectable ópticamente asociada con el producto de elongación.
5. Método según la reivindicación 1, en el que se une un marcador óptico a una o más sondas apareando con las sondas una diana marcada de manera fluorescente para formar un complejo de hibridación fluorescente.
6. Método según la reivindicación 5, que comprende además identificar productos de elongación detectando la estabilidad de firmas ópticas en condiciones en las que la temperatura se fija a un valor por encima de la temperatura de fusión de cualquier complejo de hibridación formado por sonda no coincidente y diana pero por debajo de la temperatura de fusión de cualquier complejo de hibridación extendido formado por sonda elongada y diana.
7. Método según la reivindicación 1, en el que los alineamientos se disponen de una manera codificada espacialmente.
8. Método según la reivindicación 5, en el que se detecta el cambio en la firma óptica y se determina la identidad de partículas.



**Fig. 1A**



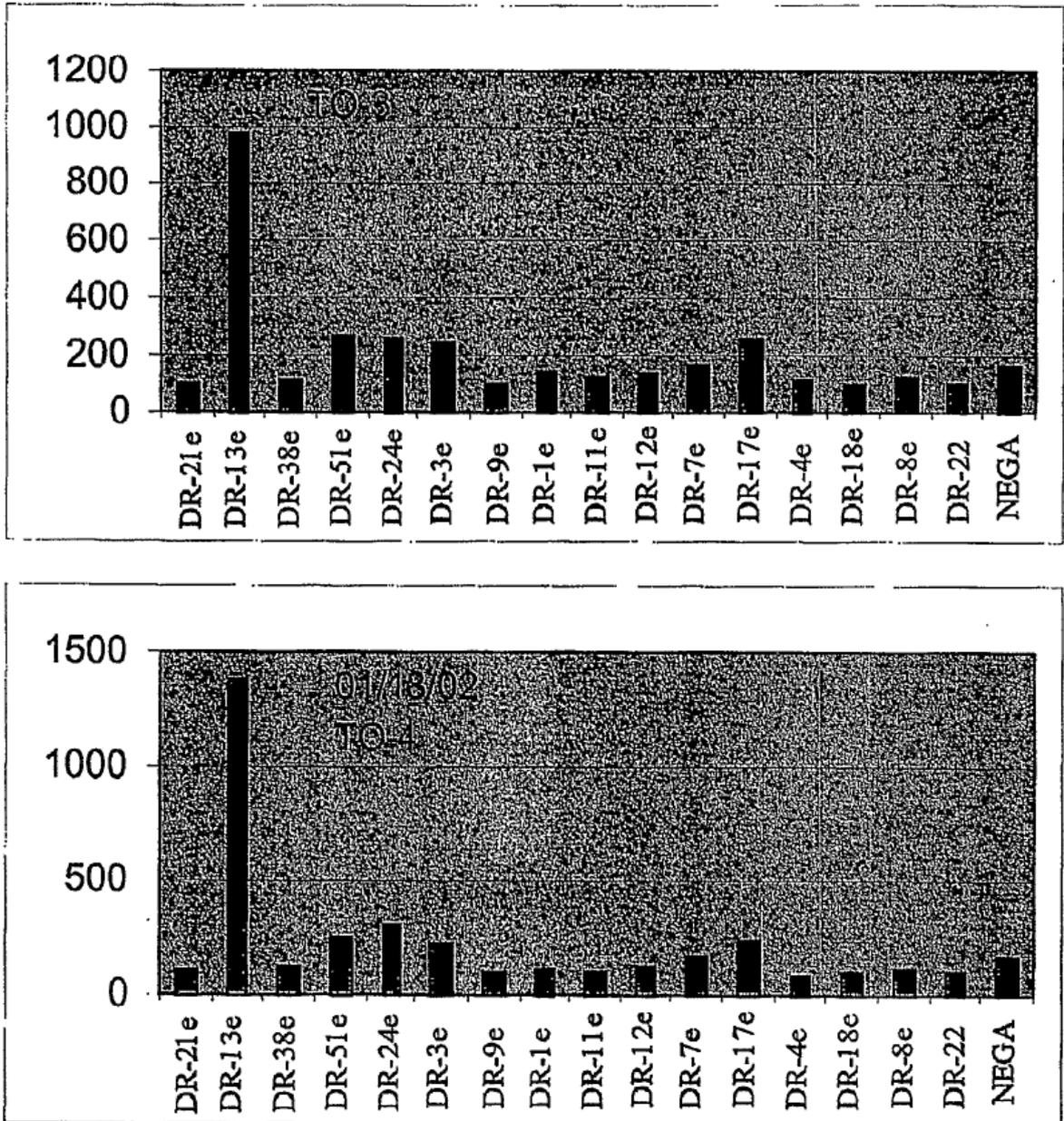
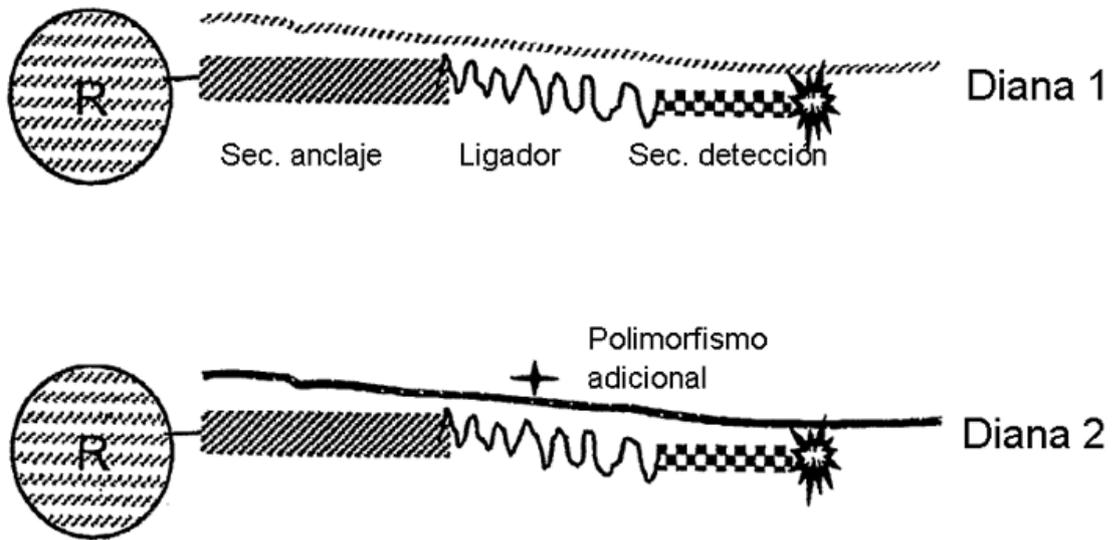


Fig. 2



**Fig. 3**

		Cebador 1	Cebador 2	Cebador 3	Cebador 4
Combinación 1	Alelo A	+		+	
	Alelo B		+		+
	<b>Total</b>	+	+	+	+
Combinación 2	Alelo C	+	+		
	Alelo D			+	+
	<b>Total</b>	+	+	+	+

**Fig. 4**

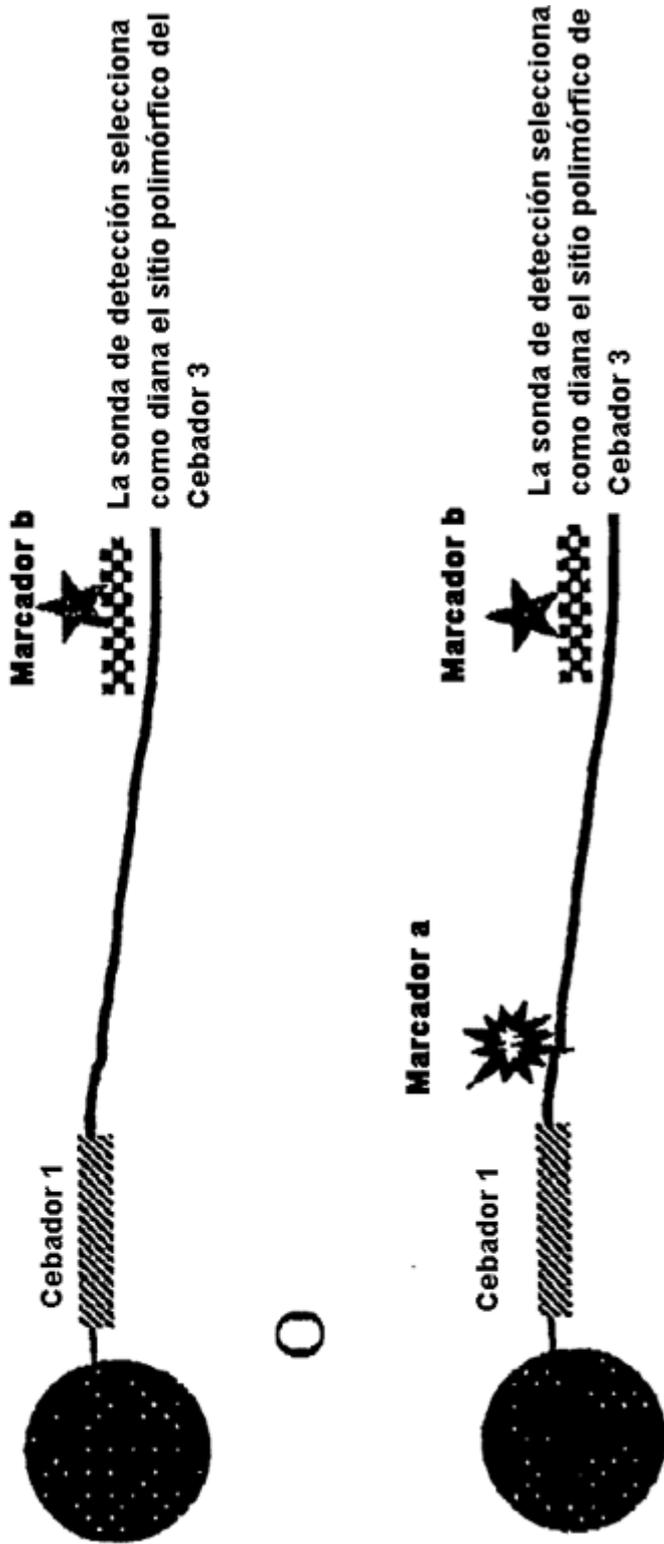


Fig. 5

Exón 3 de clase I B

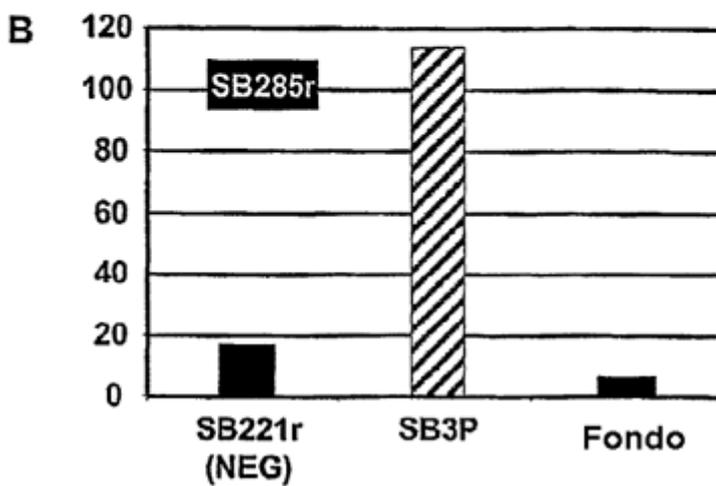
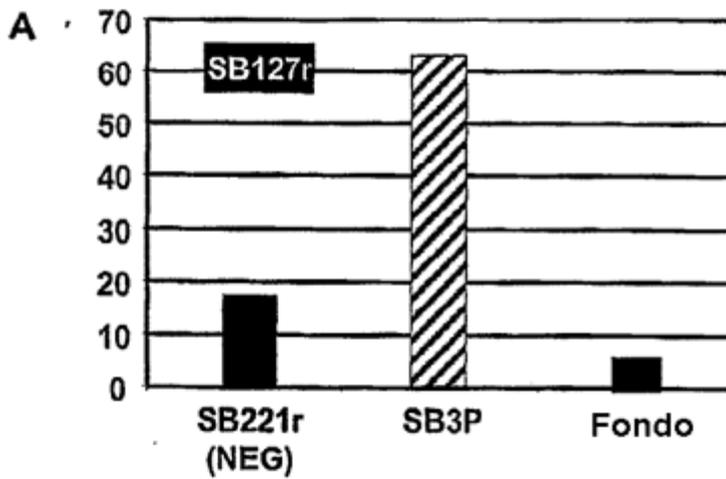
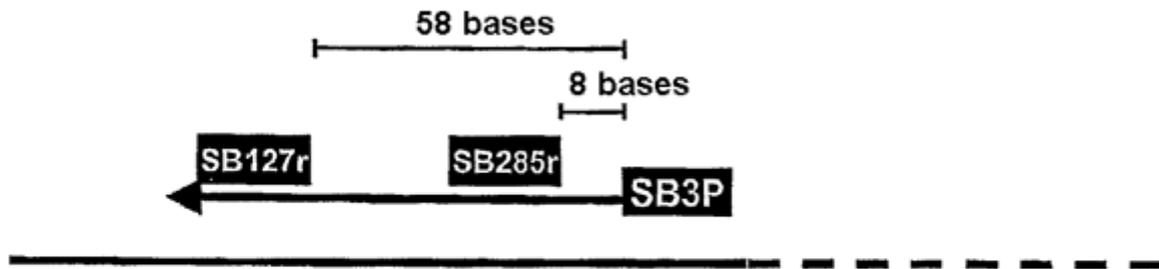


Fig. 6

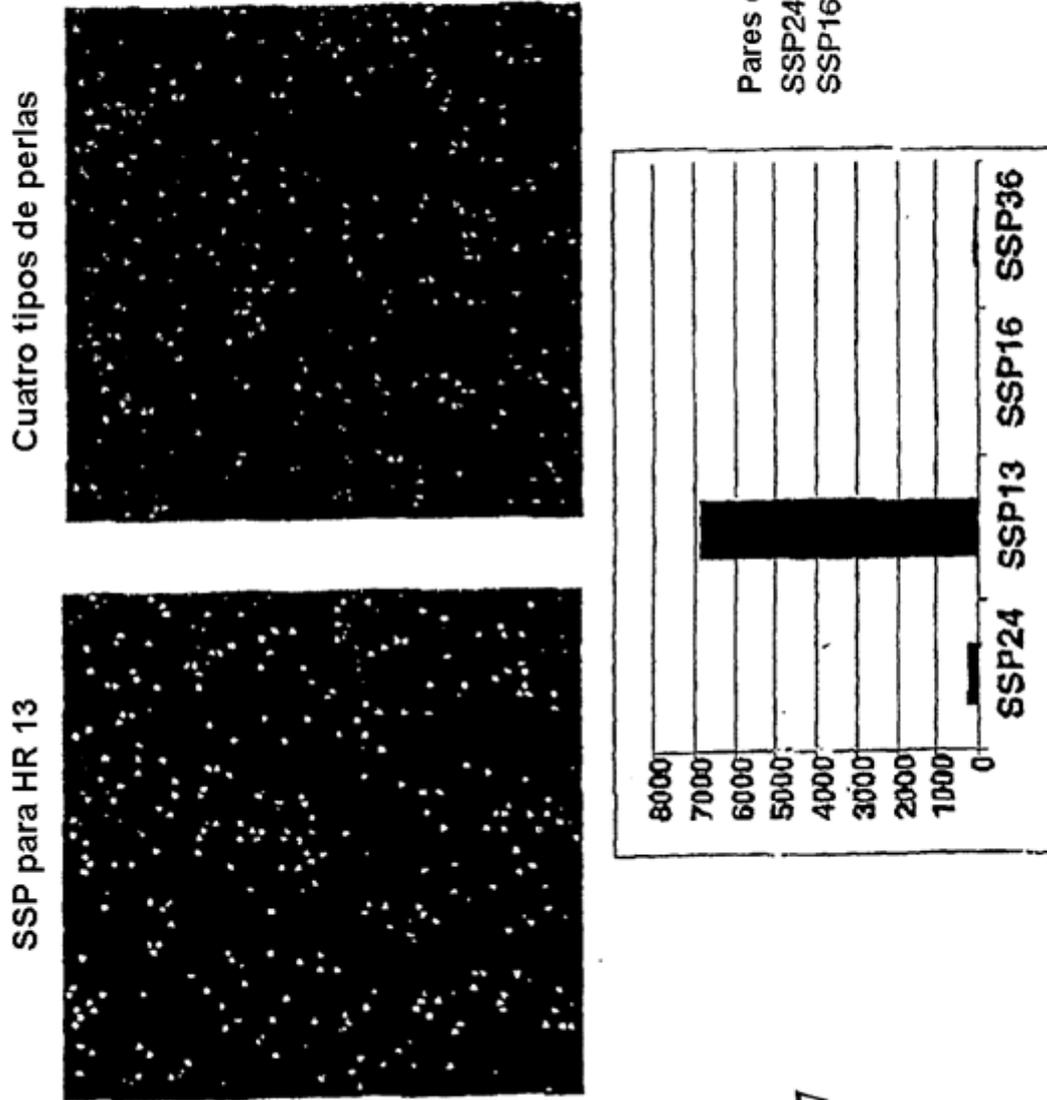


Fig. 7

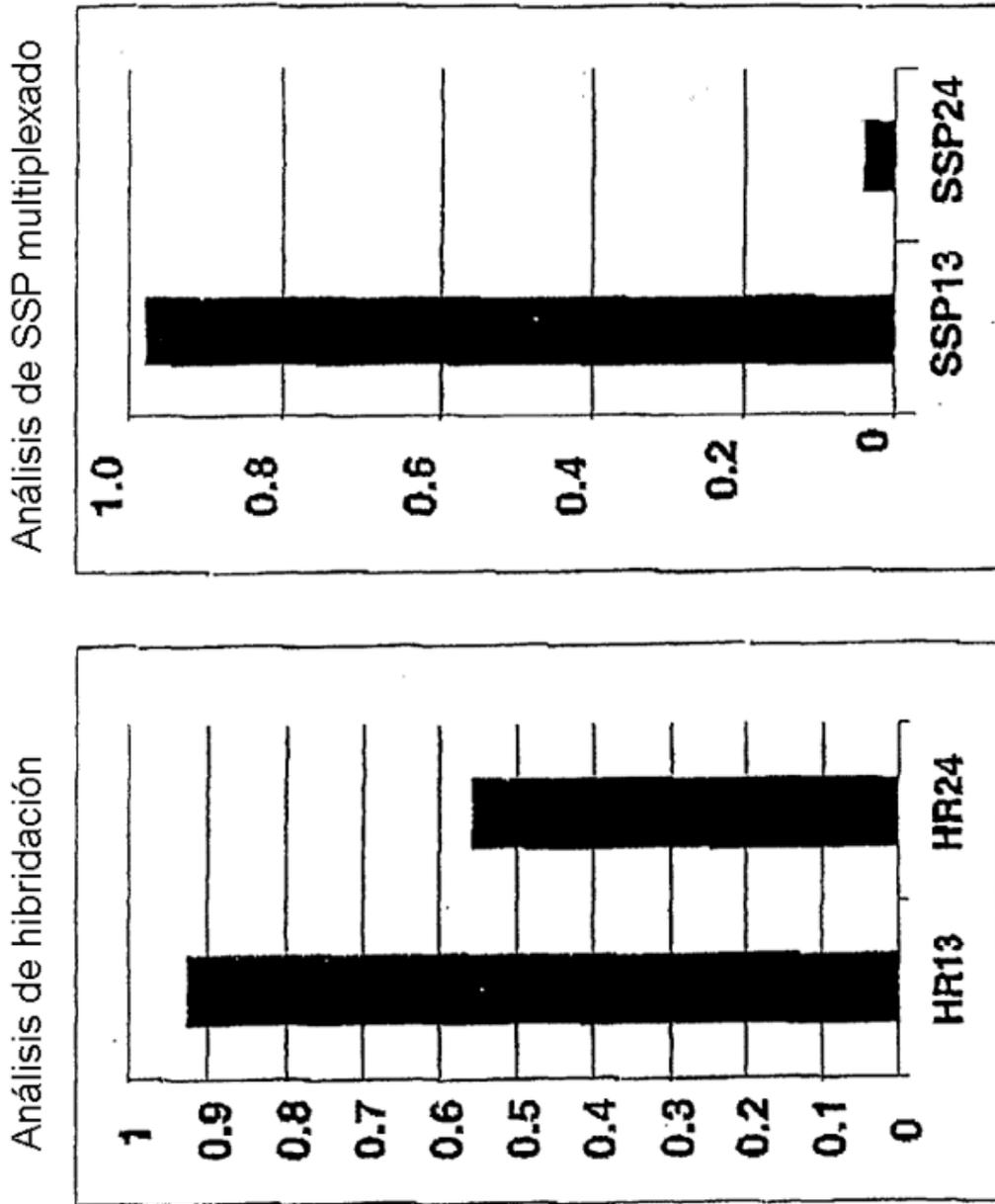


Fig. 8

Línea celular: WT51

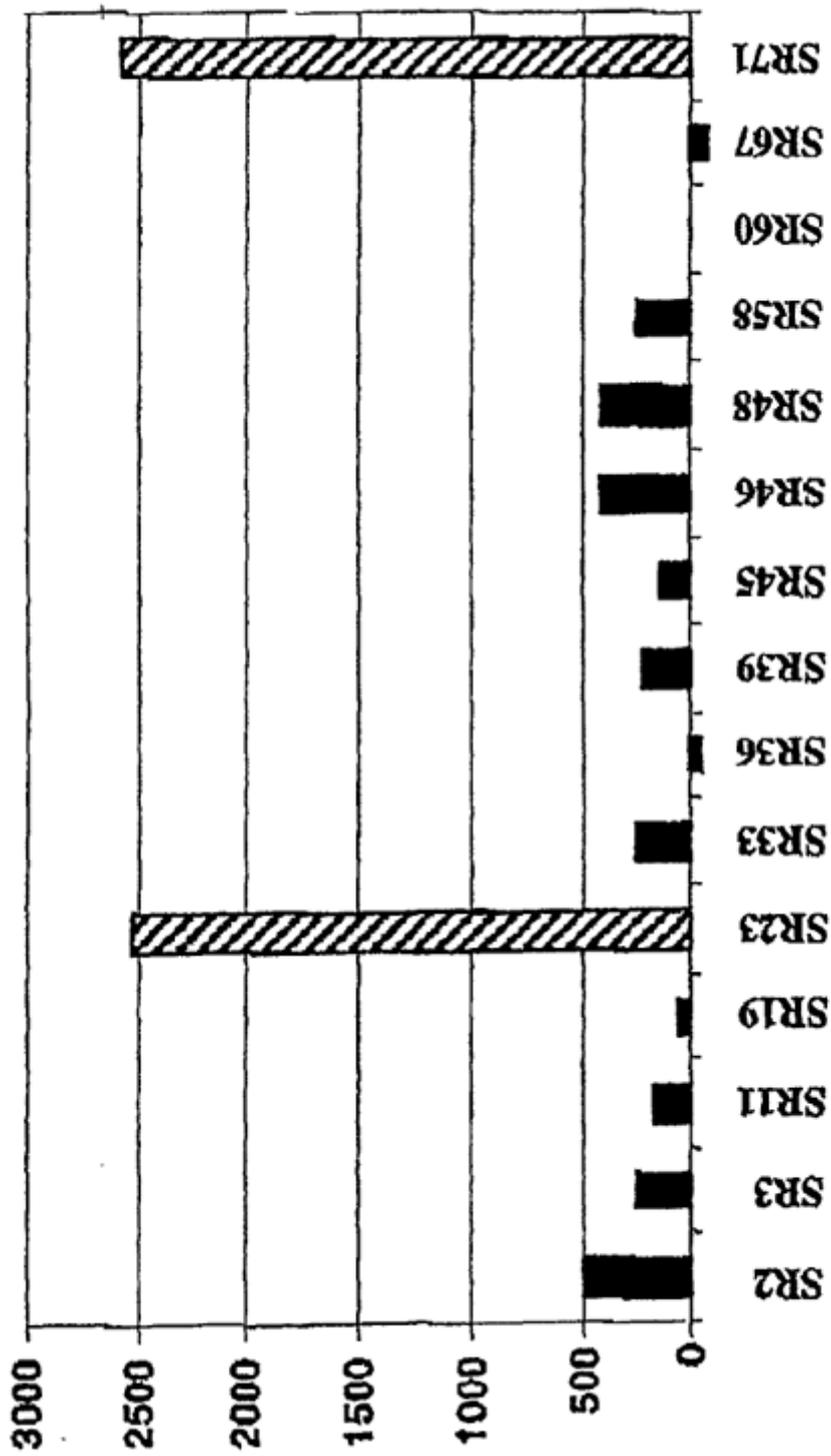


Fig. 9

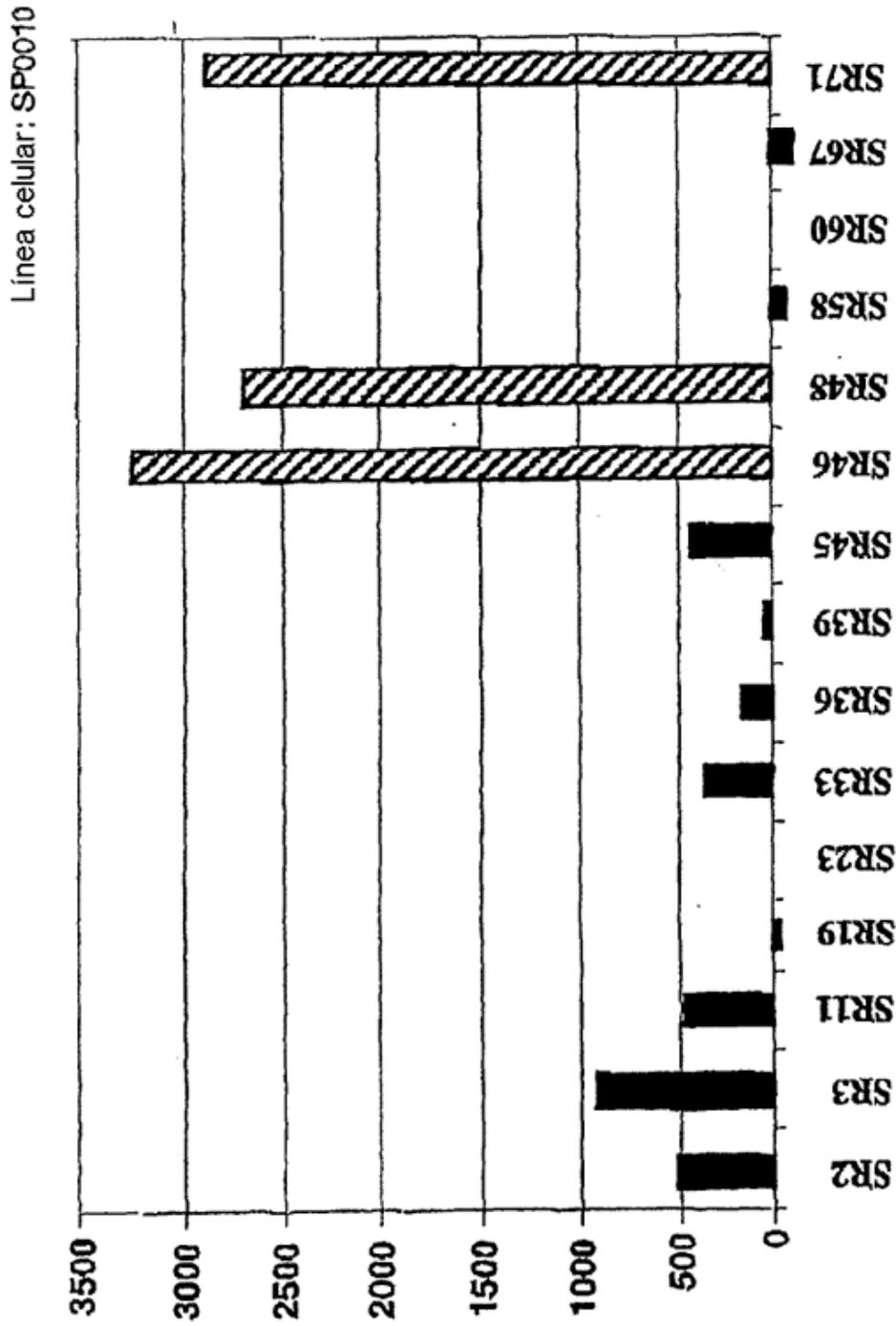


Fig. 10

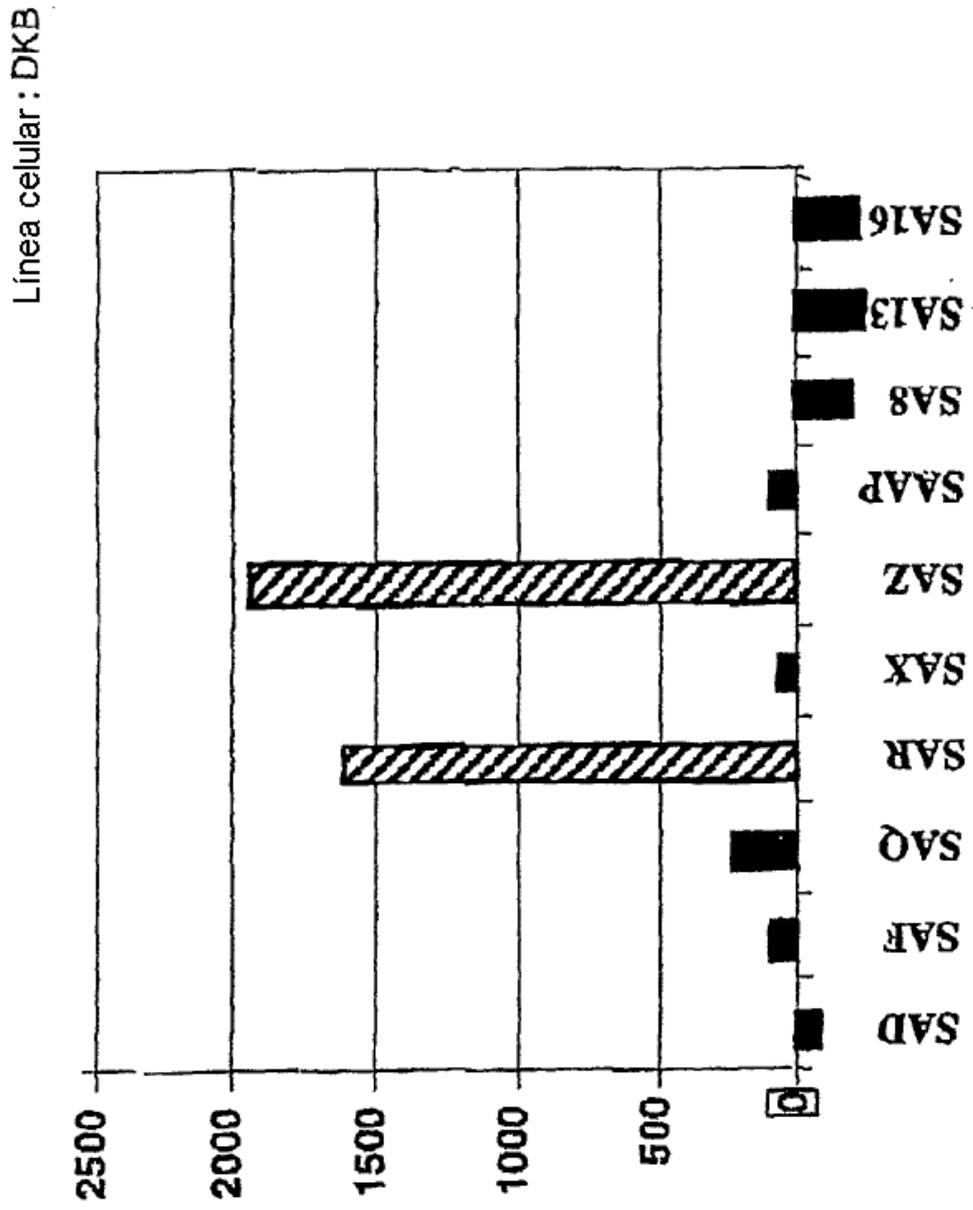


Fig. 11

Alelo sometido a prueba: 0201

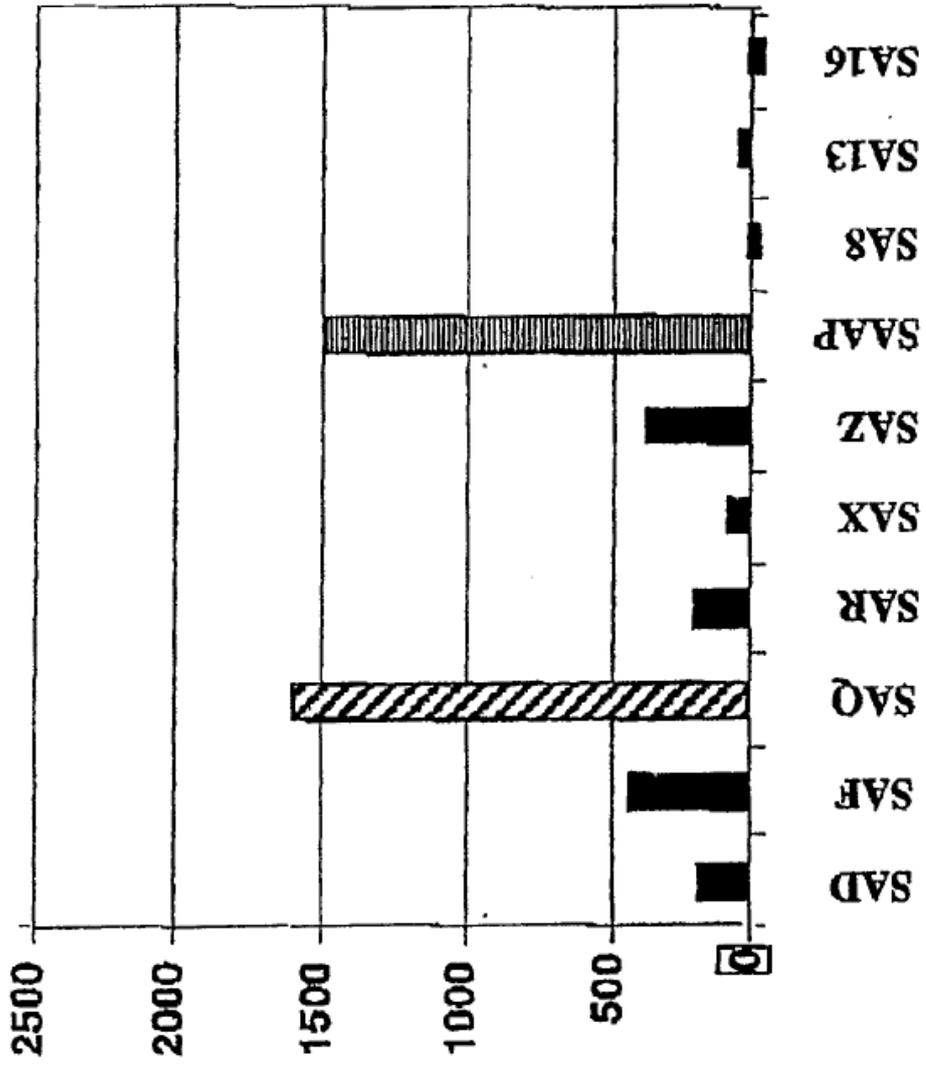


Fig. 12



DIANA

5' \_\_\_\_\_ GGA ACG CTCTATCCGGATTATCTAGGCATAGGCTT \_\_\_\_\_ 3'

SONDA

R117H-WT 5' ● \_\_\_\_\_ TAG ATA AAT CGC GAT AGA GC 3'

R117H-M

5' ● \_\_\_\_\_ TAG ATA AAT CGC GAT AGA GT 3'

PCR

\_\_\_\_\_ G \_\_\_\_\_  
● \_\_\_\_\_ C \_\_\_\_\_  
Extendida de tipo natural

\_\_\_\_\_ G \_\_\_\_\_  
● \_\_\_\_\_ T X \_\_\_\_\_  
No extendida mutante

Fig. 14

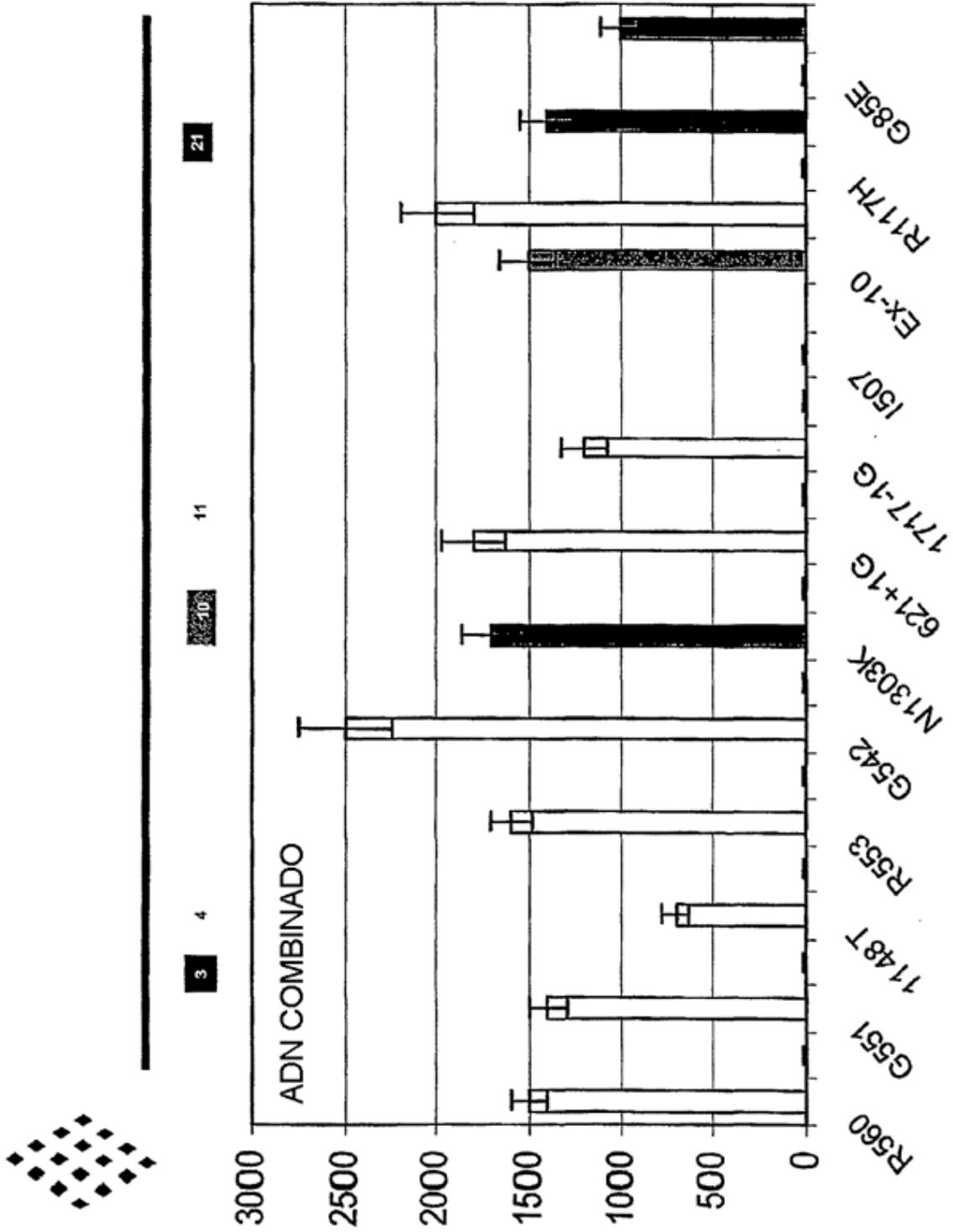


Fig. 15

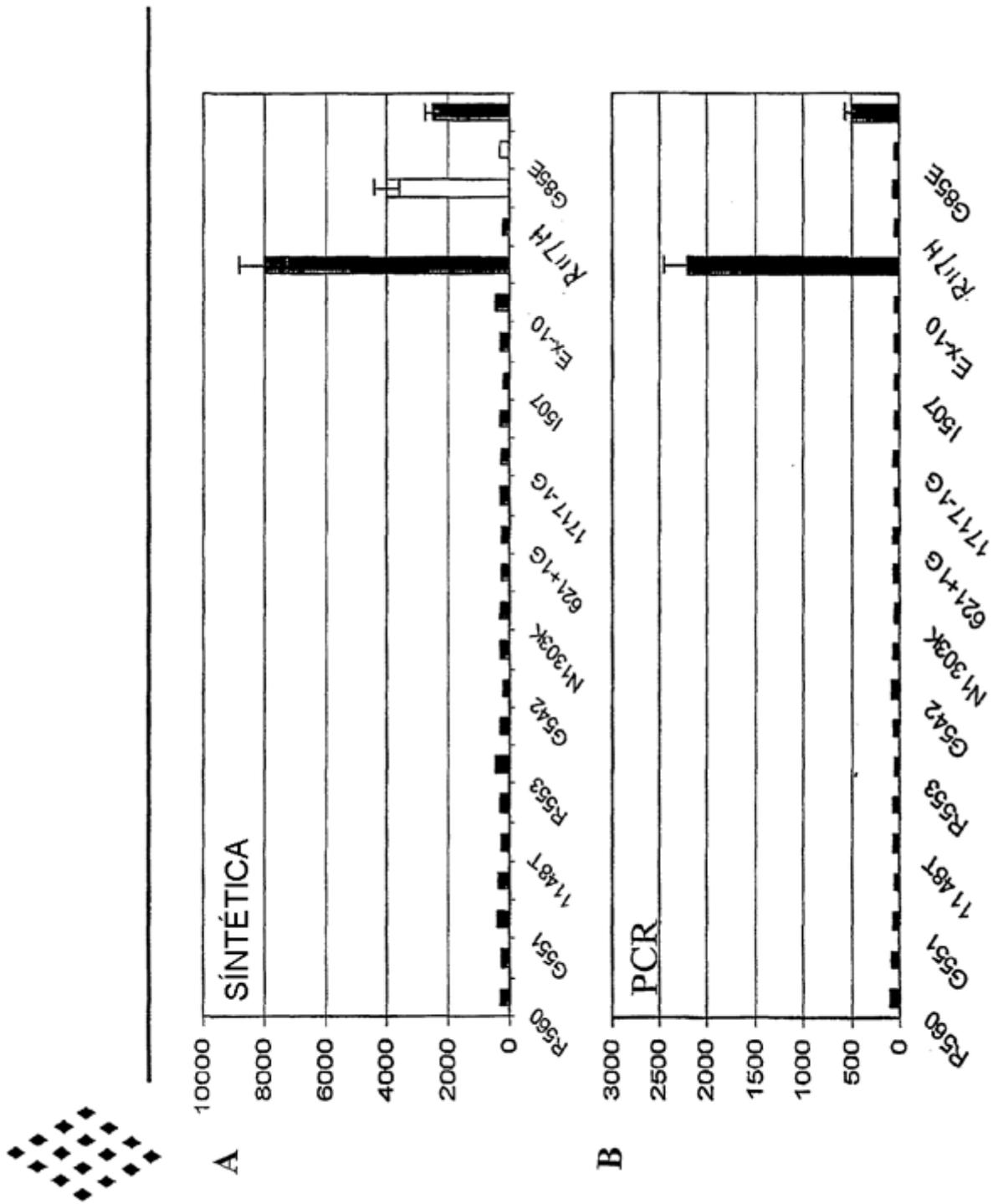


Fig. 16

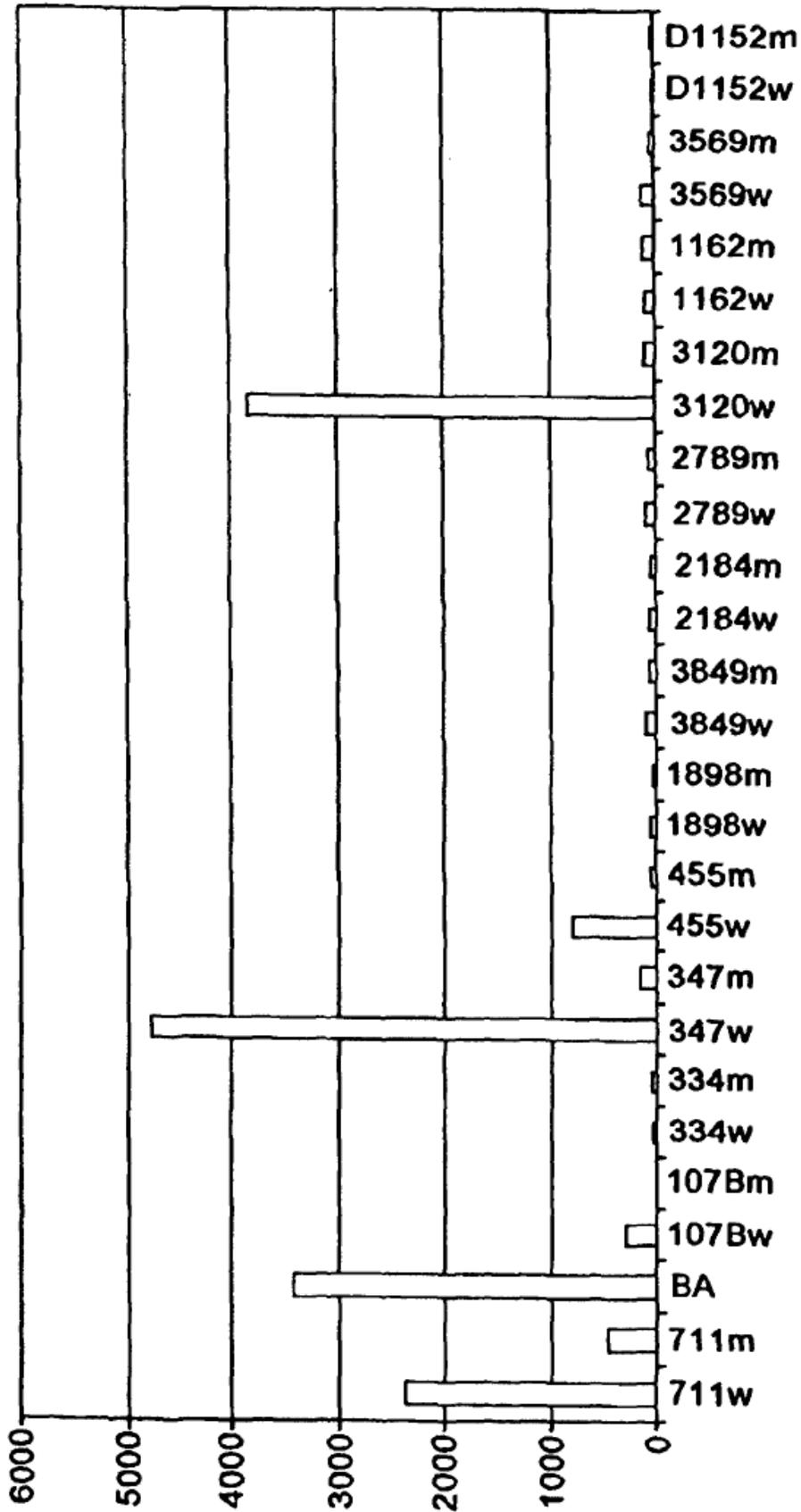


FIG. 17

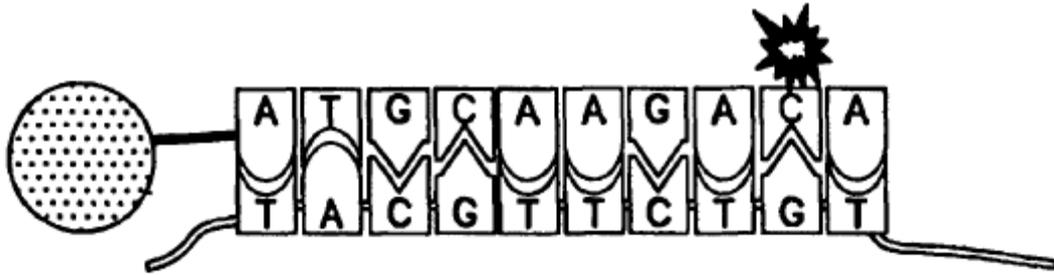


FIG. 18

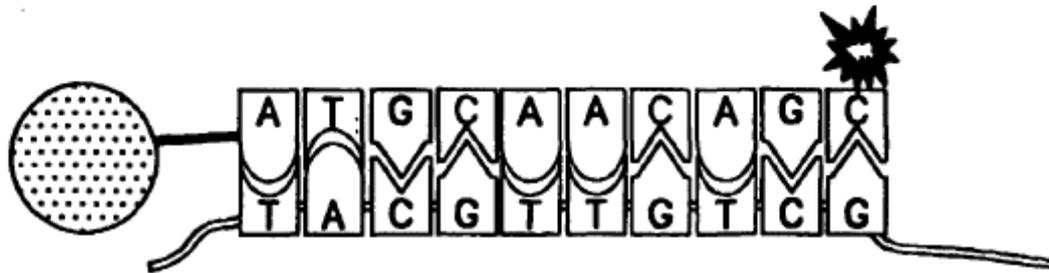
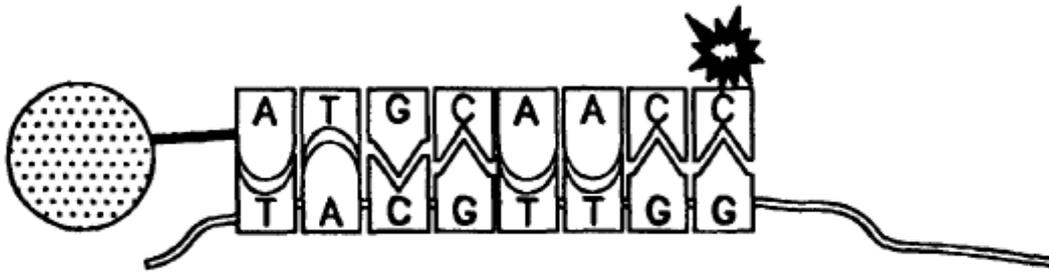


FIG. 19

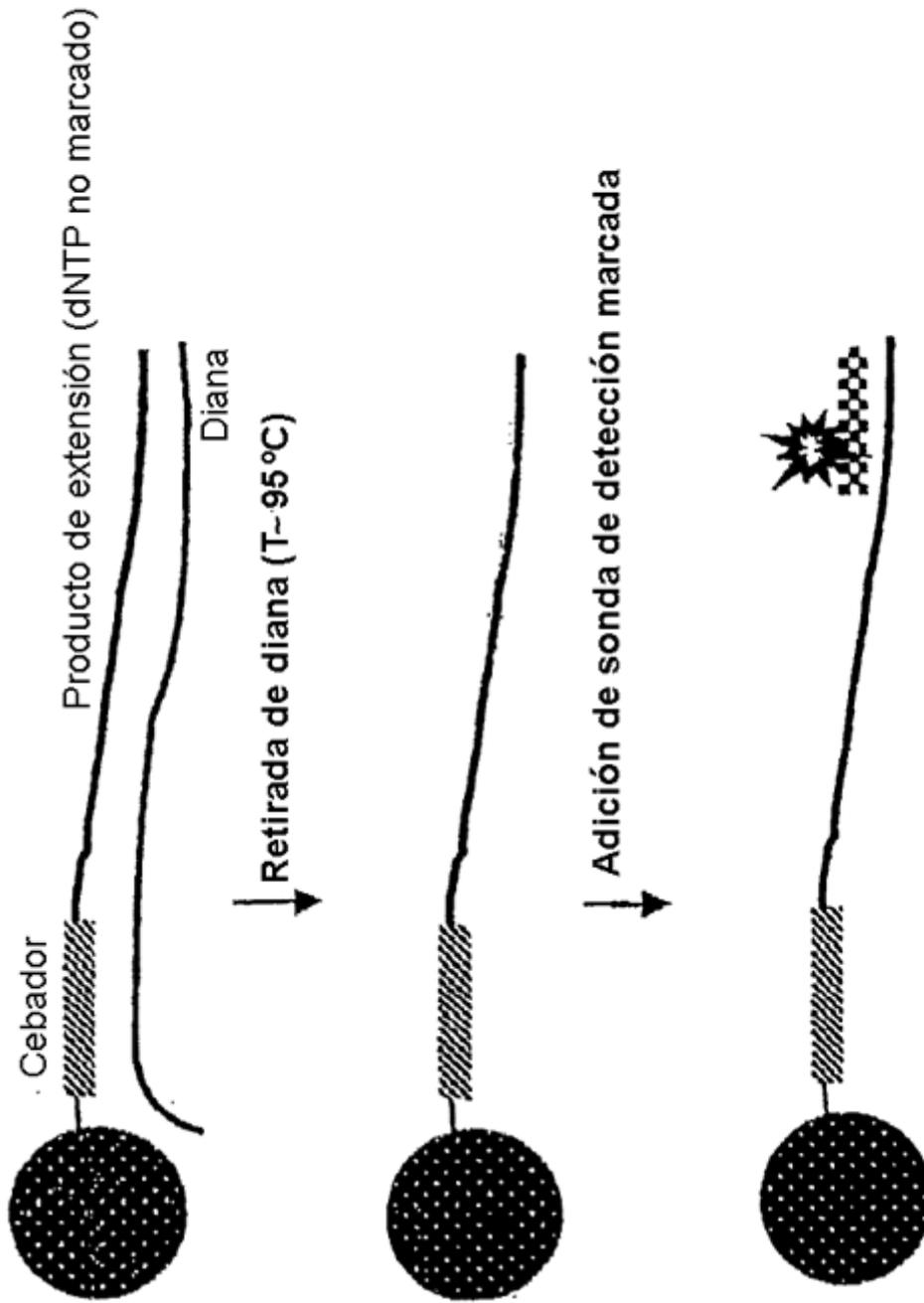


Fig. 20

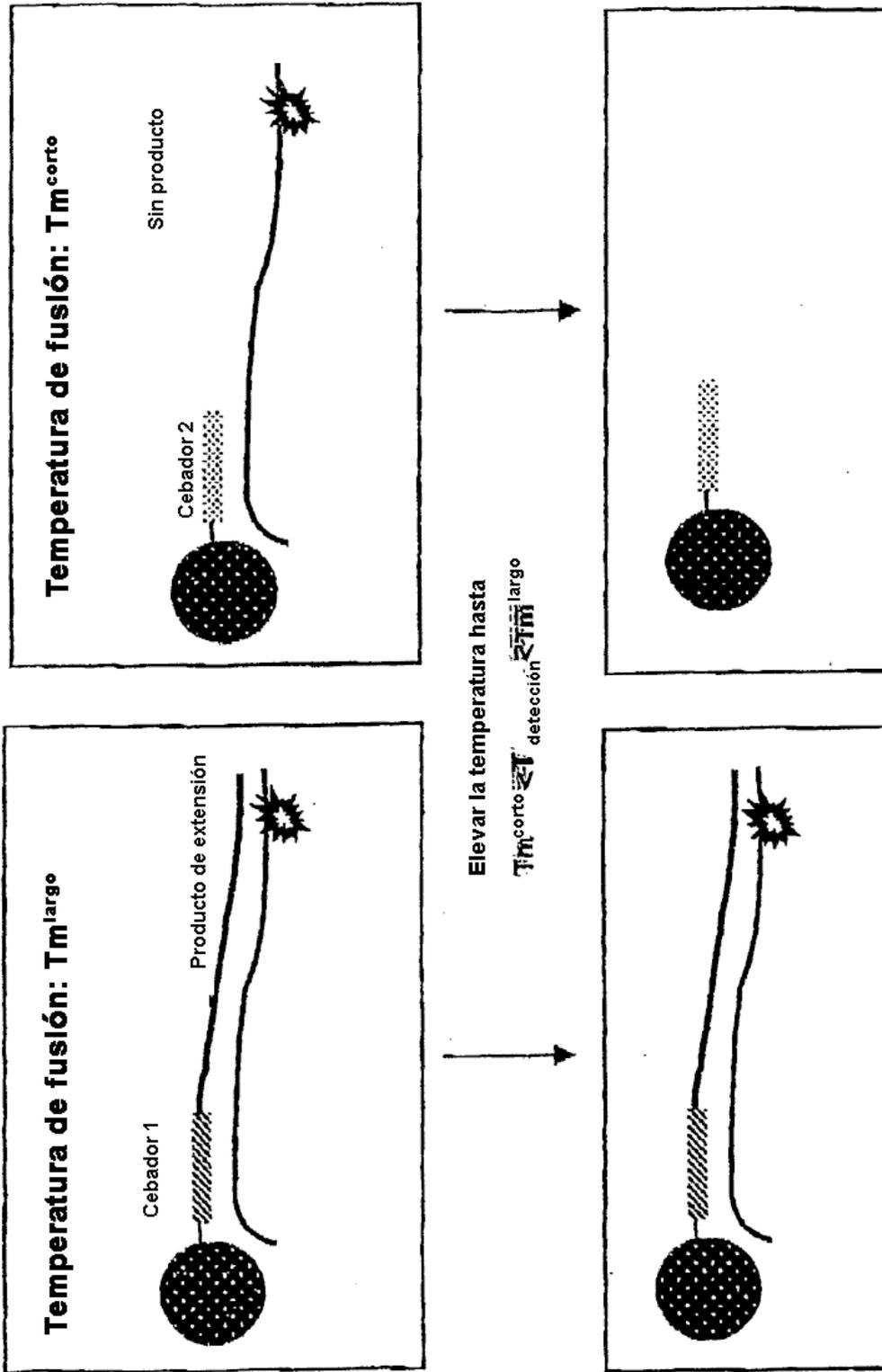


Fig. 21



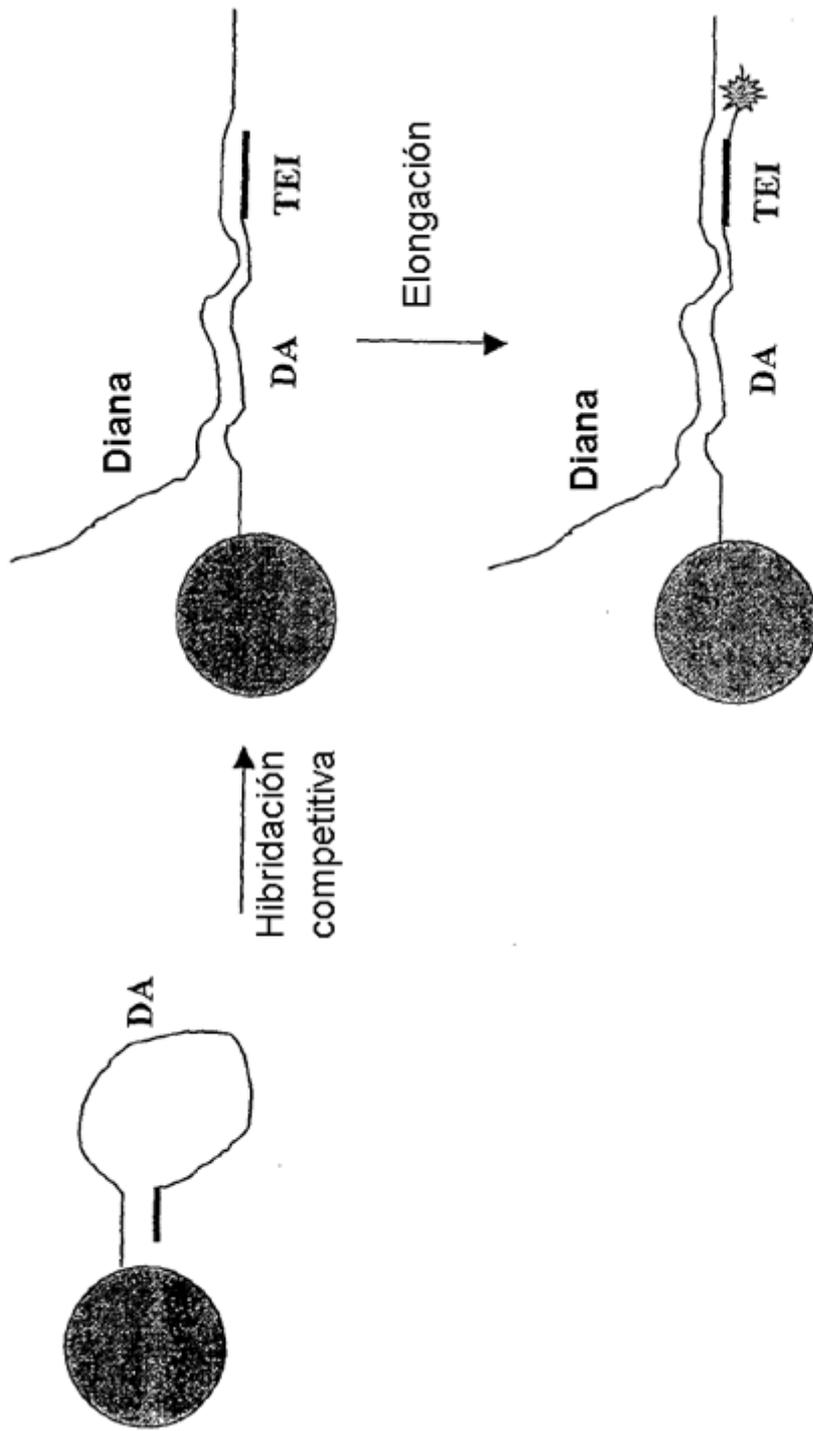
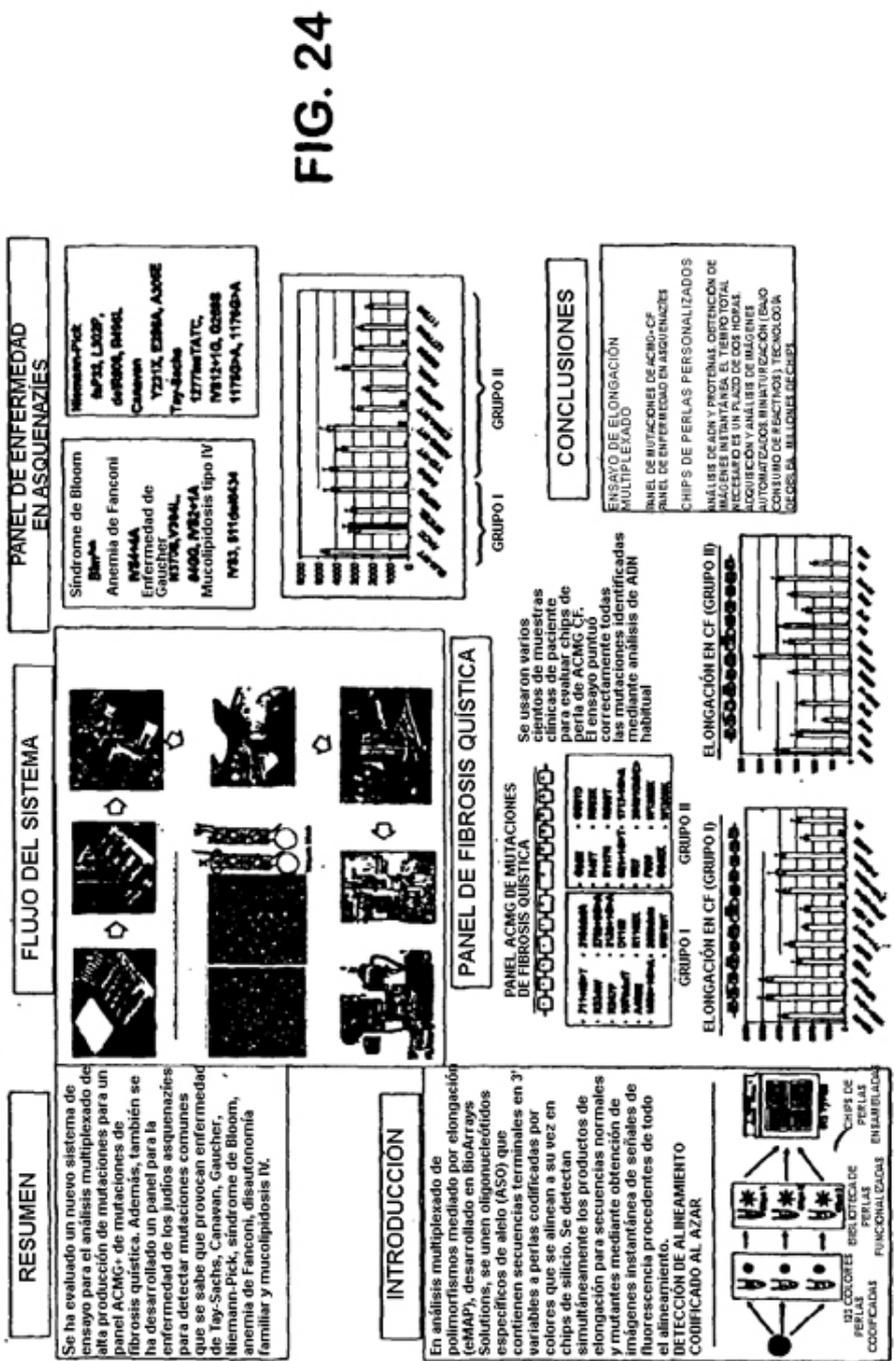
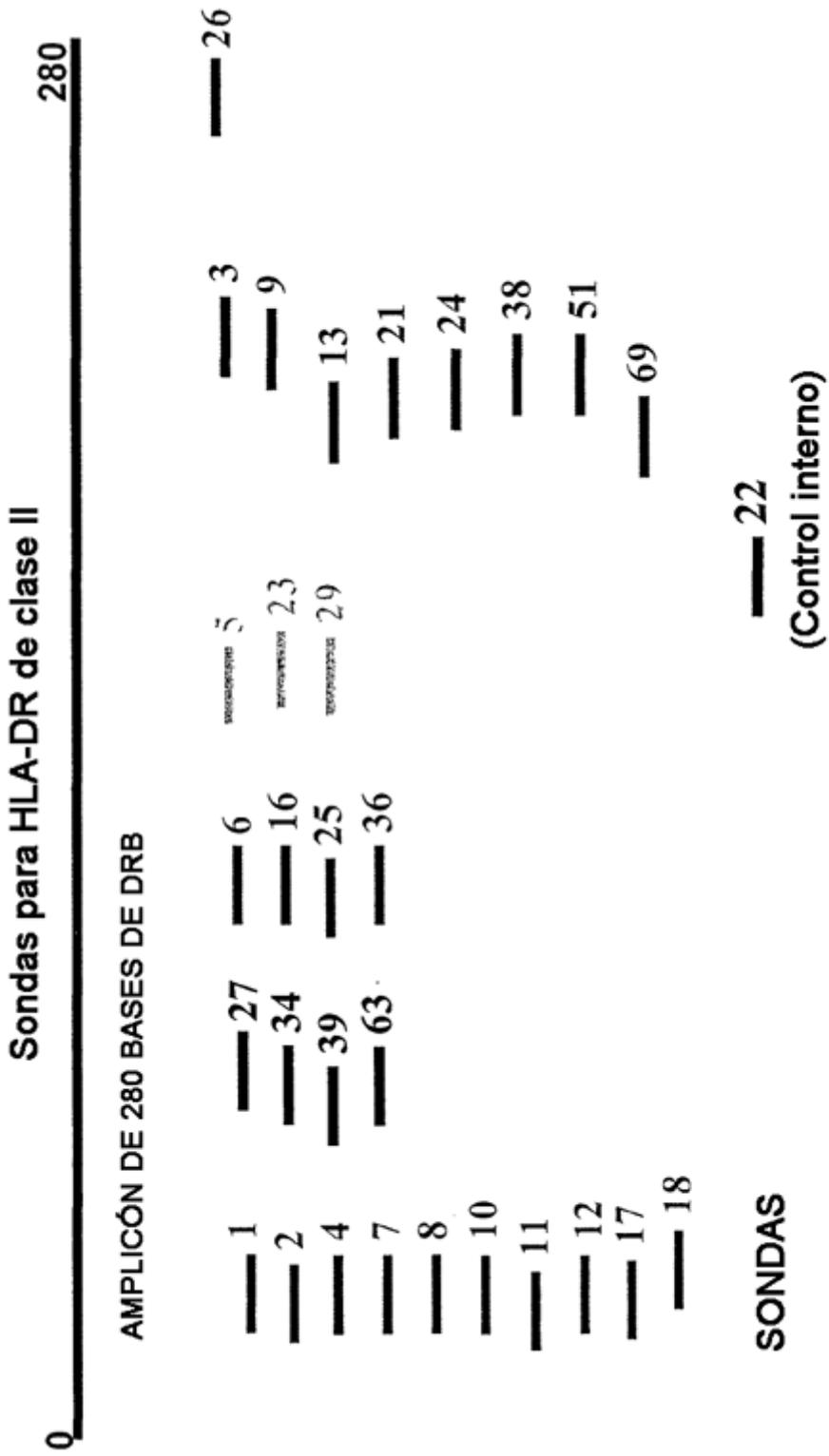


Fig. 23

**Análisis de mutaciones de fibrosis quística y enfermedad de los judíos asquenazíes mediante elongación multiplexada de oligonucleótidos específicos de alelo presentados en alineamientos de perlas personalizadas**  
 Alineamientos de perlas personalizadas  
**G. Hashmi<sup>2</sup>, Y. Song<sup>2</sup>, M. Sep<sup>2</sup>, L. Edelmann<sup>1</sup>, R. Kornreich<sup>1</sup>,  
 And R.J. Desnick<sup>1</sup>**  
<sup>1</sup>Mount Sinai School of Medicine, New York, NY,  
<sup>2</sup>BioArray Solutions Ltd., Piscataway, NJ.







**Fig. 1A**

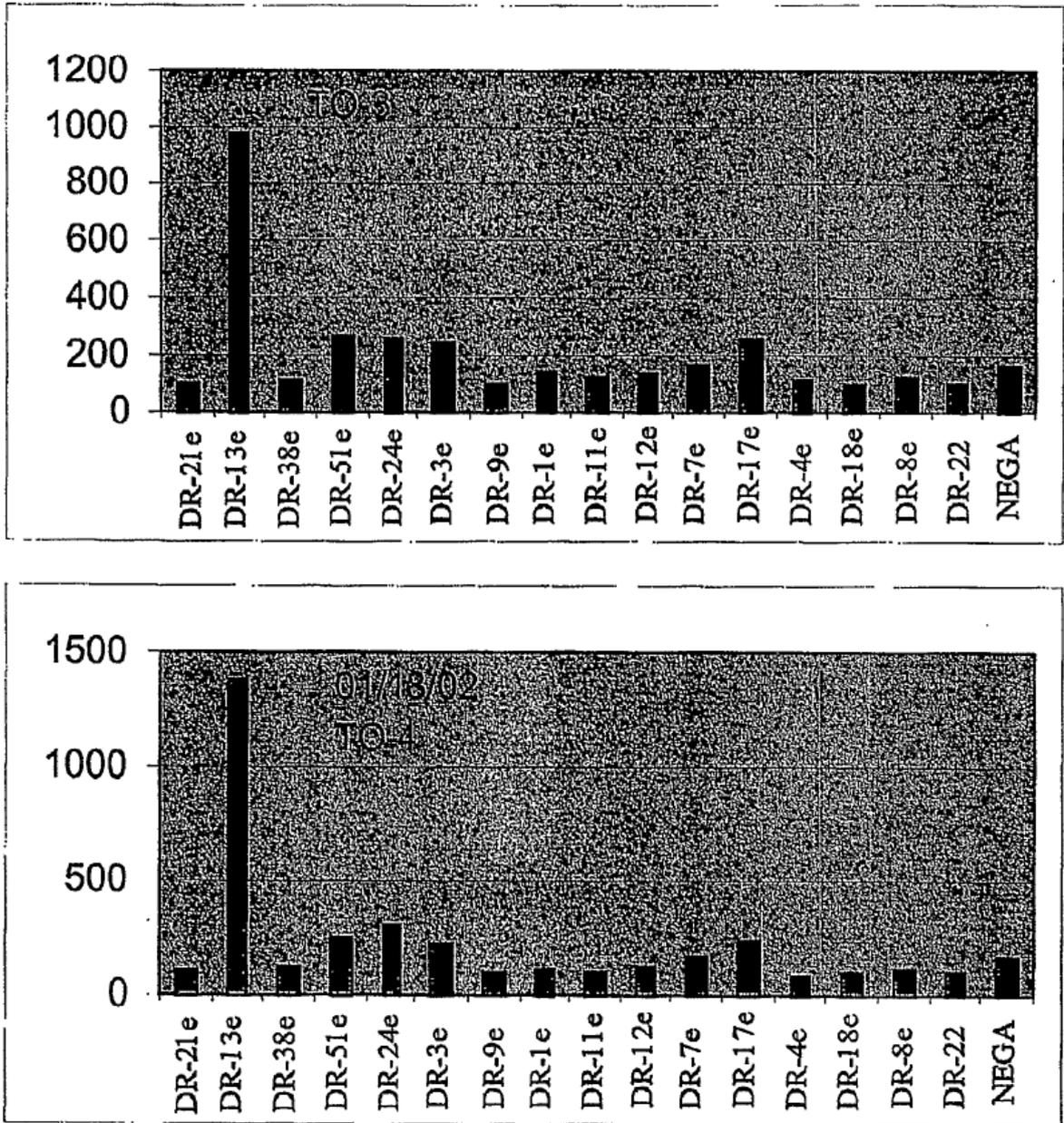
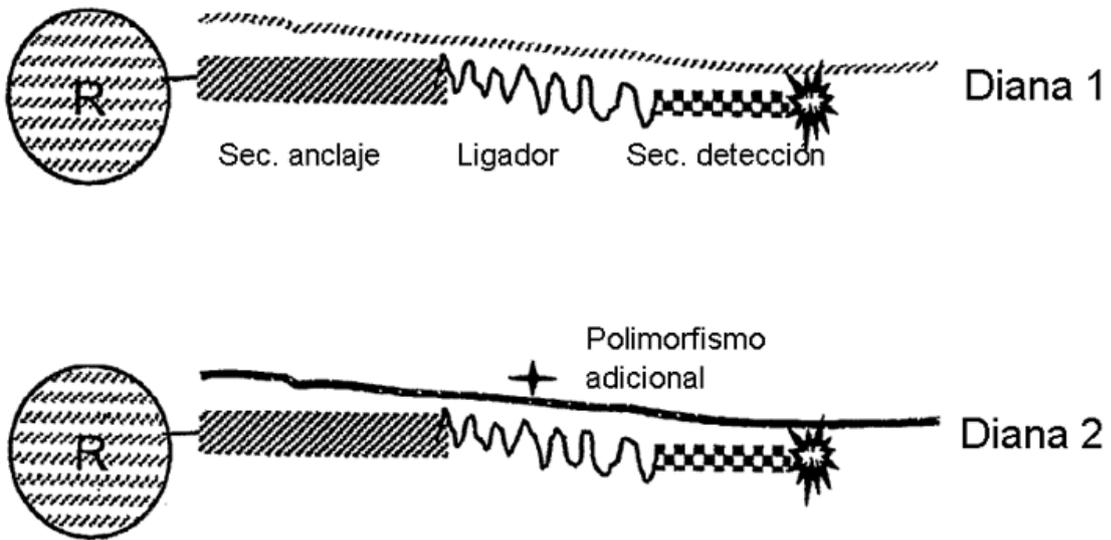


Fig. 2



**Fig. 3**

		Cebador 1	Cebador 2	Cebador 3	Cebador 4
Combinación 1	Alelo A	+		+	
	Alelo B		+		+
	<b>Total</b>	+	+	+	+
Combinación 2	Alelo C	+	+		
	Alelo D			+	+
	<b>Total</b>	+	+	+	+

**Fig. 4**

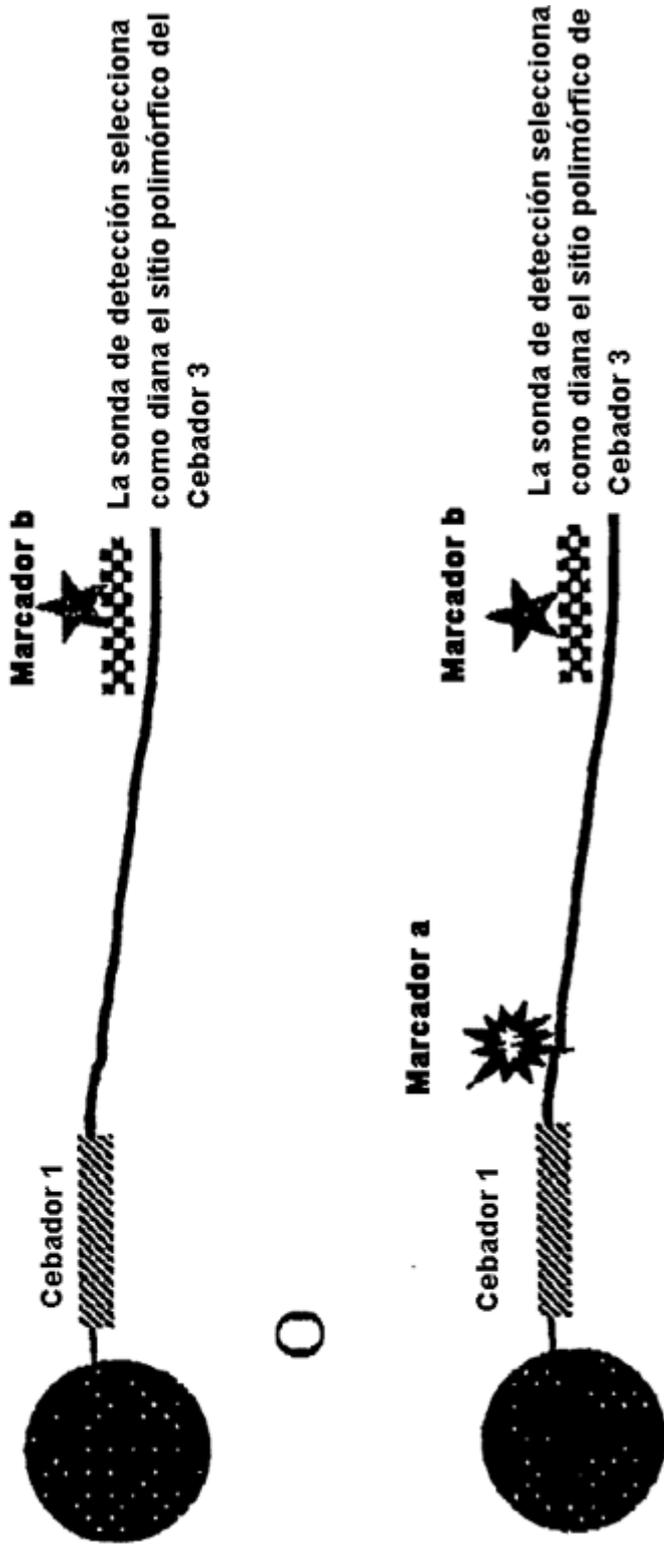


Fig. 5

Exón 3 de clase I B

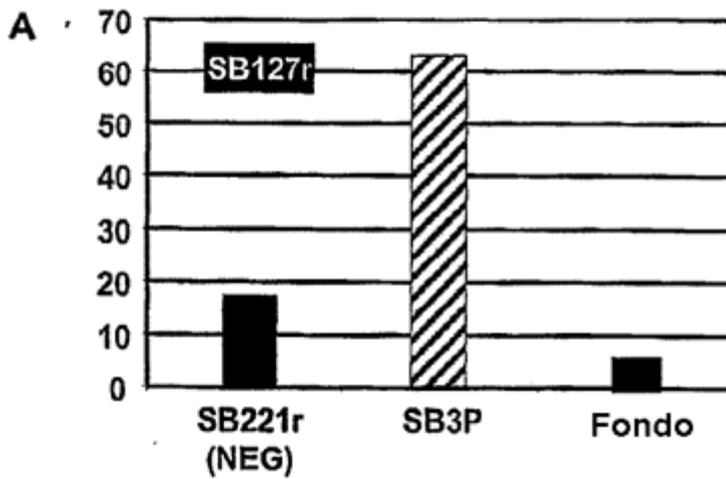
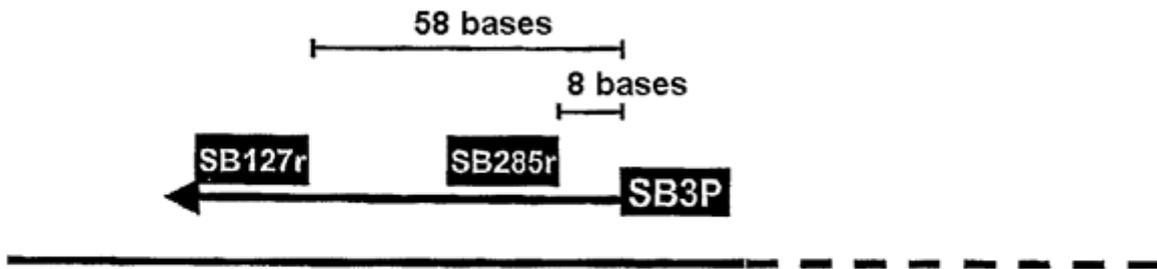
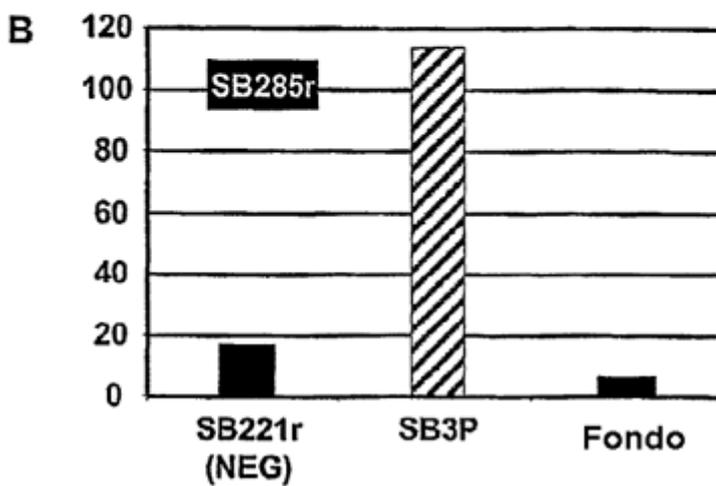


Fig. 6



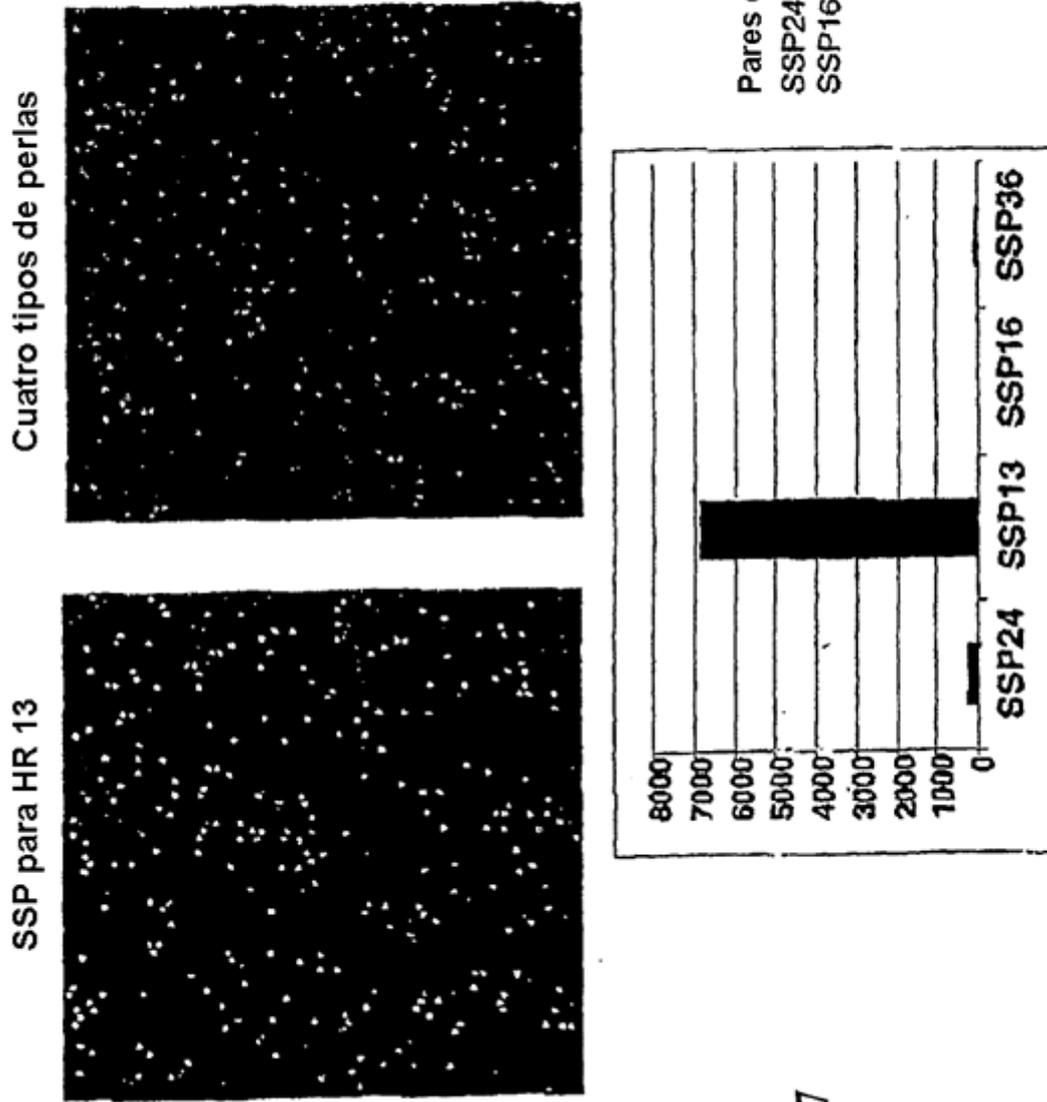


Fig. 7

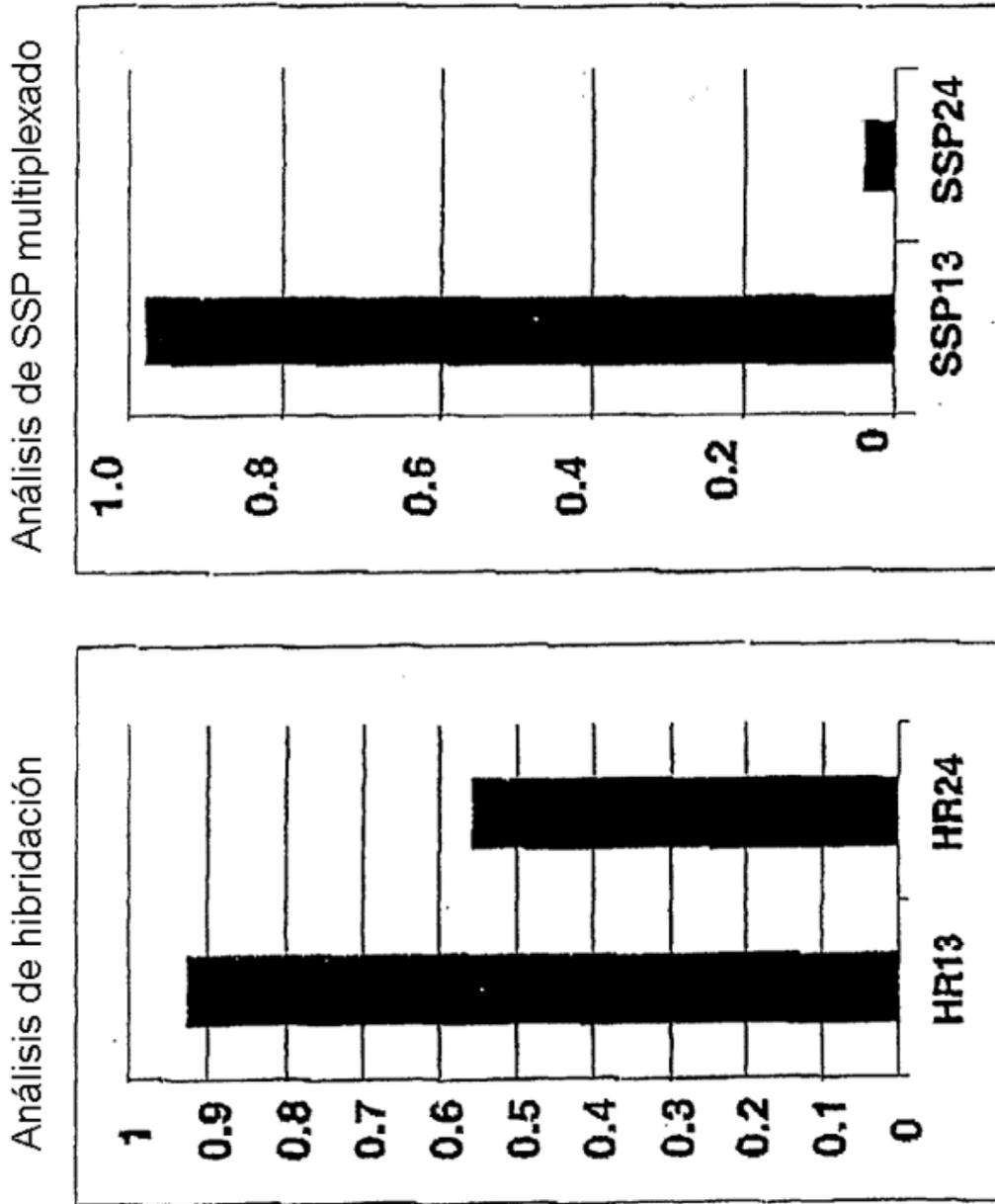


Fig. 8

Línea celular: WT51

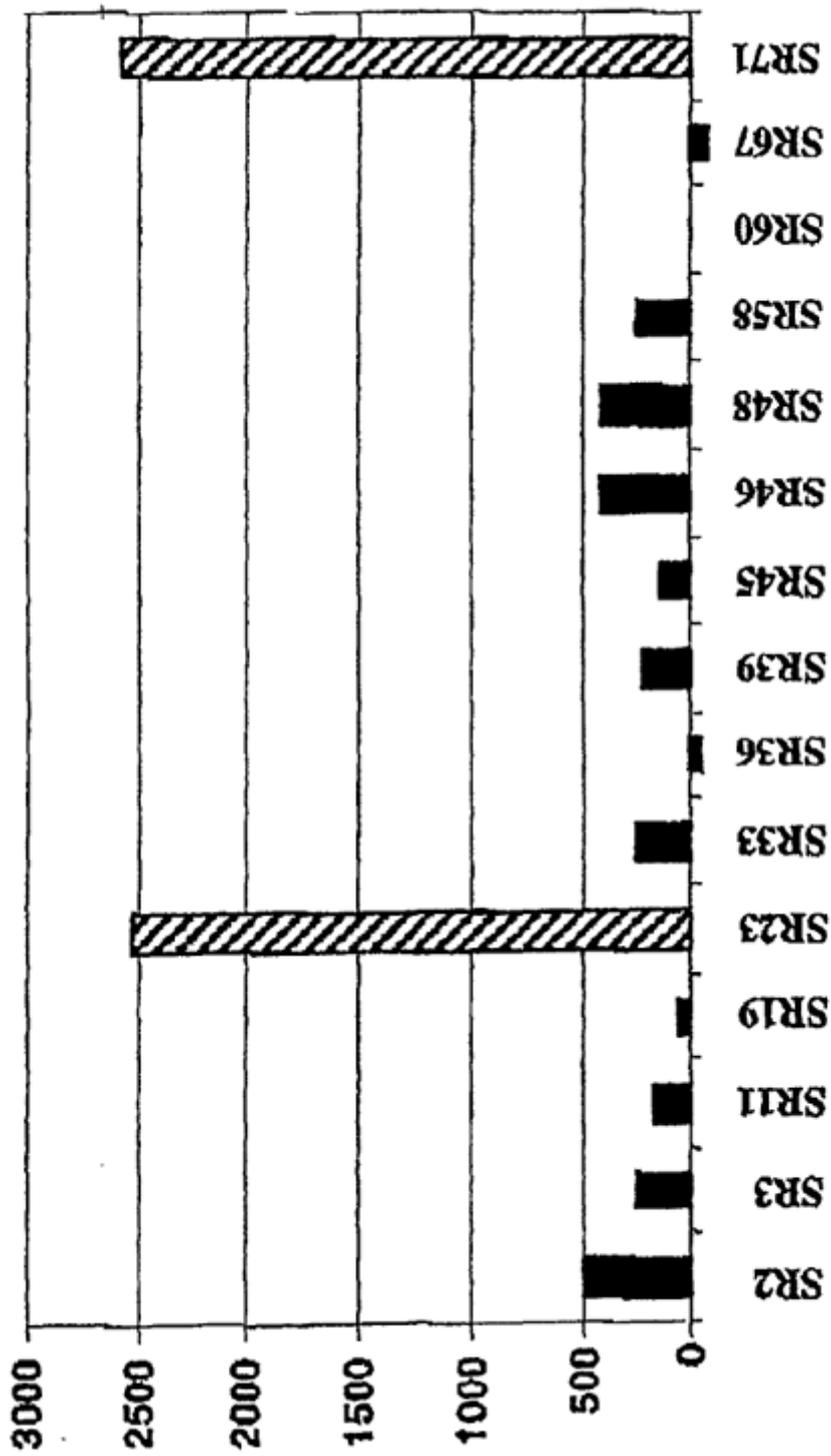


Fig. 9

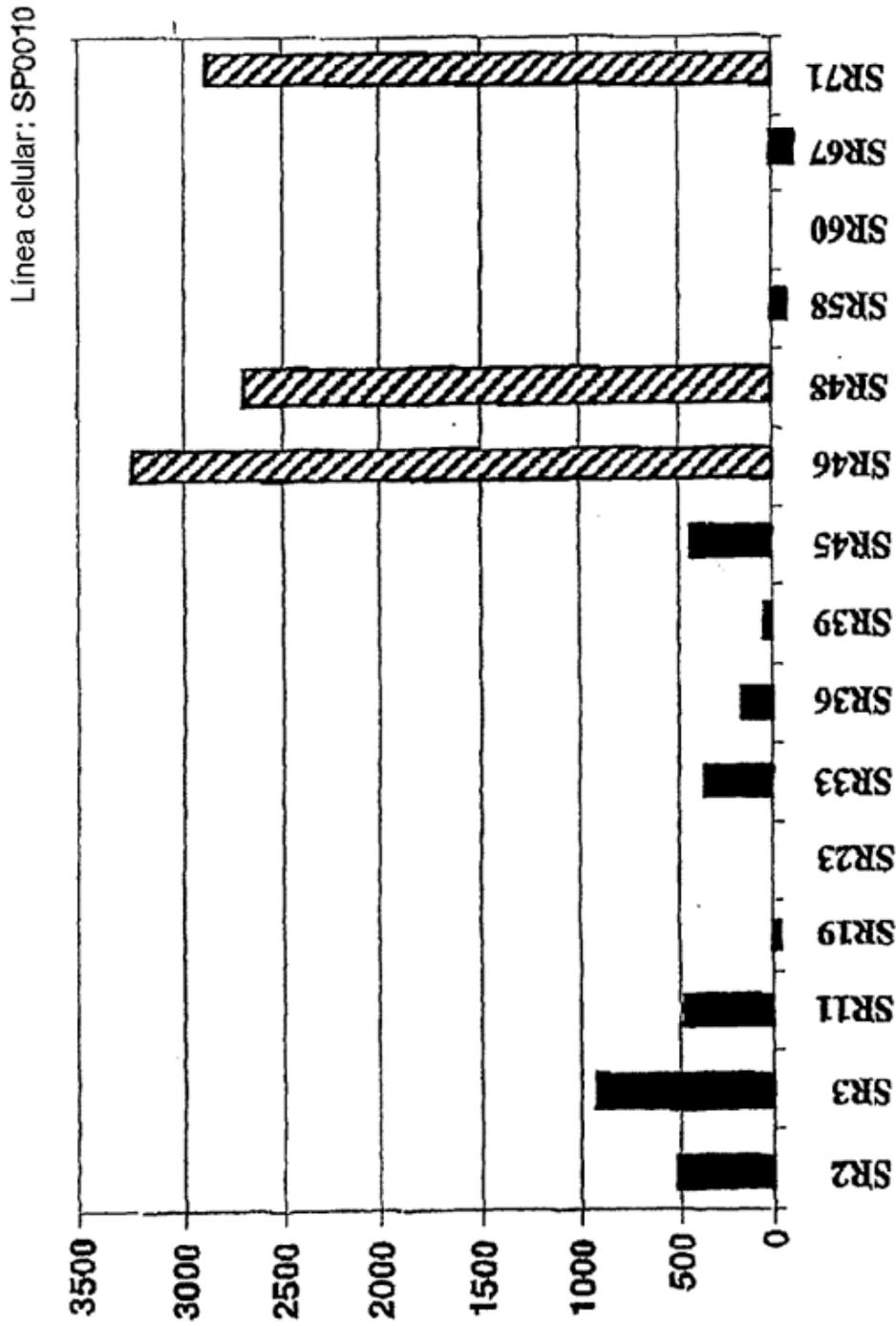


Fig. 10

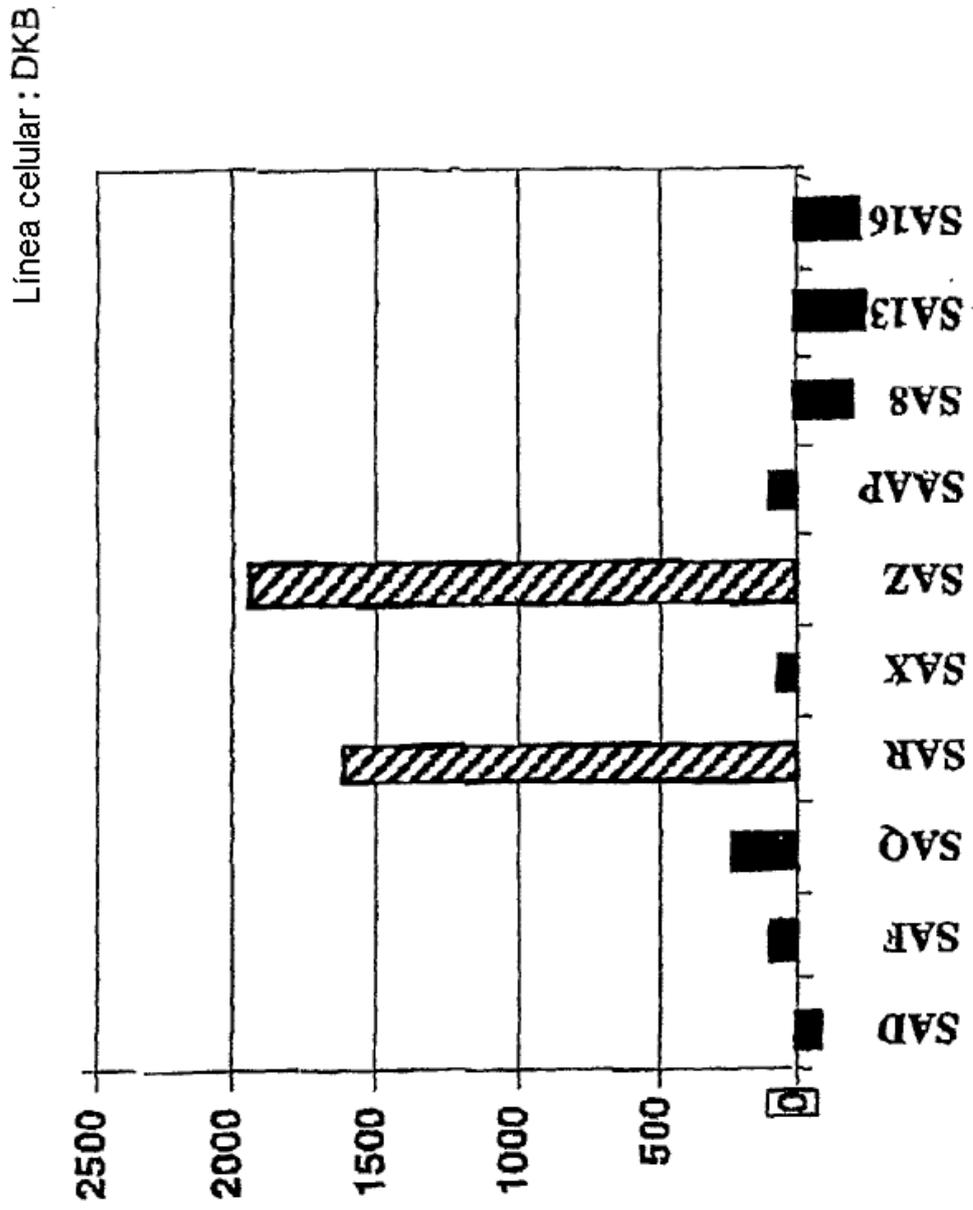


Fig. 11

Alelo sometido a prueba: 0201

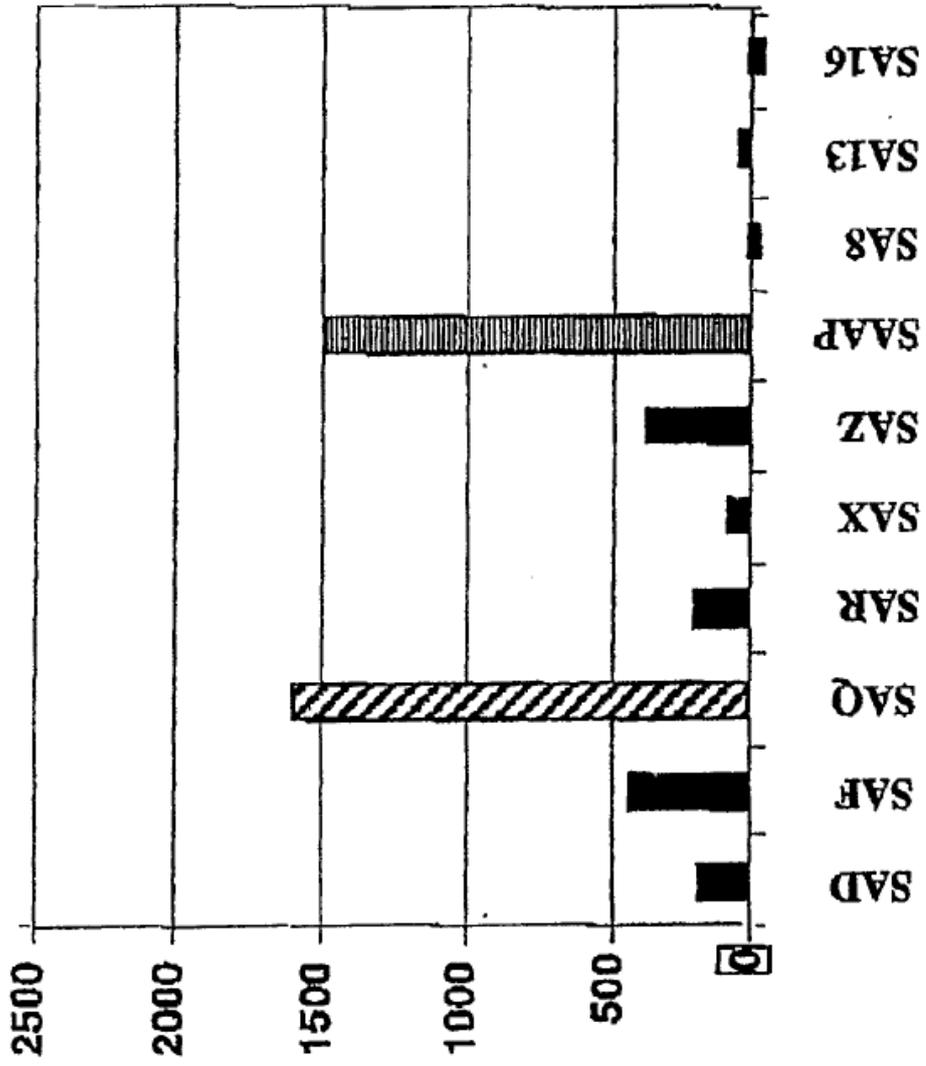


Fig. 12



DIANA

5' \_\_\_\_\_ GGA ACG CTCTATCCGGATTATCTAGGCATAGGCTT \_\_\_\_\_ 3'

SONDA

R117H-WT 5' ● TAG ATA AAT CGC GAT AGA GC 3'

R117H-M

5' ● TAG ATA AAT CGC GAT AGA GT 3'

PCR

Extendida de tipo natural  
G \_\_\_\_\_  
C \_\_\_\_\_ ●

No extendida mutante  
G \_\_\_\_\_  
T X \_\_\_\_\_ ●

Fig. 14

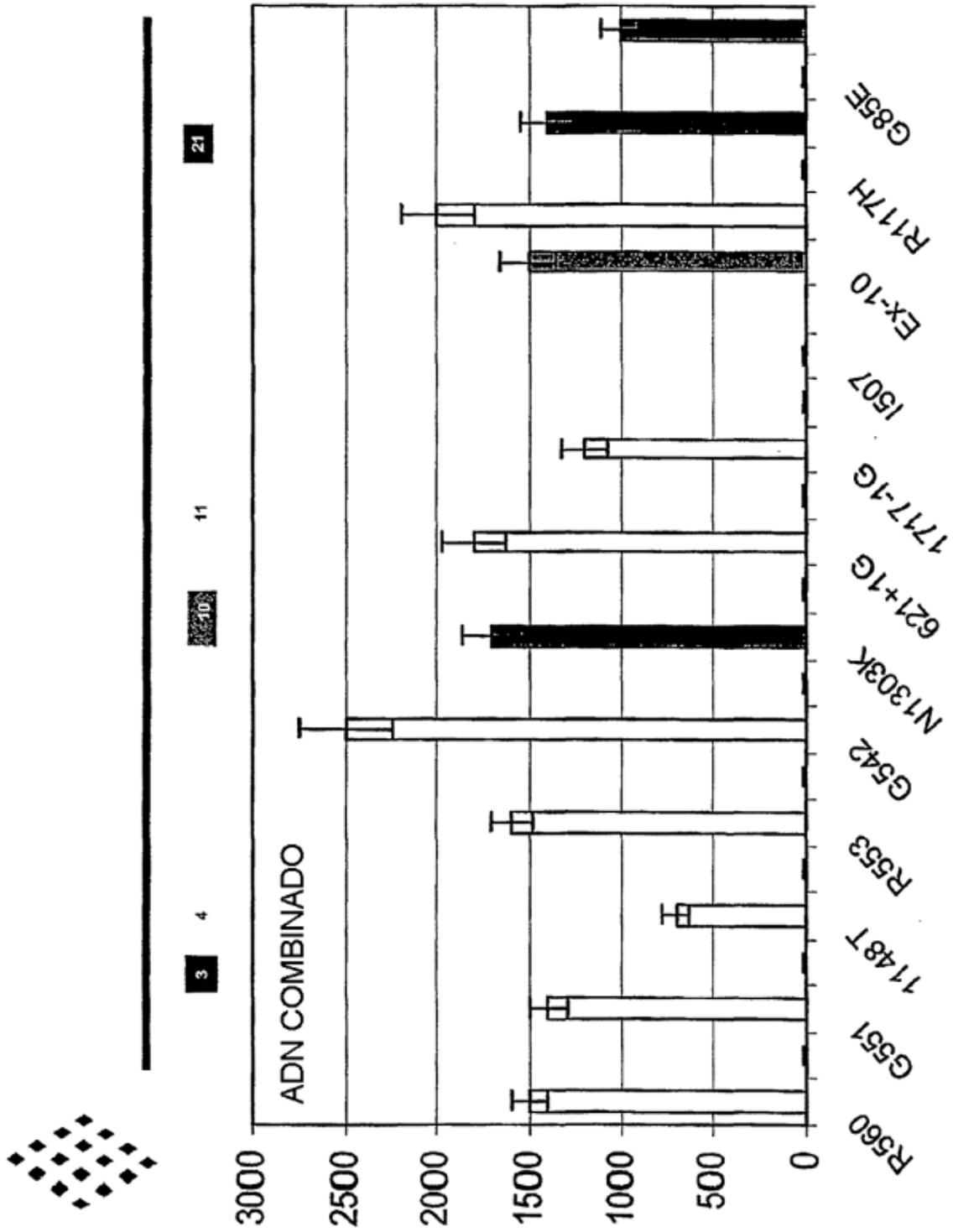


Fig. 15

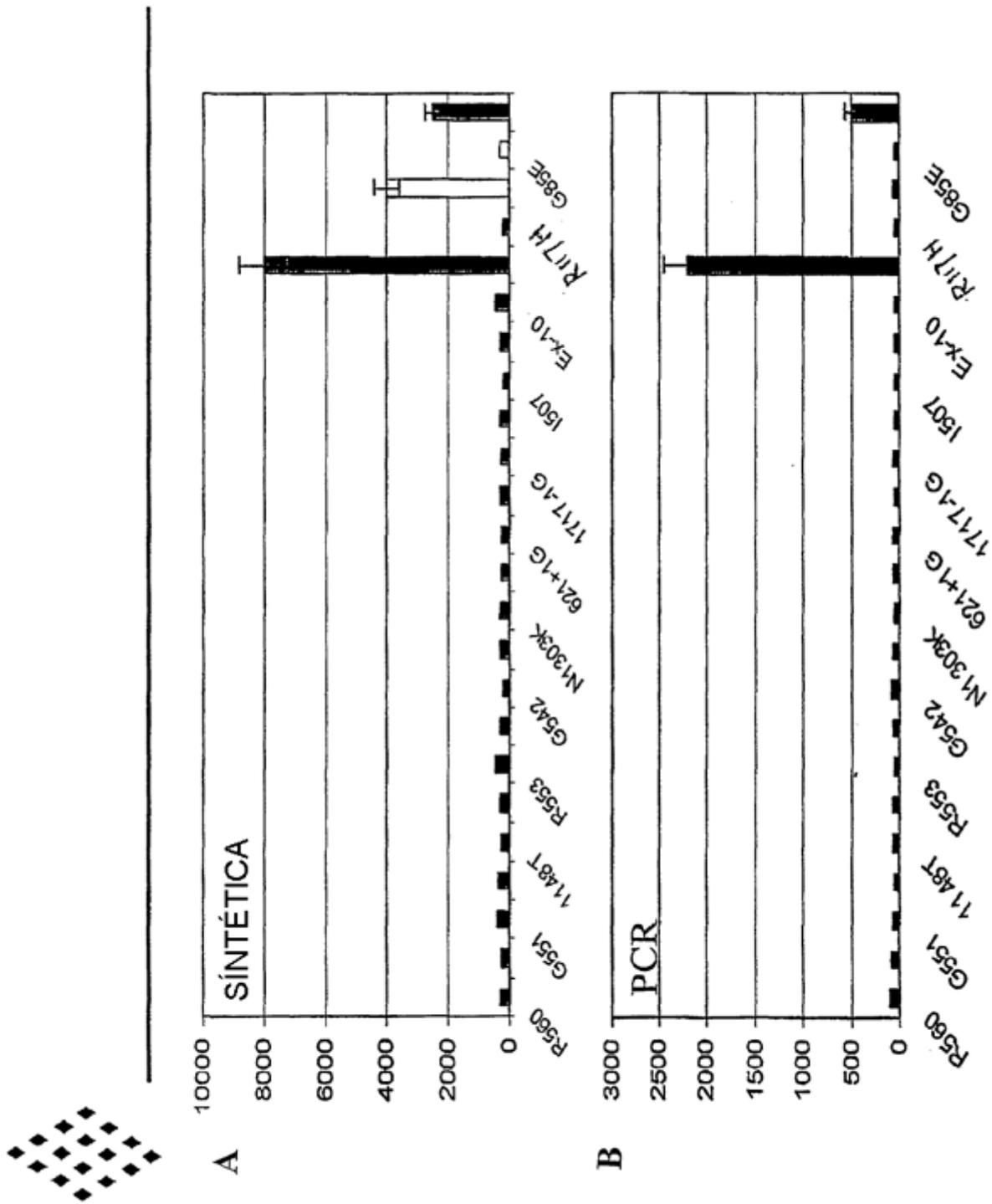


Fig. 16

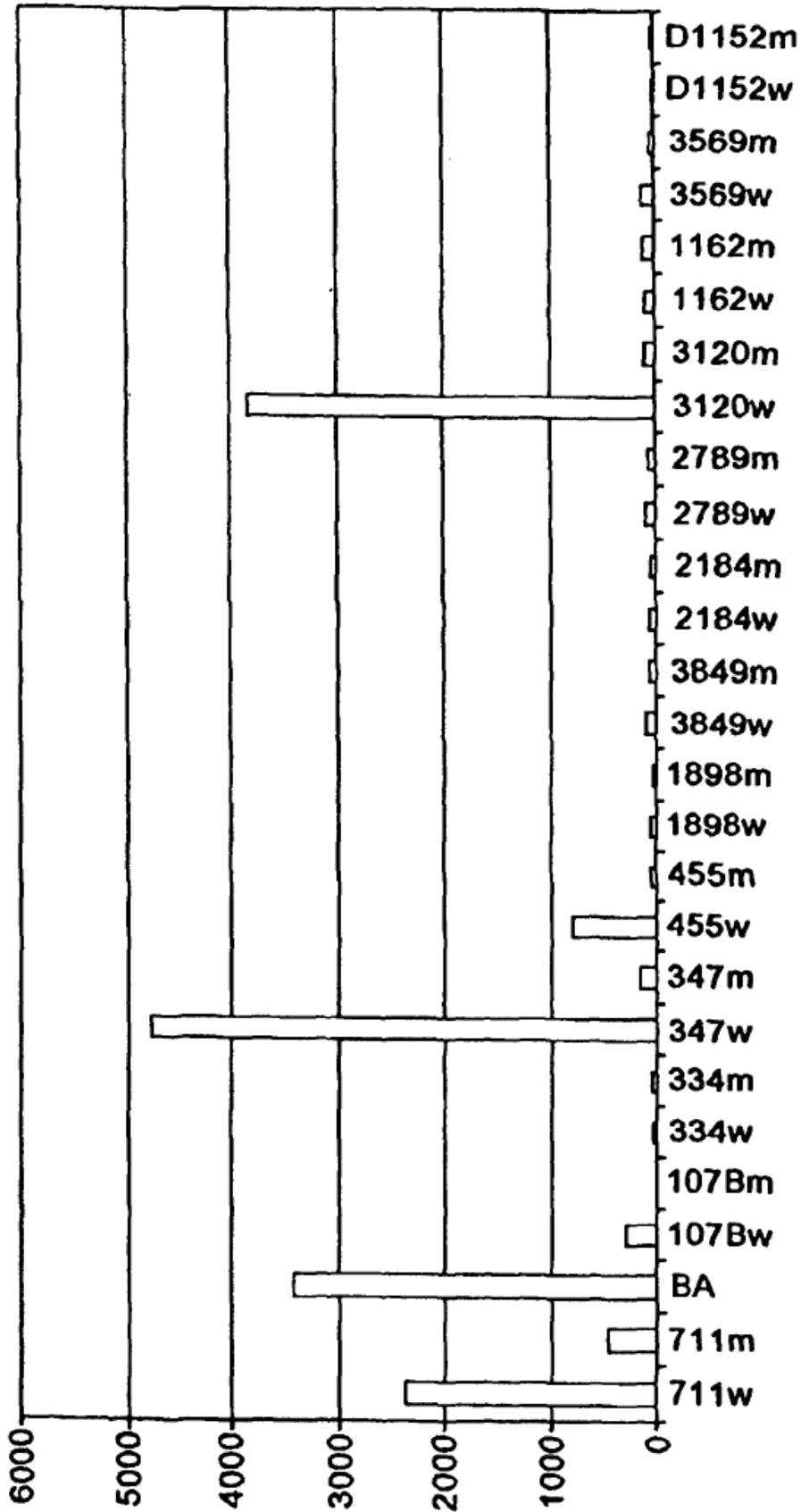


FIG. 17

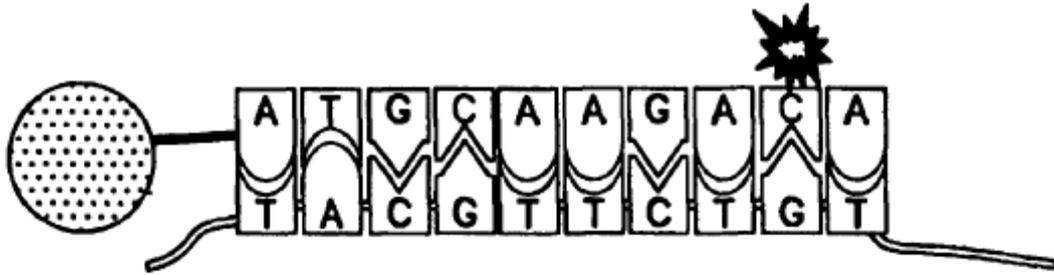


FIG. 18

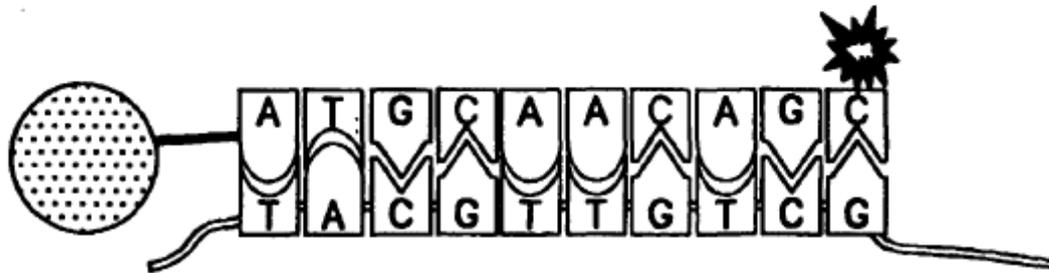
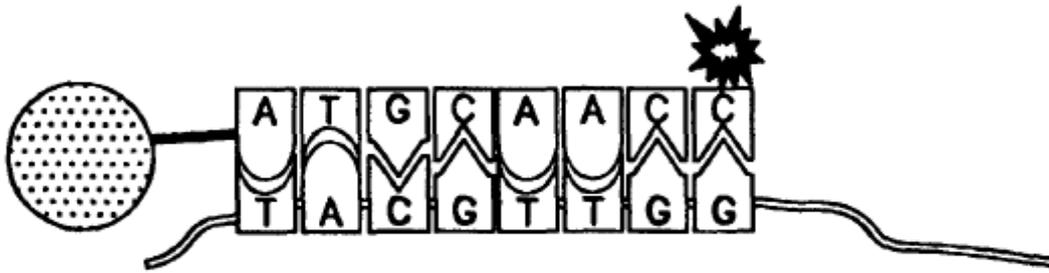


FIG. 19

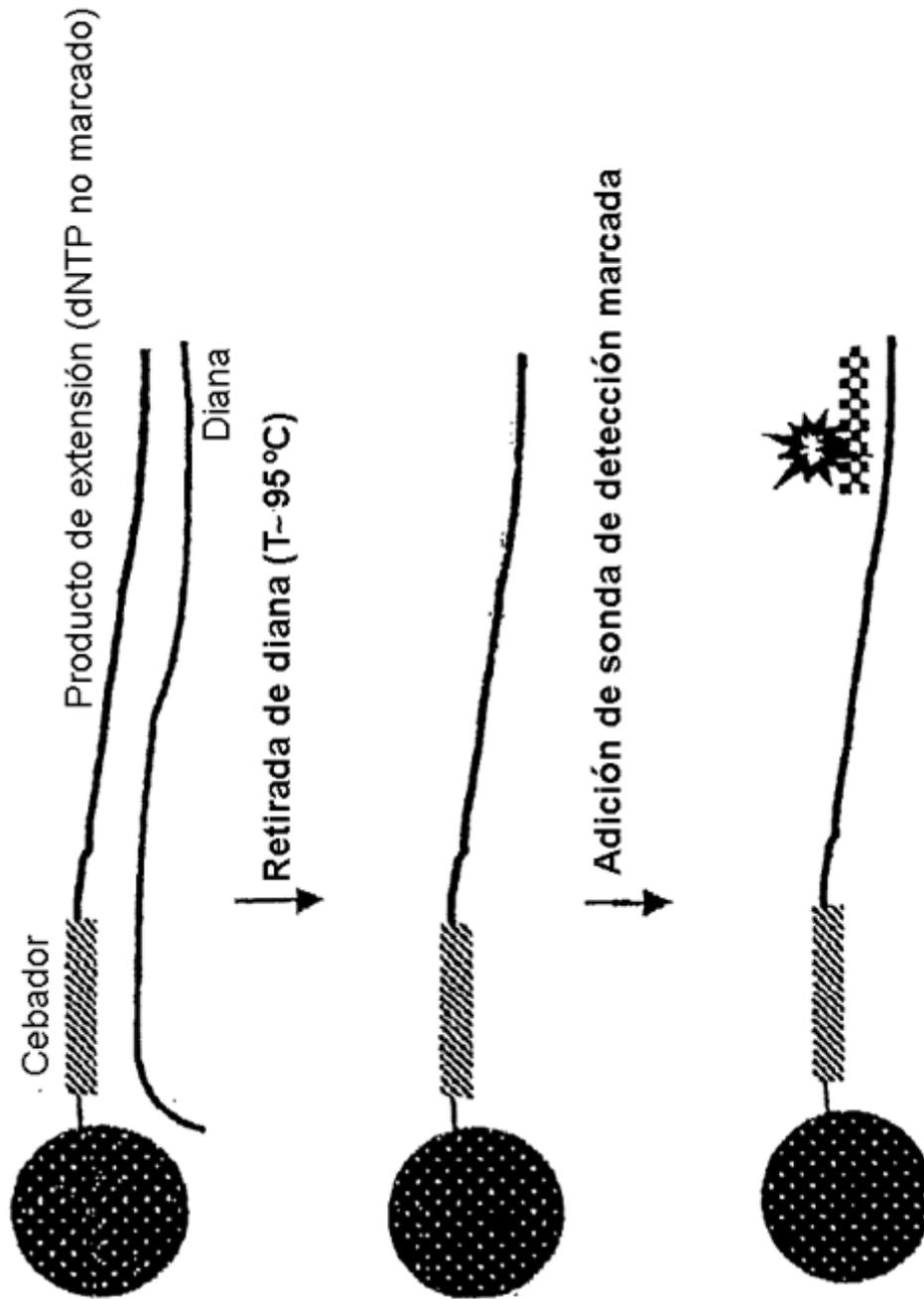


Fig. 20

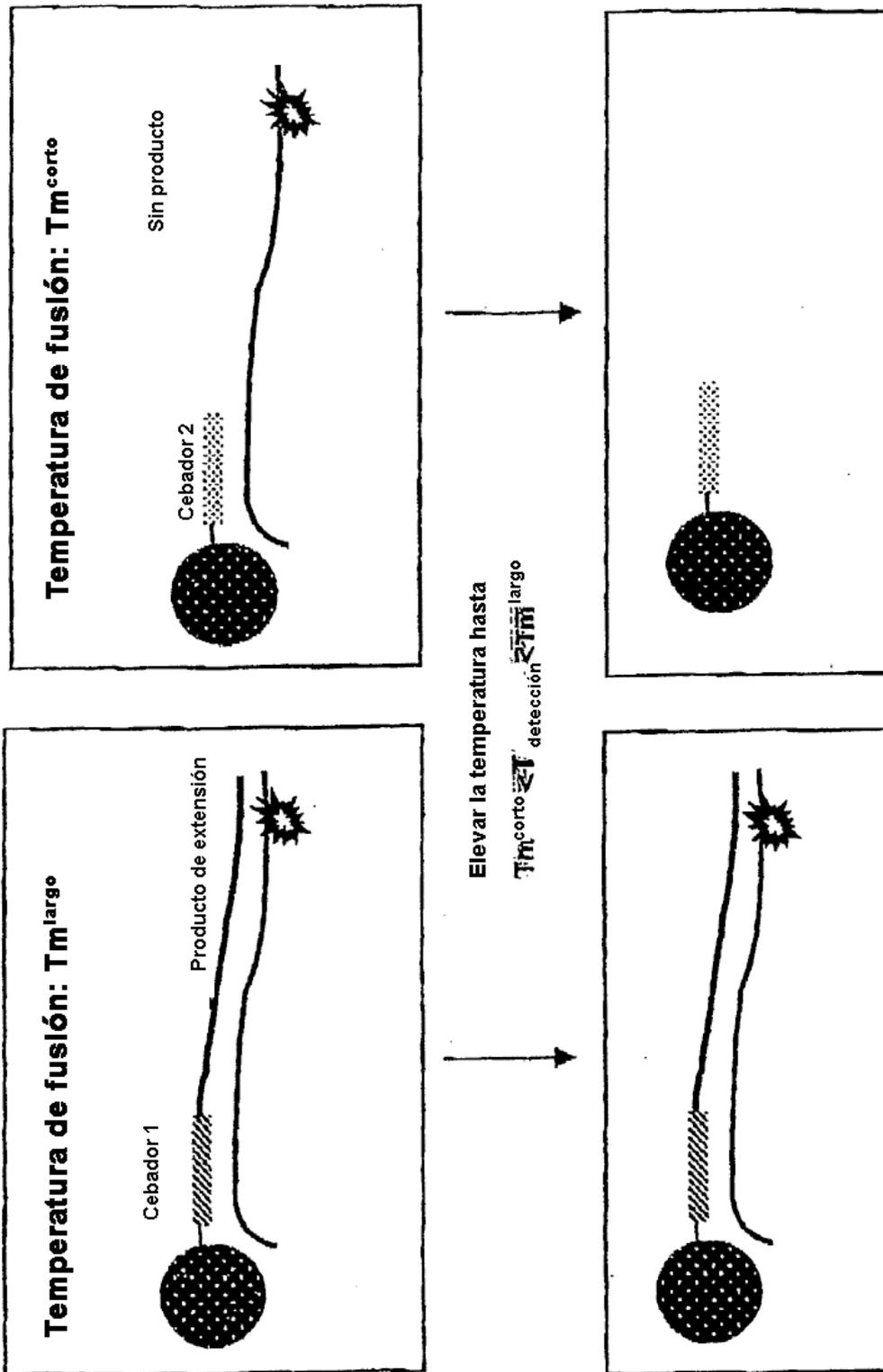
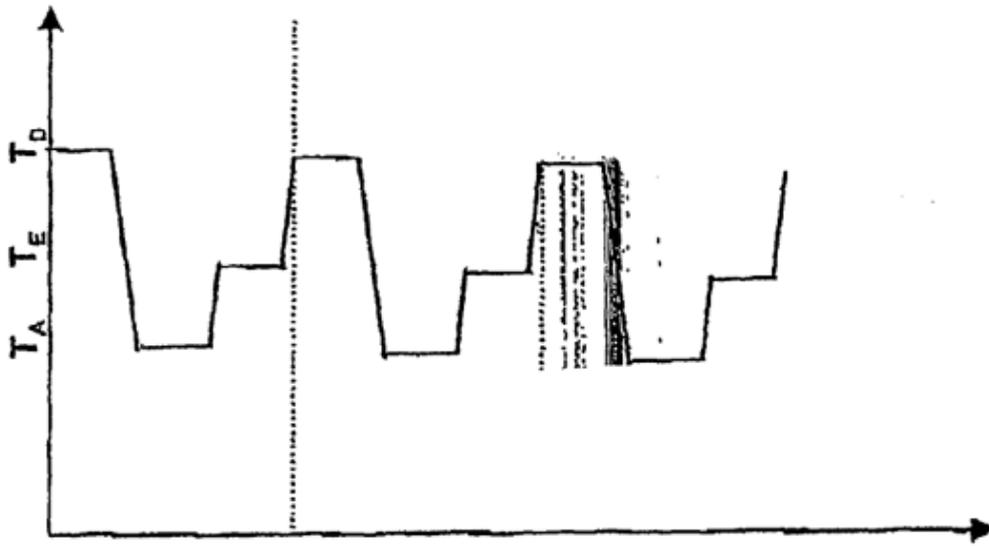


Fig. 21



$T_D$  : Desnaturalización  
 $T_A$  : Apareamiento  
 $T_E$  : Extensión

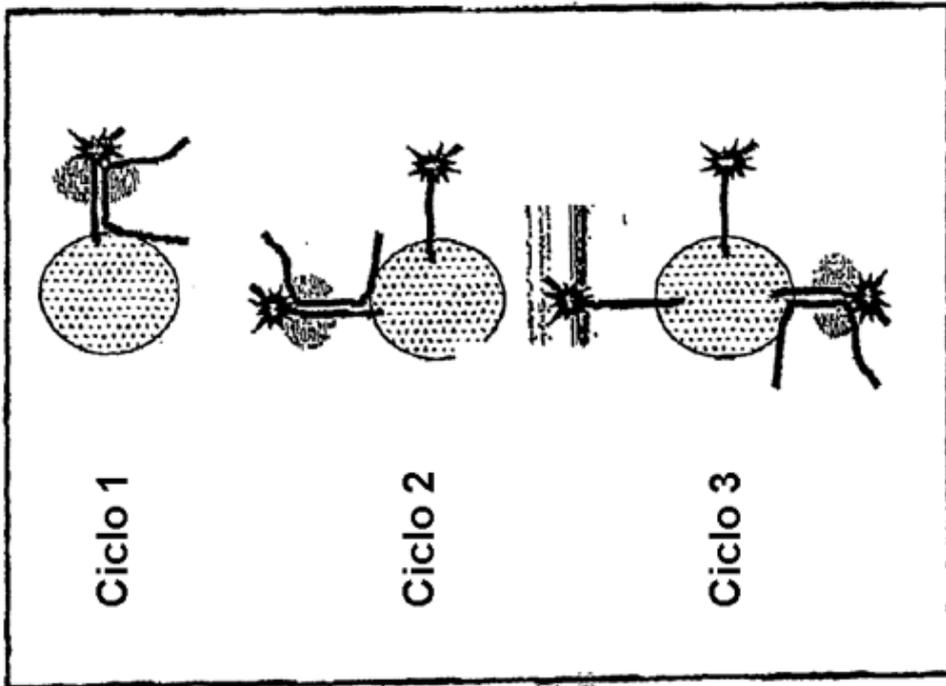


Fig. 22

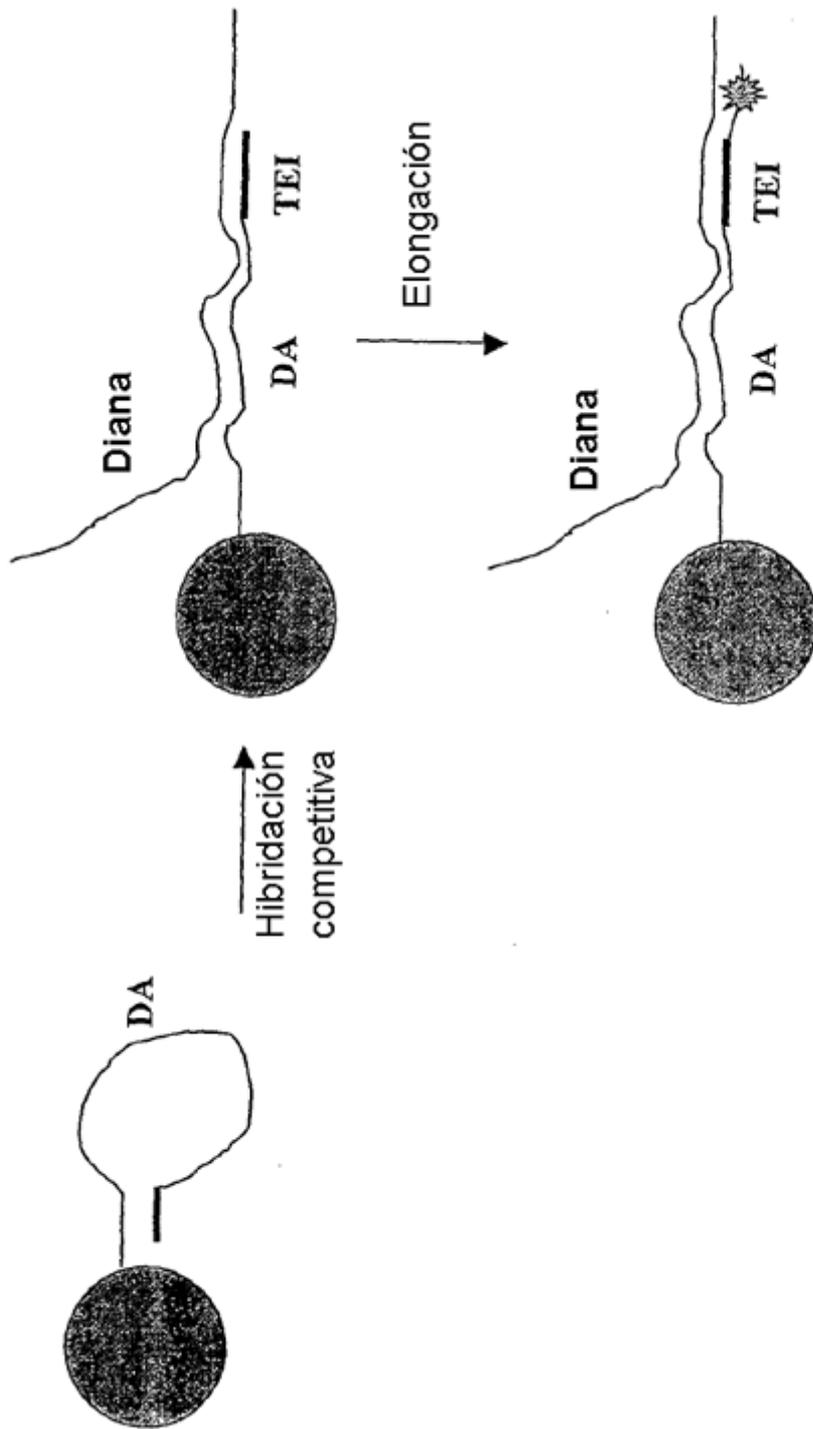


Fig. 23

**Análisis de mutaciones de fibrosis quística y enfermedad de los judíos asquenazíes mediante elongación multiplexada de oligonucleótidos específicos de alelo presentados en alineamientos de perlas personalizadas**  
**Alineamientos de perlas personalizadas**  
**G. Hashmi<sup>2</sup>, Y. Song<sup>2</sup>, M. Seup<sup>2</sup>, L. Edelmann<sup>1</sup>, R. Korreich<sup>1</sup>,  
 And R.J. Desnick<sup>1</sup>**  
<sup>1</sup>Mount Sinai School of Medicine, New York, NY,  
<sup>2</sup>BioArray Solutions Ltd., Piscataway, NJ.

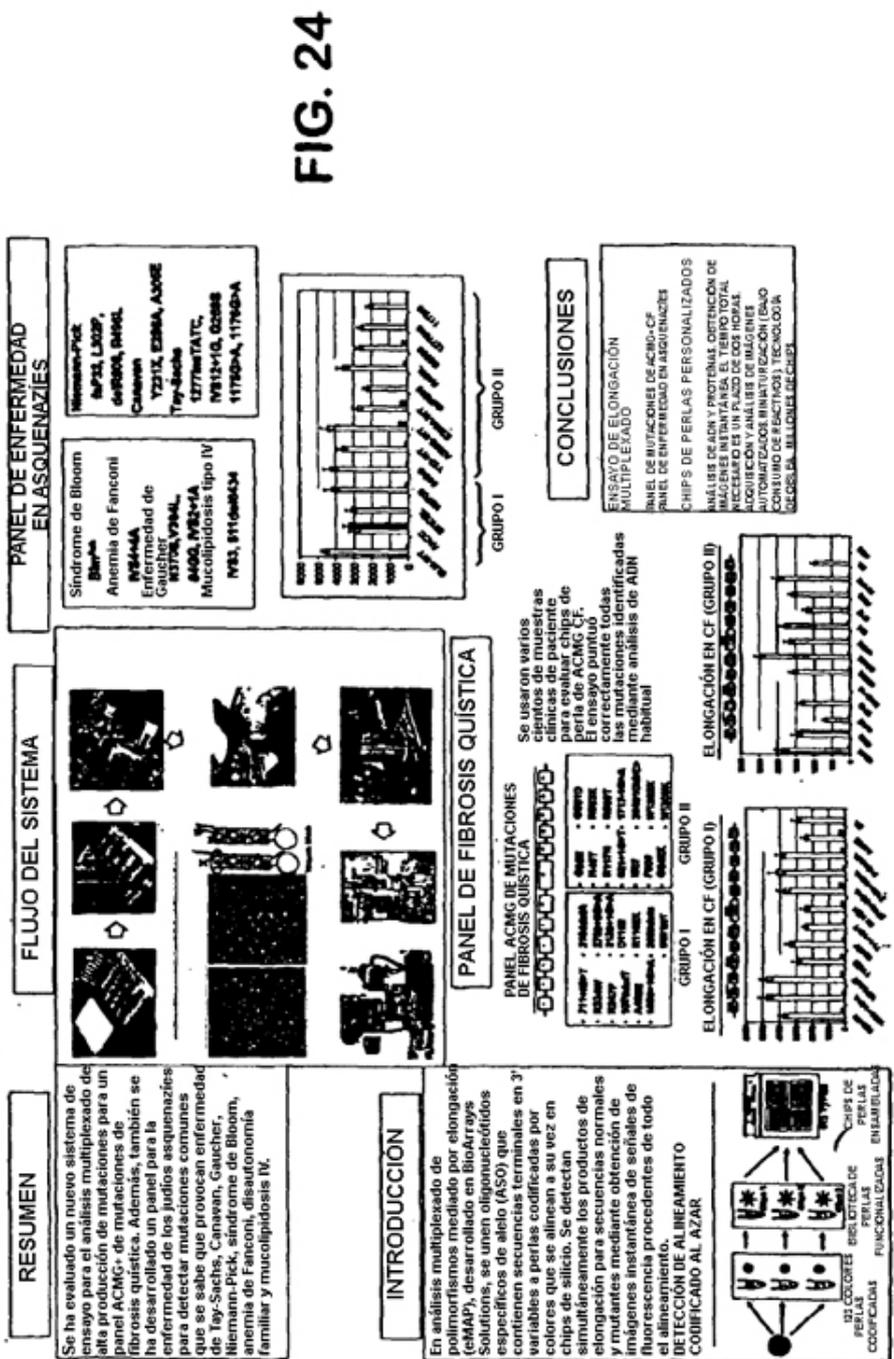


FIG. 24