

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 500**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2011 PCT/US2011/027473**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011 WO11112534**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2011 E 11709836 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2545189**

54 Título: **Enriquecimiento de una PCR por COLD completa con secuencia de bloqueo de referencia**

30 Prioridad:

**08.03.2010 US 311642 P**

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

**26.04.2018**

73 Titular/es:

**DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.**

**(100.0%)**

**450 Brookline Avenue**

**Boston, MA 02215-5450, US**

72 Inventor/es:

**MAKRIGIORGOS, GERASSIMOS**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 665 500 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

Enriquecimiento de una PCR por COLD completa con secuencia de bloqueo de referencia

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a mejoras en la amplificación y el enriquecimiento de secuencias diana de baja prevalencia, p. ej., mutaciones, en muestras de ácidos nucleicos. En particular, la invención se refiere al uso de secuencias de bloqueo de referencia durante la PCR por COLD (siglas inglesas de co-amplificación a baja temperatura de desnaturalización) completa.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Una situación común en el análisis genético con la que se topa habitualmente implica la necesidad de identificar un bajo porcentaje de secuencias de ADN variantes ("secuencias diana") en presencia de un gran exceso de secuencias no variantes ("secuencias de referencia"). Ejemplos de situaciones de este tipo incluyen: (a) identificación y secuenciación de unos pocos alelos mutados en presencia de un gran exceso de alelos normales; (b) identificación de unos pocos alelos metilados en presencia de un gran exceso de alelos no metilados (o viceversa) en el análisis epigenético; (c) detección de bajos niveles de heteroplasma en ADN mitocondrial; (d) detección de  
15 cuasi-especies resistentes a fármacos en infecciones virales y (e) identificación de ADN circulante de tumores en sangre de pacientes con cáncer (en donde se sospecha que las personas tienen cáncer, para rastrear el éxito del tratamiento del cáncer o para detectar la recidiva) en presencia de un gran exceso de alelos de tipo salvaje.

El autor de la presente solicitud ha descrito previamente métodos de PCR por COLD para enriquecer la concentración de alelos de baja abundancia en una mezcla de reacción de PCR de muestra; véase la solicitud de  
20 patente PCT publicada titulada "Enrichment of a Target Sequence", documento WO2009/017784, ahora N° de serie de EE.UU. 12/671.295, por Gerassimos Makrigiorgos y asignada al cesionario de la presente invención. Los métodos de enriquecimiento de PCR por COLD descritos se basan en un protocolo de amplificación de ácidos nucleicos modificado que incubaba la mezcla de reacción a una temperatura de desnaturalización crítica "T<sub>c</sub>". La solicitud de patente anterior divulga dos formatos de PCR por COLD, concretamente PCR por COLD completa y  
25 PCR por COLD rápida.

En una PCR por COLD completa, la mezcla de reacción se somete a una primera temperatura de desnaturalización (p. ej., 94°C) que se elige bastante por encima de la temperatura de fusión para las secuencias de referencia (p. ej., de tipo salvaje) y diana (p. ej., mutante) similares a una PCR convencional. Después, la mezcla se enfría lentamente para facilitar la formación de heterodúplex referencia-diana por hibridación. El descenso constante de la temperatura  
30 de una manera controlada desde 94°C a 70°C a lo largo de un período de tiempo de 8 minutos es típico para asegurar una hibridación adecuada. Alternativamente, la temperatura se reduce rápidamente a 70°C y se mantiene a esta temperatura durante 8 min para asegurar una hibridación adecuada. Una vez enfriada, la mezcla de reacción contiene no solo heterodúplex de referencia-diana, sino también homodúplex de referencia-referencia (y en menor medida homodúplex de diana-diana). Cuando la secuencia diana y la secuencia de referencia se hibridan de forma cruzada, pequeñas diferencias en la secuencia de uno o más emparejamientos erróneos de un solo nucleótido o inserciones o deleciones en cualquier lugar a lo largo de una secuencia corta de ADN de doble cadena (p. ej., < 200 pb) generarán un cambio, pequeño pero predecible, en la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) para esa secuencia (Lipsky, R.H., et al., (2001) Clin Chem, 47, 635-644; Liew, M., et al., (2004) Clin Chem, 50, 1156-1164). Dependiendo del contexto de secuencia exacta y de la posición del emparejamiento erróneo se contemplan cambios en la  
40 temperatura de fusión de 0,1-20°C. La PCR por COLD completa, tal como se describe en la solicitud de patente arriba referenciada, se basa en la diferencia en la temperatura de fusión entre la secuencia de referencia de doble cadena y los heterodúplex de referencia-diana hibridados. Después de enfriar para formar heterodúplex de referencia-diana, la mezcla de reacción se incubaba a una temperatura de desnaturalización crítica (T<sub>c</sub>), que se elige para que sea menor que la temperatura de fusión para la secuencia de referencia de doble cadena y mayor que la  
45 temperatura de fusión menor de los heterodúplex de referencia-diana, desnaturalizando de este modo preferentemente los heterodúplex de diana-referencia hibridados de forma cruzada a lo largo de los homodúplex de referencia-referencia.

La temperatura de desnaturalización (T<sub>c</sub>) crítica es una temperatura por debajo del cual la eficiencia de la PCR cae bruscamente para la secuencia de ácido nucleico de referencia (todavía suficiente para facilitar la desnaturalización de los heterodúplex de referencia-diana). Por ejemplo, una secuencia de p53 de 167 pb se amplifica bien si la temperatura de desnaturalización de la PCR se establece en 87°C, se amplía modestamente a 86,5°C y no proporciona producto detectable si la desnaturalización de la PCR se establece en 86°C o menos. Por lo tanto, en este ejemplo T<sub>c</sub> ~ 86,5°C. Después de la incubación intermedia a la temperatura de desnaturalización crítica (T<sub>c</sub>), los cebadores se reasocian con las cadenas diana y de referencia diana desnaturalizadas de los heterodúplex

desnaturalizados y se extienden mediante una polimerasa, enriqueciendo así la concentración de la secuencia diana con respecto a la secuencia de referencia. Una de las ventajas de la PCR por COLD completa es que el mismo par de cebadores se utiliza para las secuencias diana y de referencia.

5 La PCR por COLD rápida, tal como se describe en la solicitud de patente arriba referenciada, se basa en que existe una diferencia en la temperatura de fusión entre la secuencia de referencia de doble cadena (p. ej., secuencia de tipo salvaje) y la secuencia diana de doble cadena (p. ej., secuencia mutante). En particular, la temperatura de fusión de la secuencia diana debe ser menor que la secuencia de referencia. La temperatura de desnaturalización crítica ( $T_c$ ) en la PCR por COLD rápida es una temperatura por debajo de la cual la eficiencia de la PCR cae bruscamente para la secuencia de ácido nucleico de referencia de doble cadena, aunque aún es suficiente para facilitar la desnaturalización de la secuencia diana de doble cadena. Durante el ciclo de enriquecimiento de la PCR por COLD rápida, la mezcla de reacción no se somete a desnaturalización a una temperatura (p. ej., 94°C) por encima de la temperatura de fusión de la secuencia de referencia como en la primera etapa del ciclo de PCR por COLD completa. Más bien, la mezcla de reacción se incuba a una temperatura de desnaturalización crítica (p. ej.,  $T_c = 83,5^\circ\text{C}$ ), que se elige (a) para que sea inferior a la temperatura de fusión para la secuencia de referencia de doble cadena y superior a la temperatura de fusión más baja de la secuencia diana de doble cadena, o; (b) para que sea inferior a la  $T_m$  de las secuencias tanto de referencia como diana, mientras que sigue creando un diferencial entre el grado de desnaturalización de las secuencias de referencia y diana. Después de incubación a la temperatura de desnaturalización crítica ( $T_c$ ), los cebadores se reasocian a las cadenas diana desnaturalizadas y se extienden por una polimerasa, enriqueciendo así la concentración de la secuencia diana con respecto a la secuencia de referencia. De nuevo, se utiliza el mismo par de cebadores para las secuencias tanto diana como de referencia.

Se ha encontrado que el enriquecimiento a través de la PCR por COLD completa es relativamente ineficiente y lleva mucho tiempo, en comparación con el enriquecimiento a través de la PCR por COLD rápida. Sin embargo, el uso de la PCR por COLD rápida se limita a aplicaciones en las que la temperatura de fusión de la secuencia diana de doble cadena es adecuadamente menor que la temperatura de fusión para la secuencia de referencia de doble cadena. Por ejemplo, las mutaciones no serán detectables en los datos de secuenciación para una muestra con una baja abundancia de secuencias mutantes que ha sido sometida a una PCR por COLD rápida, si la temperatura de fusión de la secuencia mutante es igual a o mayor que la temperatura de fusión de la secuencia de tipo salvaje. Por lo tanto, se desea mejorar la eficacia y la velocidad del ciclo de la PCR por COLD completa.

Se cree que la relativa ineficacia de la PCR por COLD completa se debe principalmente a la escasez de heterodúplex formados particularmente durante los primeros ciclos de la PCR por COLD completa. Incluso si se optimiza el enfriamiento lento durante la etapa de hibridación (p. ej., enfriamiento constante durante 8 minutos de 94°C a 70°C), la muy baja concentración de cadenas diana (p. ej., mutantes) especialmente durante los primeros ciclos reduce la capacidad de formar heterodúplex. No se desea aumentar el tiempo de enfriamiento de la hibridación y, en cualquier caso, no se ha encontrado que sea particularmente eficaz para mejorar el enriquecimiento. Otra razón por la que la PCR por COLD completa puede ser relativamente menos eficiente que la PCR por COLD rápida es que los amplicones durante los ciclos posteriores de la PCR por COLD completa tienen una propensión a reformar sus homodúplex en lugar de formar heterodúplex.

Un objeto de la presente invención es mejorar la eficacia de la formación de heterodúplex en los primeros ciclos de la PCR por COLD completa. Otro objeto es disminuir el tiempo total de ciclo para la PCR por COLD completa.

#### 40 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se dirige a métodos para enriquecer alelos de baja abundancia en una muestra, y está dirigida, en particular, al uso de una cantidad en exceso de secuencia de bloqueo de referencia en la mezcla de reacción con el fin de mejorar la eficacia y reducir el tiempo de ciclo, de la PCR por COLD-PCR completa. La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

45 La presente invención implica una modificación de los métodos de PCR por COLD descritos en relación con las Figs. 1 y 2 de la solicitud de patente arriba referenciada, "Enrichment of a Target Sequence", documento WO2009/017784 ahora N° de serie de EE.UU. 12/671.295, por Gerassimos Makrigrigorgos y asignada al cesionario de la presente invención. Más específicamente, de acuerdo con la invención, se añade una secuencia de bloqueo de referencia modificada por ingeniería genética (p. ej., un oligonucleótido de cadena sencilla) en exceso a la mezcla de reacción antes de someter la mezcla de reacción a termociclaje según un protocolo de PCR por COLD completa modificado.

El método de PCR por COLD completa modificado implica la preparación de una mezcla de reacción de amplificación que contiene una muestra de ácido nucleico. La muestra de ácido nucleico tendrá una secuencia de referencia tal como una secuencia de tipo salvaje, y también se sospecha que contiene una o más secuencias diana, tales como una o más secuencias mutantes. Tal como se mencionó, el propósito de la invención es enriquecer la

concentración de la secuencia diana y, por lo tanto, en la mayoría de las circunstancias, el método se utilizará cuando la secuencia diana, si está presente, es de baja abundancia. La secuencia diana de acuerdo con la invención es al menos 50% homóloga a la secuencia de referencia, aunque el método es especialmente adecuado para enriquecer un alelo mutante que contiene aproximadamente 1 a 10 cambios en la secuencia de nucleótidos. La secuencia diana es amplificable a través de la PCR con el mismo par de cebadores que los utilizados para la secuencia de referencia. Tal como se menciona, la invención implica la presencia de una secuencia de bloqueo de referencia en la mezcla de reacción a un nivel de concentración en exceso. La secuencia de bloqueo de referencia es una secuencia de ácidos nucleicos complementaria con al menos una porción de una de las cadenas de la secuencia de referencia entre sus sitios de cebador, o solapando parcialmente a los sitios de cebador. La secuencia de bloqueo de referencia añadida a la mezcla de reacción es deseablemente de cadena sencilla (pero también puede ser de doble cadena en la medida en que la etapa de desnaturalización inicial dé como resultado secuencias de bloqueo de referencia de cadena sencilla desnaturalizadas).

De acuerdo con el protocolo de la PCR por COLD completa, la mezcla de reacción se somete a una primera temperatura de desnaturalización, p. ej., 95°C, que está por encima de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de la secuencia de referencia y también la secuencia diana, y da como resultado cadenas desnaturalizadas de la secuencia de referencia y la secuencia diana. La mezcla de reacción se enfría para fomentar la hibridación, por ejemplo a aproximadamente 70°C. Dado que el enfriamiento se produce en presencia de una cantidad en exceso de secuencias de bloqueo de referencia, las secuencias de bloqueo de referencia se hibridan preferentemente con la cadena complementaria de la secuencia de referencia y también con la cadena complementaria de la secuencia diana. Por ejemplo, suponiendo que la secuencia de bloqueo de referencia de cadena sencilla se agregue en exceso al comienzo del proceso, la mezcla de reacción en este punto del proceso contendrá heterodúplex de las secuencias de bloqueo de referencia y la referencia complementaria (p. ej., tipo salvaje) y heterodúplex de las secuencias de bloqueo de referencia y las secuencias diana (p. ej., mutantes). La mezcla de reacción en este punto también contiene las cadenas negativas desnaturalizadas para las secuencias de referencia y diana. Los heterodúplex formados presentes en el ciclo de la PCR por COLD completa modificado son fundamentalmente diferentes de los heterodúplex de referencia-diana formados en el protocolo de la PCR por COLD completa descrito en la solicitud de patente arriba referenciada. El suministro de una cantidad en exceso de secuencia de bloqueo de referencia fomenta una hibridación más rápida (p. ej., aproximadamente 30 segundos) que en el protocolo anterior de PCR por COLD completa (p. ej., aproximadamente 8 minutos). En una realización preferida de la presente invención, la etapa de hibridación por enfriamiento tiene menos de un minuto de duración.

La mezcla de reacción se somete luego a una temperatura crítica (p. ej.,  $T_c = 84,5^\circ\text{C}$ ), que es suficiente para permitir la desnaturalización preferente de las cadenas diana de la secuencia de bloqueo de referencia. La temperatura crítica ( $T_c$ ) se selecciona de modo que los dúplex de las cadenas de bloqueo de referencia y las cadenas de referencia complementarias permanecen sin desnaturalizar sustancialmente cuando la mezcla de reacción se incuba a la  $T_c$ , sin embargo, los dúplex de las cadenas de bloqueo de referencia y las cadenas diana se desnaturalizan sustancialmente. El término "sustancialmente" significa al menos 60%, y preferiblemente al menos 90%, o más preferiblemente al menos 98% en una forma desnaturalizada o no desnaturalizada dada. La temperatura de fusión para el dúplex de la secuencia de bloqueo de referencia y las cadenas diana siempre será menor que la temperatura de fusión del dúplex de la secuencia de bloqueo de referencia y la cadena de referencia complementaria, porque la primera contiene un emparejamiento erróneo, mientras que la segunda no.

Después de una desnaturalización preferente, la temperatura de la mezcla de reacción se reduce para permitir que los pares de cebadores se reasocien a la diana libre y a las cadenas de referencia en la mezcla de reacción. De nuevo, suponiendo que los oligonucleótidos de bloqueo de referencia de cadena sencilla se agreguen en exceso al comienzo del proceso, en este punto del ciclo hay, teóricamente, dos cadenas libres de la secuencia diana en comparación con la etapa de desnaturalización inicial y solo una cadena de referencia libre. La otra cadena de referencia se hibrida con la secuencia de bloqueo de referencia y, por lo tanto, no está disponible para la amplificación. Los cebadores reasociados se extienden entonces, lo que da como resultado una amplificación exponencial de la secuencia diana, mientras que la cadena de referencia sólo se amplifica linealmente. Por consiguiente, la secuencia diana se enriquece gradualmente con relación a la secuencia de referencia en la muestra durante los ciclos de PCR por COLD.

Es probable que el método se repita de diez a treinta ciclos o más. Se ha encontrado que aumenta sustancialmente el enriquecimiento de los amplicones diana y disminuye el tiempo de ciclo para la PCR por COLD completa. También es capaz de enriquecer mutaciones homocigotas, que no formarían heterodúplex en el protocolo anterior de la PCR por COLD completa.

La longitud de la secuencia de bloqueo de referencia puede ser igual a o menor o mayor que la longitud de las secuencias diana o de referencia. En una realización preferida, la secuencia de bloqueo de referencia es varias bases más pequeña que las secuencias diana y de referencia en cada lado de la secuencia, de modo que los

cebadores no se unen apreciablemente a la secuencia de referencia. Por lo tanto, la secuencia de bloqueo de referencia no puede extenderse por los cebadores que amplifican la secuencia diana. Con este fin, opcionalmente, el extremo 3' OH de la secuencia de bloqueo de referencia puede ser bloqueado a la extensión de la ADN polimerasa. Además, opcionalmente, el extremo 5' de la secuencia de bloqueo de referencia puede diseñarse con una secuencia de nucleótidos que se solapa parcialmente con los sitios de unión del cebador, de manera que se puede prevenir la exonucleólisis 5' a 3' mediante las Taq ADN polimerasas (es decir, la degradación de la secuencia de bloqueo de referencia hibridada).

Tal como se mencionó, la secuencia de referencia es de cadena sencilla o de doble cadena. En una realización preferida, la secuencia de bloqueo de referencia es ácido nucleico de cadena sencilla. Sin embargo, la secuencia de bloqueo de referencia puede adoptar otras formas, tales como una quimera entre ADN de cadena sencilla, ARN, ácido nucleico peptídico (PNA) o ácido nucleico bloqueado (LNA) u otro nucleótido modificado. Las posiciones de PNA o LNA en la secuencia de la quimera pueden seleccionarse para que coincidan con las posiciones en las que es probable que se produzcan mutaciones, con el fin de maximizar el efecto de los posibles emparejamientos erróneos en esas posiciones. La secuencia de bloqueo de referencia también puede ser PNA de cadena sencilla o ADN de cadena sencilla.

Otras realizaciones y ventajas de la invención pueden ser evidentes para los expertos en la técnica al revisar los dibujos y la siguiente descripción detallada.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 ilustra una realización de la técnica anterior de PCR por COLD completa para enriquecer selectivamente una secuencia diana tal como se describe en la solicitud de patente anterior titulada "Enrichment of a Target Sequence", documento WO2009/017784, ahora N° de serie de EE.UU. 12/671.295.

La Fig. 2 ilustra el principio de la presente invención que mejora la PCR por COLD completa a través de la presencia de una cantidad en exceso de una secuencia de bloqueo de referencia en la mezcla de reacción de amplificación.

La Fig. 3 es un dibujo esquemático que ilustra una secuencia de bloqueo de referencia de 60 pb para implementar una realización de la invención. Un amplicón de 87 pb se amplifica preliminarmente utilizando los cebadores subrayados. Se diseña una secuencia complementaria de bloqueo de referencia para cada una de las cadenas y contiene un grupo fosfato 3' no extensible.

La Fig. 4 muestra datos de secuenciación de Sanger para el enriquecimiento de alelos mutantes PFSK-1 a partir de muestras procesadas utilizando una PCR regular, PCR por COLD completa sin el uso de una secuencia de bloqueo de referencia en la mezcla de reacción; PCR por COLD completa con un exceso de secuencia de bloqueo de referencia en la mezcla de reacción y PCR por COLD rápida, respectivamente.

La Fig. 5 muestra datos de secuenciación de Sanger para el enriquecimiento de alelos mutantes HCC1008 a partir de muestras procesadas utilizando una PCR regular, PCR por COLD completa sin el uso de una secuencia de bloqueo de referencia en la mezcla de reacción; PCR por COLD completa con un exceso de secuencia de bloqueo de referencia (RS) (60 pb) en la mezcla de reacción, y PCR por COLD rápida, respectivamente.

La Fig. 6 muestra los datos de secuenciación de Sanger para el enriquecimiento de alelos mutantes HCC2218 a partir de muestras procesadas utilizando una PCR regular, PCR por COLD completa sin el uso de una secuencia de bloqueo de referencia en la mezcla de reacción; PCR por COLD completa con un exceso de secuencia de bloqueo de referencia (RS) en la mezcla de reacción y PCR por COLD rápida, respectivamente.

La Fig. 7 muestra datos de secuenciación de Sanger para el enriquecimiento de alelos mutantes TL92 (1 pb G del) a partir de muestras procesadas utilizando una PCR regular, PCR por COLD completa sin el uso de una secuencia de bloqueo de referencia en la mezcla de reacción; PCR por COLD completa con un exceso de secuencia de bloqueo de referencia (RS) en la mezcla de reacción y PCR por COLD rápida, respectivamente.

La Fig. 8 muestra datos de secuenciación de Sanger para el enriquecimiento de alelos mutantes HCC1008 a partir de muestras procesadas utilizando una PCR por COLD completa con el uso de una secuencia de bloqueo de referencia (RS) de 90 pb.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

##### Definiciones

5 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "enriquecer una secuencia diana" se refiere a aumentar la cantidad de una secuencia diana y aumentar la relación de la secuencia diana con respecto a la secuencia de referencia correspondiente en una muestra. Por ejemplo, cuando la relación de la secuencia diana a la secuencia de referencia es inicialmente de 5% a 95% en una muestra, la secuencia diana puede amplificarse preferentemente en una reacción de amplificación para producir una relación de 70% de secuencia diana a 30% de secuencia de referencia. Por lo tanto, existe un enriquecimiento de 14 veces de la secuencia diana con respecto a la secuencia de referencia.

10 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "secuencia diana" se refiere a un ácido nucleico que es menos prevalente en una muestra de ácido nucleico que una secuencia de referencia correspondiente. La secuencia diana constituye menos del 50% de la cantidad total de la secuencia de referencia + secuencia diana en una muestra. La secuencia diana puede ser un alelo mutante. Por ejemplo, una muestra (p. ej., una muestra de sangre) puede contener numerosas células normales y unas pocas células cancerosas. Las células normales contienen alelos no mutantes o de tipo salvaje, mientras que el pequeño número de células cancerosas contiene mutaciones somáticas. En este caso, el mutante es la secuencia diana, mientras que la secuencia de tipo salvaje es la secuencia de referencia.

Tal como se utiliza en esta memoria, una "cadena diana" se refiere a una sola cadena de ácido nucleico de una secuencia diana.

20 La secuencia diana debe ser al menos 50% homóloga a la secuencia de referencia correspondiente, pero debe diferir en al menos un nucleótido de la secuencia de referencia. Las secuencias diana son amplificables por PCR con el mismo par de cebadores que los utilizados para la secuencia de referencia.

25 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "secuencia de referencia" se refiere a un ácido nucleico que es más prevalente en una muestra de ácido nucleico que una secuencia diana correspondiente. La secuencia de referencia constituye más del 50% de la secuencia de referencia total + secuencia diana en una muestra. Preferiblemente, la secuencia de referencia se expresa al nivel de ARN y/o ADN 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces 100 veces, 150 veces, 200 veces o más que la secuencia diana. Tal como se utiliza en esta memoria, una "cadena de referencia" se refiere a una sola cadena de ácido nucleico de una secuencia de referencia.

30 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "tipo salvaje" se refiere a la secuencia o alelo de polinucleótido más común para un determinado gen en una población. Generalmente, el alelo de tipo salvaje se obtendrá de células normales.

35 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "mutante" se refiere a un cambio de nucleótido (es decir, una sustitución, delección o inserción de nucleótidos única o múltiple) en una secuencia de ácidos nucleicos. Un ácido nucleico que porta una mutación tiene una secuencia de ácido nucleico (alelo mutante) que es diferente en secuencia de la secuencia de polinucleótido de tipo salvaje correspondiente. La invención está ampliamente relacionada con mutaciones somáticas y polimorfismos. Los métodos de la invención son especialmente útiles para enriquecer selectivamente un alelo mutante que contiene entre aproximadamente 1 y 10 cambios en la secuencia de nucleótidos, aunque es útil incluso con un mayor número de cambios de secuencia. Típicamente, un alelo mutante se obtendrá de tejidos o células enfermos y se asocia con un estado de enfermedad.

40 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "temperatura de fusión" o " $T_m$ " se refiere a la temperatura a la que un polinucleótido se disocia de su secuencia complementaria. En general, la  $T_m$  puede definirse como la temperatura a la que la mitad de los pares de bases de Watson-Crick en una molécula de ácido nucleico de doble cadena se rompen o disocian (es decir, se "funden"), mientras que la otra mitad de los pares de bases de Watson-Crick permanecen intactos en una conformación de doble cadena. En otras palabras, la  $T_m$  se define como la temperatura a la que el 50% de los nucleótidos de dos secuencias complementarias se reasocian (dobles cadenas) y el 50% de los nucleótidos se desnaturalizan (cadenas sencillas). La  $T_m$  por lo tanto, define un punto medio en la transición de moléculas de ácido nucleico de doble cadena a de cadena sencilla (o, por el contrario, en la transición de moléculas de ácido nucleico de cadena sencilla a de doble cadena).

50 La  $T_m$  se puede estimar mediante un cierto número de métodos, por ejemplo mediante un cálculo del vecino más próximo tal como según Wetmur 1991 (Wetmur, J.G. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid Hybridization. Crit Rev Biochem Mol Biol 26: 227-259) y por programas comerciales que incluyen OligoTM Primer Design y programas disponibles en Internet. Alternativamente, la  $T_m$  puede determinarse mediante experimentación real. Por ejemplo, la unión a ADN de doble cadena o colorantes intercalantes tales como bromuro de etidio o verde SYBR (Molecular Probes) se pueden utilizar en un ensayo de curva de fusión para determinar la  $T_m$  real del ácido nucleico. Métodos adicionales para determinar la  $T_m$  de un ácido nucleico son bien conocidos en la técnica. Algunos

de estos métodos se enumeran en la solicitud de patente anterior del autor de la invención titulada "Enrichment of a Target Sequence", Solicitud Internacional.WO2009/017784.

5 Tal como se utiliza en esta memoria, "secuencia de bloqueo de referencia" es una secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla o de doble cadena modificada por ingeniería genética, tal como un oligonucleótido, y preferiblemente tiene una longitud menor que la secuencia diana. En una realización preferida, la secuencia de bloqueo de referencia es varias bases más pequeña que la secuencia de referencia, en cada lado de la secuencia, de modo que los cebadores no se unen apreciablemente a la secuencia de referencia. Opcionalmente, el extremo 3' OH de la secuencia de bloqueo de referencia se bloquea para la extensión de ADN-polimerasa, el extremo 5 se modifica para evitar la exonucleólisis 5' a 3' mediante Taq ADN polimerasas. La secuencia de bloqueo de referencia también puede adoptar otras formas que permanecen reasociadas a la secuencia de referencia cuando la mezcla de reacción se somete a la temperatura crítica "T<sub>c</sub>", tal como una quimera entre el ADN de cadena sencilla, el ARN, el ácido nucleico peptídico (PNA) o el ácido nucleico bloqueado (LNA) u otro nucleótido modificado.

15 Tal como se utiliza en relación con la presente invención, la expresión "temperatura crítica" o "T<sub>c</sub>" se refiere a una temperatura seleccionada para desnaturalizar preferentemente dúplex de cadenas dianas y la secuencia de bloqueo de referencia. La temperatura crítica (T<sub>c</sub>) se selecciona de modo que los dúplex que consisten en las cadenas de bloqueo de referencia y las cadenas de referencia complementarias permanecen sin desnaturalizar sustancialmente cuando la mezcla de reacción se incuba a T<sub>c</sub>, pero dúplex que consisten en las cadenas de bloqueo de referencia y las cadenas diana se desnaturalizan sustancialmente. El término "sustancialmente" significa al menos 60%, y preferiblemente al menos 90% o más, preferiblemente al menos 98% en una forma desnaturalizada o no desnaturalizada dada. En los ejemplos proporcionados más adelante, la temperatura crítica "T<sub>c</sub>" seleccionada para la etapa de incubación intermedia es 84,5°C, mientras que la primera temperatura de desnaturalización es 95°C.

25 Tal como se utiliza en esta memoria, "par de cebadores" se refiere a dos cebadores que se reasocian con cadenas opuestas de una secuencia diana y de referencia con el fin de formar un producto de amplificación durante una reacción PCR. La secuencia diana y de referencia deberían tener al menos 25 bases con el fin de facilitar la unión del cebador. El par de cebadores se diseña de modo que tenga una T<sub>m</sub> menor que la T<sub>c</sub> de la reacción.

30 Tal como se utiliza en esta memoria, "homología" se refiere a la similitud de la secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, p. ej., dos polinucleótidos o dos polipéptidos. Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de la secuencia y la similitud de la secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997) y Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990), respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

#### Amplificación de Ácidos Nucleico en General

35 En una realización, una muestra de ácido nucleico utilizada en el método de la invención comprende ADN genómico que tiene una secuencia diana y de referencia. En otra realización, la muestra de ácido nucleico del método de la invención comprende secuencias diana y de referencia que se amplificaron previamente en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos. El experto en la técnica apreciará que existen muchos métodos disponibles para amplificar un ácido nucleico. Quizás el método más popular es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por ejemplo, véanse, las Pat. de EE.UU. N°s 4.683.195 y 4,683,202, así como Saiki et al., Science 230:1350-1354 (1985) y Gyllensten et al., PNAS (USA) 85:7652-7656 (1985)). Una variación preferida del método de PCR es la PCR asimétrica (por ejemplo, véase Mao et al., Biotechniques 27(4):674-678 (1999); Lehbein et al., Electrophoresis 19(8-9):1381-1384 (1998); Lazaro et al., Mol. Cell. Probes 6(5):357-359 (1992); Pat. de EE.UU. N° 6.197.499). Otros métodos de amplificación incluyen, pero no se limitan a amplificación de desplazamiento de la cadena (SDA) (véase, Walker et al., Nucleic Acids Res. 20(7):1691-1696 (1992), así como las Pat. de EE.UU. N°s 5.744.311, 5.648.211 y 5.631.147), amplificación de círculo rodante (RCA) (véase la publicación PCT WO 97/19193), la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) (véase Compton, Nature 350:91-92 (1991), así como las Pat. de EE.UU. N°s 5.409.818 y 5.554.527), amplificación mediada por transcritos (TMA) (véase Kwoh et al., PNAS (USA) 86:1173-1177 (1989), así como la Pat. de EE.UU. N° 5.399.491), replicación de la secuencia auto-sostenida (3SR) (véase Guatelli et al., PNAS (USA) 87:1874-1879 (1990) y reacción en cadena de la ligasa (LCA) (véanse las Pat. de EE.UU. N°s 5.427.930 y 5.792.607).

50 En su forma más simple, la PCR es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias de ADN específicas, utilizando dos cebadores de oligonucleótidos que se hibridan a cadenas opuestas y flanquean la región de interés en el ADN diana. Una serie repetitiva de etapas de reacción que implican la desnaturalización del molde, la reasociación de cebadores y la extensión de los cebadores reasociados mediante ADN polimerasa da como resultado la acumulación exponencial de un fragmento específico, cuyos extremos están definidos por los extremos 5' de los cebadores. Se informa que la PCR es capaz de producir un enriquecimiento selectivo de una secuencia de

ADN específica en un factor de 109 con respecto a otras secuencias en el ADN genómico. El método de la PCR también se describe en Saiki et al., 1985, Science 230:1350.

5 La PCR se realiza utilizando ADN del molde (secuencias diana y de referencia) (al menos 1 fg, más útilmente, 1-1000 ng) y al menos 25 pmol de cebadores oligonucleotídicos. Una mezcla de reacción típica incluye: 2 µl de ADN, 25 pmol de cebador oligonucleotídico, 2,5 µl de un tampón adecuado, 0,4 µl de dNTP 1,25 µM, 2,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Stratagene) y agua desionizada hasta un volumen total de 25 µl. La PCR se realiza utilizando un ciclador térmico programable.

10 La longitud y la temperatura de cada una de las etapas de un ciclo de PCR, así como el número de ciclos, se ajustan de acuerdo con los requisitos de rigurosidad vigentes. La temperatura y el tiempo de reasociación están determinados tanto por la eficacia con la que se espera que un cebador se reasocie a un molde como por el grado de emparejamiento erróneo que debe tolerarse. La capacidad de optimizar la rigurosidad de las condiciones de reasociación del cebador está dentro del conocimiento de un experto en la técnica. Se utiliza una temperatura de reasociación de entre 30°C y 72°C. La desnaturalización inicial de las moléculas del molde normalmente se produce a entre 92°C y 99°C durante 4 minutos, seguida de 20-40 ciclos que consisten en la desnaturalización (94-99°C durante 15 segundos a 1 minuto), reasociación (temperatura determinada tal como se describe arriba, 1-2 minutos) y extensión (72°C durante 1 minuto). La etapa de extensión final se lleva a cabo generalmente durante 4 minutos a 72°C, y puede ser seguida de una etapa indefinida (0-24 horas) a 4°C.

20 La PCR utiliza una polimerasa de ácido nucleico, o enzima que cataliza la polimerización de nucleósido trifosfatos. Generalmente, la enzima iniciará la síntesis en el extremo 3' del cebador reasociado con la secuencia diana, y procederá en la dirección 5' a lo largo del molde. ADN polimerasas conocidas incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa I de *E. coli*, ADN polimerasa de T7, ADN polimerasa de *Thermus thermophilu* (Tth), ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus*, ADN polimerasa de *Thermococcus litoralis*, ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) y ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu). La expresión "ácido nucleico polimerasa" también abarca ARN polimerasas. Si el molde de ácido nucleico es ARN, entonces "ácido nucleico polimerasa" se refiere a una actividad de polimerización dependiente de ARN, tal como una transcriptasa inversa.

25 Los procedimientos de enriquecimiento de la presente invención se realizan en un dispositivo de PCR tal como un termociclador, o más preferiblemente en condiciones de reacción en tiempo real en un dispositivo de PCR en tiempo real. Las condiciones de reacción en tiempo real utilizan, además un agente de detección de ácidos nucleicos (p. ej., colorante o sonda) con el fin de medir/detectar el producto de PCR a medida que se produce.

### 30 Muestras

35 Tal como se utiliza en esta memoria, "muestra" se refiere a cualquier sustancia que contenga o se presume que contenga un ácido nucleico de interés (secuencias diana y de referencia) o que es en sí mismo un ácido nucleico que contiene o se supone que contiene un ácido nucleico diana de interés. El término "muestra" incluye, por lo tanto, una muestra de ácido nucleico (ADN genómico, ADNc, ARN), célula, organismo, tejido, fluido o sustancia que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, plasma, suero, fluido espinal, fluido linfático, fluido sinovial, orina, lágrimas, heces, secreciones externas de la piel, tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, saliva, células de la sangre, tumores, órganos, tejido, muestras de constituyentes del cultivo celular *in vitro*, aislados naturales (tales como agua potable, agua de mar, materiales sólidos), muestras microbianas y objetos o especímenes que han sido "marcados" con moléculas trazadoras de ácidos nucleicos.

40 Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención se pueden amplificar a partir de ADN genómico. El ADN genómico se puede aislar a partir de tejidos o células de acuerdo con el siguiente método. Alternativamente, las secuencias de ácidos nucleicos de la invención se pueden aislar de la sangre mediante métodos bien conocidos en la técnica.

45 Para facilitar la detección de una forma variante de un gen de un tejido particular, el tejido se aísla. Para aislar ADN genómico del tejido de mamíferos, el tejido se tritura y se congela en nitrógeno líquido. El tejido congelado se moltura para obtener un polvo fino con un mortero pre-enfriado rápidamente y se suspende en tampón de digestión (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 25 mM, pH 8,0, SDS al 0,5% (p/v), 0,1 mg/ml de proteinasa K) a 1,2 ml de tampón de digestión por cada 100 mg de tejido. Para aislar ADN genómico de células de cultivo de tejidos de mamíferos, las células se sedimentan por centrifugación durante 5 min a 500 x g, se resuspenden en 1-10 ml de PBS helado, se repelen durante 5 min a 500 x g y se resuspenden en 1 volumen de tampón de digestión.

50 Las muestras en tampón de digestión se incuban (con agitación) durante 12-18 horas a 50°C, y luego se extraen con un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Si las fases no se resuelven después de una etapa de centrifugación (10 min a 1700 x g), se agrega otro volumen de tampón de digestión (sin proteinasa K) y se repite la



etapa de centrifugación. Si un material blanco espeso es evidente en la interfaz de las dos fases, se repite la etapa de extracción orgánica. Después de la extracción, la capa acuosa superior se transfiere a un nuevo tubo al que se agregará 1/2 volumen de acetato de amonio 7,5 M y 2 volúmenes de etanol al 100%. El ácido nucleico se sedimenta por centrifugación durante 2 min a 1700 x g, se lava con etanol al 70%, se seca al aire y se resuspende en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, pH 8,0) a 1 mg/ml. El ARN residual se separa incubando la muestra durante 1 hora a 37°C en presencia de SDS al 0.1% y 1 µg/ml de ARNasa exenta de DNasa, y repitiendo las etapas de extracción y de precipitación con etanol. Se espera que el rendimiento de ADN genómico, de acuerdo con este método, sea de aproximadamente 2 mg de ADN/1 g de células o tejido (Ausubel et al., supra). El ADN genómico aislado de acuerdo con este método se puede utilizar de acuerdo con la invención.

El ADN diana también se puede extraer de sangre entera. Por ejemplo, se puede extraer sangre por métodos estándares en un tubo de recogida, que comprende preferentemente vidrio siliconado, sin anticoagulante para la preparación de suero o con EDTA, citrato de sodio, heparina o anticoagulantes similares, lo más preferentemente EDTA, para la preparación de plasma. El método preferido, aunque no es absolutamente necesario, es que el plasma o el suero se fraccionen a partir de sangre entera. El plasma o el suero se pueden fraccionar a partir de sangre entera mediante centrifugación, preferiblemente centrifugación suave a 300 hasta 800 x g durante 5-10 minutos, o se pueden fraccionar por otros métodos estándares. Dado que la heparina puede interferir con la PCR, el uso de sangre heparinizada puede requerir un pre-tratamiento con heparinasa. Por lo tanto, EDTA es el anticoagulante preferido para muestras de sangre. Plasma o suero sanguíneo recién recogido, o plasma congelado (almacenado) y posteriormente descongelado o suero puede utilizarse en los métodos de la invención. El plasma o suero almacenado debe mantenerse a -20°C hasta -70°C, y el plasma o suero recién recogidos se mantienen refrigerados o se mantienen en hielo hasta su uso. El ADN puede luego extraerse por métodos bien conocidos en la técnica.

El método de la presente invención se puede utilizar para detectar si se ha producido metilación en una secuencia diana. El método de detección de la metilación comprende un enfoque químico o enzimático para el tratamiento del ADN sensible a la metilación. Los tratamientos químicos incluyen la incubación de ADN con bisulfito de sodio, que convierte selectivamente las citosinas no metiladas en uracilos. El ADN se desnaturaliza primero por calor y luego se trata con bisulfito 5M, pH 5-7. El pre-tratamiento del ADN genómico para separar los uracilos pre-existentes se utiliza antes del tratamiento con bisulfito. Este pre-tratamiento consiste en el tratamiento con uracilo glicosilasa en presencia de hidroxilamina 5 mM, pH 7.

Debido a que las citosinas metiladas de la secuencia diana se convierten en uracilos, formarán ahora emparejamientos erróneos cuando forman un dúplex con la secuencia de bloqueo de referencia en la etapa de enfriamiento de la hibridación de la PCR por COLD completa (en presencia de secuencia de bloqueo de referencia).

#### PCR por COLD completa en Ausencia de Secuencia de Bloqueo de Referencia (Técnica Anterior)

La Fig. 1 ilustra el procedimiento de la técnica anterior, conocido como PCR por COLD completa, para enriquecer una secuencia diana en una muestra de ácido nucleico que contiene una secuencia diana y de referencia tal como se explica en la Solicitud de EE.UU. N° de serie 12/671.295, titulada "Enrichment of a target Sequence" arriba incorporada. La Fig. 1 es una reproducción de la Fig. 1 en la solicitud de patente arriba incorporada.

Las secuencias diana y de referencia se pueden obtener a partir de una diversidad de fuentes que incluyen ADN genómico, ADNc, ADN vírico, ADN de mamífero, ADN fetal o ADN bacteriano. Mientras que la secuencia de referencia es generalmente el alelo de tipo salvaje y la secuencia diana es el alelo mutante, lo inverso también puede ser cierto. El alelo mutante puede incluir una o más deleciones, inserciones o alteraciones de nucleótidos. En algunas realizaciones, el alelo mutante es una mutación somática. En otras realizaciones, la secuencia diana es ADN metilado, mientras que la secuencia de referencia es ADN no metilado.

El método incluye someter la mezcla de reacción de amplificación a una primera temperatura de desnaturalización (Fig. 1A, Etapa 1) que está por encima de la temperatura de fusión " $T_m$ " de una secuencia de referencia. La  $T_m$  de un ácido nucleico puede determinarse mediante experimentación o estimarse mediante cálculo. El experto en la materia conoce muy bien numerosos métodos bien conocidos para determinar la  $T_m$  de un ácido nucleico, algunos de los cuales se describen en esta memoria. La primera temperatura de desnaturalización se selecciona generalmente, ya que generalmente se seleccionaría la temperatura de desnaturalización de una reacción de PCR y debería ser lo suficientemente alta como para permitir la desnaturalización completa de las secuencias diana y de referencia (p. ej., 94°C). En una realización, la primera temperatura de desnaturalización es de aproximadamente 1°C a 30°C por encima de la  $T_m$  de la secuencia de referencia, más preferiblemente la  $T_m$  de la secuencia de referencia es de aproximadamente 5°C a 20°C por encima de la  $T_m$  de la secuencia de referencia.

A continuación, se disminuye la temperatura de la mezcla de reacción de amplificación, permitiendo que las secuencias diana y las secuencias de referencia se hibriden (Fig. 1A, Etapa 2). Esta etapa de reasociación da como resultado la formación de dúplex de las secuencias diana-diana, referencia-referencia y diana-referencia, pero debe optimizarse para formar dúplex de diana-referencia. Los cebadores de PCR utilizados en el método están diseñados para tener una temperatura de fusión que les impida unirse a la diana y a las secuencias de referencia a esta temperatura intermedia. Como se mencionó anteriormente, se ha encontrado que el requisito de hibridación de diana-referencia y la cantidad relativamente grande de tiempo necesaria para el enfriamiento (Fig. 1A, Etapa 2) limita la efectividad de la PCR por COLD completa, al menos en algunas aplicaciones.

Los dúplex de hibridación diana-referencia son entonces preferentemente desnaturalizados aumentando la temperatura de la mezcla de reacción a la  $T_c$  (Fig. 1A, Etapa 3). La  $T_c$  o temperatura crítica en la Fig. 1 se selecciona para que esté por debajo de la  $T_m$  de la secuencia de referencia, pero por encima de la  $T_m$  del dúplex diana-referencia. Tal como se mencionó anteriormente, cuando la secuencia diana y la secuencia de referencia se hibridan de forma cruzada, diferencias de secuencia menores de uno o más emparejamientos erróneos en cualquier lugar a lo largo de una secuencia de ADN de doble cadena generarán un cambio pequeño, pero predecible en la temperatura de fusión ( $T_m$ ) para esa secuencia (Lipsky, R.H., et al. (2001) *Clin Chem*, 47, 635-644; Liew, M., et al. (2004) *Clin Chem*, 50, 1156-1164). Dependiendo del contexto de secuencia exacto y de la posición del emparejamiento erróneo, son posibles cambios de temperatura de fusión en el intervalo de 0,1-20°C. La  $T_c$  se aplica generalmente (Fig. 1A, Etapa 3) de aproximadamente 1 segundo a 5 minutos, más preferiblemente de 5 segundos a 30 segundos. Si se desea, es posible oscilar entre las etapas 3 y 2 para múltiples ciclos.

Después de la desnaturalización preferencial de los dúplex de hibridación diana-referencia, la temperatura de la mezcla de reacción se reduce para permitir que uno o más cebadores se reasocien con la secuencia diana (Fig. 1A, Etapa 4). Los cebadores reasociados se extienden luego por una polimerasa de ácido nucleico (Fig. 1A, Etapa 5), enriqueciendo así la secuencia diana en la población de ácidos nucleicos contenida en la muestra.

Las etapas del método generalmente se repiten durante múltiples ciclos con el fin de obtener una amplificación suficiente de las secuencias diana y de referencia. En una realización, las etapas del método se repiten durante 5-40 ciclos y más preferiblemente 10-30 ciclos. El número óptimo de ciclos puede ser determinado por un experto en la técnica. Preferiblemente, los presentes métodos se realizan en un dispositivo de PCR, más preferiblemente bajo condiciones de reacción en tiempo real en un dispositivo de PCR de detección en tiempo real, tal como el dispositivo de PCR en tiempo real SMARTCYCLER (Cepheid, Sunnyvale, CA) y el dispositivo de PCR en tiempo real Mx3005P (Stratagene, La Jolla, CA). En esta realización, la mezcla de reacción puede incluir un agente de detección de ácido nucleico (p. ej., colorante de detección de ácidos nucleicos tal como colorante SYBR Green o colorante LC-Green o una sonda operativamente acoplada a un colorante fluorescente) para cuantificar y/o controlar los productos de amplificación de la reacción. Una vez que se completa el enriquecimiento de la secuencia diana, la muestra puede procesarse adicionalmente, p. ej., puede someterse a una reacción de secuenciación. Los alelos enriquecidos pueden procesarse adicionalmente mediante una diversidad de procedimientos que incluyen: MALDI-TOF, fusión HR, secuenciación di-desoxi, secuenciación de una sola molécula, secuenciación de alto rendimiento de segunda generación, pirosecuenciación, RFLP, PCR digital y PCR cuantitativa (véase la Fig. 1B). Una descripción más detallada de estas tecnologías de procesamiento, así como los ensayos de diagnóstico se incluyen en el documento WO2009/017784, titulado "Enrichment of a Target Sequence".

#### Ciclo de PCR por COLD Completa con Exceso de Secuencia de Bloqueo de Referencia en la Mezcla de Reacción

La Fig. 2 ilustra el enriquecimiento de una secuencia diana de acuerdo con el método de PCR por COLD completa modificado de la presente invención. Para empezar (Fig. 2, etapa 1), la muestra de ácido nucleico contiene una secuencia de referencia de doble cadena 10 (p. ej., una secuencia de tipo salvaje) y contiene una secuencia diana de doble cadena 12 (p. ej., una secuencia mutante). La mezcla de reacción por amplificación contiene la muestra, otros ingredientes de la PCR y, de acuerdo con la invención, una secuencia de bloqueo de referencia 14 a un nivel de concentración en exceso, tal como 25 nM. En la Fig. 2, la secuencia de bloqueo de referencia 14 representada es una secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla complementaria con una de las cadenas 10A de la secuencia de referencia 10 entre sus sitios de cebador.

La mezcla de reacción en la etapa 1 de la Fig. 2 se somete a una primera temperatura de desnaturalización, p. ej., 95°C durante 30 segundos, lo que da como resultado cadenas desnaturalizadas de la secuencia de referencia 10A, 10B y la secuencia diana 12A, 12B. La mezcla de reacción se enfría luego para fomentar la hibridación, p. ej., 70°C durante 30 segundos, que es una reducción drástica del enfriamiento normal de 8 minutos en la técnica anterior. Dado que el enfriamiento se produce en presencia de una cantidad en exceso de secuencias de bloqueo de referencia 14, las secuencias de bloqueo de referencia 14 se hibridan preferentemente con la cadena complementaria 10A de la secuencia de referencia y también con la cadena complementaria 12A de la secuencia diana. La etapa 2 en la Fig. 2 ilustra el estado de la mezcla de reacción después de la hibridación por enfriamiento a

70°C. Además de los heterodúplex 16 de la secuencia de bloqueo de referencia 14 y la cadena complementaria de referencia 10A y los heterodúplex 18 de la secuencia de bloqueo de referencia 14 y la cadena diana complementaria 12A, la mezcla de reacción contiene también las cadenas negativas desnaturalizadas 10B y 12B de las secuencias de referencia y diana, respectivamente.

5 En la etapa 3 de la Fig. 2, La mezcla de reacción se somete luego a la temperatura crítica " $T_c$ ", p. ej., 84,5°C, que se elige para permitir la desnaturalización preferencial de los heterodúplex 18 de la cadena diana 12A y la secuencia de bloqueo de referencia 14. La temperatura crítica ( $T_c$ ) se selecciona de manera que los dúplex 16 de las cadenas de bloqueo de referencia 14 y las cadenas de referencia complementarias 10A permanezcan sustancialmente sin desnaturalizar cuando la mezcla de reacción se incuba a " $T_c$ ". La temperatura de fusión para el dúplex 18 de la  
10 secuencia de bloqueo de referencia 14 y la cadena diana 10B siempre será menor que la temperatura de fusión del dúplex 16 de la secuencia de bloqueo de referencia 14 y la cadena de referencia complementaria 10A porque la secuencia de bloqueo de referencia 14 es totalmente complementaria con al menos una parte de la cadena de referencia 10A, y habrá al menos un emparejamiento erróneo con la cadena diana 12A.

15 Con referencia a la etapa 4 de la Fig. 2, después de la desnaturalización preferencial, la temperatura de la mezcla de reacción se reduce, p. ej., a 60°C, para permitir que el par de cebadores 20A, 20B se reasocie con las cadenas diana libres 12A, 12B y la cadena de referencia libre 10B en la mezcla de reacción. El número de referencia 20A se refiere al cebador directo y el número de referencia 20B se refiere al cebador inverso. Tal como se describió previamente, la secuencia diana 12 es amplificable a través del mismo par de cebadores 20A, 20B que los utilizados para la secuencia de referencia 10. La etapa 5 de la Fig. 2 ilustra dos cadenas libres 12A, 12B de la secuencia diana  
20 en comparación con la etapa de desnaturalización inicial y sólo una cadena de referencia libre 10B. La otra cadena de referencia 10A se hibrida con la secuencia de bloqueo de referencia 14 y, por lo tanto, no está disponible para la amplificación. La temperatura de la mezcla de reacción se eleva luego, p. ej., a 72°C, para extender los cebadores reasociados 20A, 20B, enriqueciendo así la concentración de la secuencia diana 12 en la mezcla de reacción con respecto a la secuencia de referencia 10. Es probable que el método se repita cinco a treinta ciclos.

25 El método ilustrado en la Fig. 2 puede y debería ser optimizado para protocolos individuales. Dichos protocolos pueden incorporarse en el software, si se desea, para hacer funcionar diversos equipos de PCR y de PCR en tiempo real.

#### Consideraciones de Diseño para la Secuencia de Bloqueo de Referencia Preferida

30 Tal como se mencionó, la secuencia de bloqueo de referencia puede adoptar muchas formas, aunque la forma preferida es ADN de cadena sencilla no extensible. Más específicamente, la secuencia de bloqueo de referencia preferida tiene las siguientes características:

(a) comprende ADN de cadena sencilla de hasta 200 pb de longitud;

35 (b) tiene una longitud que es varias bases más pequeña que la secuencia diana (p. ej., 8-12 bases en cada uno de los lados de la secuencia), de modo que los cebadores no se unen de manera apreciable a la secuencia de referencia cuando se reasocian a la secuencia de bloqueo de referencia; y tampoco se unen de manera apreciable a la secuencia de bloqueo de referencia propiamente dicha; y

(c) contiene un extremo 3' que está bloqueado para la extensión de ADN-polimerasa.

40 Una secuencia de bloqueo de referencia de este tipo se puede sintetizar en uno de los diversos métodos. En primer lugar, la secuencia de bloqueo de referencia puede prepararse por síntesis directa utilizando métodos de síntesis de oligonucleótidos convencionales que permiten la modificación del extremo 3' de la secuencia. El extremo 3' puede contener un grupo fosfato, un grupo amino, un di-desoxi-nucleótido o cualquier otro resto que bloquee la extensión de la polimerasa 5' a 3'. Alternativamente, la secuencia de bloqueo de referencia puede prepararse mediante  
45 síntesis de polimerasa durante una reacción de PCR que genera ADN de cadena sencilla como el producto final. En este caso, el ADN de cadena sencilla generado corresponde a la secuencia exacta necesaria para la secuencia de bloqueo de referencia. Los métodos para sintetizar ADN de cadena sencilla a través de la síntesis de polimerasa son varios y bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, sería adecuada PCR asimétrica o PCR LATE. Alternativamente, se puede sintetizar una secuencia de bloqueo de referencia de ADN de cadena sencilla uniendo un producto de PCR de doble cadena sobre un soporte sólido. Esto se logra realizando una reacción de PCR  
50 estándar, utilizando un par de cebadores, uno de los cuales está biotinilado. Después de la PCR, el producto de la PCR se incuba con un soporte sólido recubierto con estreptavidina (p. ej., perlas magnéticas) y se deja que se una a las perlas. Posteriormente, la temperatura se eleva a 95°C durante 2-3 minutos para desnaturalizar el ADN y liberar a la solución la cadena de ADN no biotinilada del producto de la PCR inmovilizado. Las perlas magnéticas con la

cadena de ADN complementario se separan luego y el producto de cadena sencilla que queda en la solución sirve como secuencia de bloqueo de referencia.

5 Antes de utilizar la secuencia de bloqueo de referencia de cadena sencilla, el extremo 3' se bloquea preferiblemente para la extensión de la polimerasa. Esto se puede lograr de varias maneras bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede emplear una reacción con Desoxinucleótido Transferasa Terminal (TdT), en presencia de di-desoxi-nucleótidos (ddNTP) en la solución, para añadir un solo ddNTP al extremo de la secuencia de bloqueo de referencia de cadena sencilla. Los ddNTPs sirven para bloquear la extensión de la polimerasa. Alternativamente, se puede utilizar un molde de oligonucleótidos complementario al extremo 3' de la secuencia de bloqueo de referencia para proporcionar una estructura transitoria de doble cadena. Después, la polimerasa puede  
10 utilizarse para insertar un solo ddNTP en el extremo 3' de la secuencia de bloqueo de referencia opuesto al oligonucleótido hibridado.

15 En otro método para sintetizar la secuencia de bloqueo de referencia en una forma de doble cadena, se lleva a cabo una PCR convencional para amplificar una versión de tipo salvaje de la secuencia de interés, utilizando cebadores que contienen sitios de restricción enzimática raros. Después de la amplificación por PCR, las enzimas de restricción se emplean para digerir ambos extremos del producto de la PCR y crear colgantes. Estos colgantes se someten luego a la extensión de la polimerasa en presencia de di-desoxi-nucleótidos, bloqueando así el extremo 3' en ambos lados de una extensión adicional. El producto de la PCR bloqueado en el extremo 3' de doble cadena puede servir entonces como una secuencia de bloqueo de referencia de doble cadena.

Ejemplos específicos de Secuencias de Bloqueo de Referencia generadas por síntesis de oligonucleótidos

20 Se sintetizaron dos secuencias de bloqueo de referencia: una secuencia de bloqueo de referencia de 60 pb (RBS60) y una de 90 pb (RBS90) correspondiente a secciones del exón 8 de p53. La Tabla 1 contiene las secuencias enumeradas para las secuencias de bloqueo de referencia RBS60 y RBS90 sintetizadas. Tanto la secuencia RBS60 como la secuencia RBS90 se sintetizaron con un grupo fosfato 3'-bloqueante por Integrated DNA Technologies, Inc. Se utilizaron líneas celulares con mutaciones en el mismo fragmento de exón 8 para testar el método (véase, listado  
25 en la Tabla 1).

30 La Fig. 3 es un dibujo esquemático que ilustra el uso de la secuencia de bloqueo de referencia RBS60 en relación con el enriquecimiento de PCR por COLD completa modificado. Un amplicón de 87 pb se amplifica preliminarmente utilizando los cebadores subrayados. La secuencia de bloqueo de referencia complementaria (RBS60) está diseñada para la cadena de referencia en la Fig. 3. Como es evidente de la Fig. 3, RBS60 evita que los cebadores se unan, y contiene un grupo 3' fosfato para evitar la extensión.

Protocolo para RBS60: Una secuencia de 167 pb del exón 8 de p53 se amplificó inicialmente utilizando PCR convencional y los cebadores Ex8-167F y Ex8-167R (Tabla 1). El ADN genómico utilizado era ADN de tipo salvaje o una mezcla de 3% de ADN mutante en ADN de tipo salvaje. Las líneas celulares mutantes utilizadas, que contienen mutaciones específicas, se enumeran en la Tabla 1.

35 El producto de la PCR se diluyó luego 500 veces. Después, se implementó la reacción de PCR por COLD completa modificada en presencia de la secuencia de bloqueo de referencia RBS60 25 nM, y los cebadores 87f y 87r de 200 nM que amplifican una región anidada dentro del fragmento de 167 pb. Se utilizó Phusion™ polimerasa (New England Biolabs) para la amplificación. El programa de PCR por COLD completa era: 5 ciclos de PCR convencional (30 s a 95°C; 30 s a 60°C; 1 min a 72°C;); luego 25 ciclos de PCR por COLD completa (30 s a 95°C; 30 s a 70°C; luego 3 s a  $T_c = 84,5^\circ\text{C}$ , luego 30 s a 60°C; 1 min a 72°C) X 25. Alternativamente, se realizó una PCR por COLD completa (en ausencia de RBS60) empleando exactamente el mismo programa que para la PCR por COLD completa en presencia de RBS60, pero omitiendo la RBS60 de la mezcla de reacción. Después de la PCR por COLD completa en presencia de RBS60 (y la PCR por COLD completa (sin RBS60) y la PCR por COLD rápida y la PCR regular) los productos se secuenciaron utilizando el cebador más largo 30T-p53-87F.

45 Protocolo para RBSS90: Se aplicó el mismo procedimiento para RBS90 como se detalla para RBS60; pero con la diferencia de que los cebadores establecidos para la PCR por COLD completa anidada eran p53-ex8-115F y p53-ex8-115R y la  $T_c$  empleada para RBS90 era  $T_c = 84,4^\circ\text{C}$ .

TABLA 1

Oligo	Secuencia (5' a 3')	Fuente
<b>Secuencia de bloqueo de referencia 1 (RBS60)</b>		
Ex8-167F	GCTTCTCTTTTCCTATCCTG (SEQ ID NO: 1)	Li et al. (2008)
Ex8-167R	CTTACCTCGCTTAGTGCT (SEQ ID NO: 2)	Li et al. (2008)
87d	TGGTAATCTACTGGGACG (SEQ ID NO: 3)	Li et al. (2008)
87i	CGGAGATTCTTCTCTCT (SEQ ID NO: 4)	Li et al. (2008)
30T-p53-87F	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTAATCTACTGGGACG (SEQ ID NO: 5)	
60refseq-dir	GGACGGAACAGCTTT (SEQ ID NO: 6)	
60refseq-inv	CTGGCCGCGTGTCTC (SEQ ID NO: 7)	
<b>RBS60</b>	5'CTCTGTGCGCCGGTCTCTCCCAGGACAGGCACAAACA CGCACCTCAAAGCTGTTCCGTCC-phos-3' (SEQ ID NO: 8)	
<b>Secuencia de Bloqueo de Referencia 2 (RBS90)</b>		
Ex8-167F	GCTTCTCTTTTCCTATCCTG (SEQ ID NO: 9)	Li et al. (2008)
Ex8-167R	CTTACCTCGCTTAGTGCT (SEQ ID NO: 10)	Li et al. (2008)
p53-ex8-115F	TTGCTTCTCTTTTCCTAT (SEQ ID NO: 11)	
p53-ex8-115R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT GCTTCTCTTTTCCTATCC (SEQ ID NO: 12)	
<b>RBS90</b>	5'CTTCTCTGTGCGCCGGTCTCTCCCAGGACAGGCACA AACACGCACCTCAAAGCTGTTCCGTCCCAGTAGATTAC CACTACTCAGGATAG-phos-3' (SEQ ID NO: 13)	

**Resultados:** Resultados representativos se representan en las Figs. 4 a 7 para la RBS60 y la Fig. 8 para RBS90. En las Figs. 4 a 7 se compara la PCR por COLD completa, modificada (en presencia de RBS60) con la PCR por COLD completa (sin RBS60), la PCR por COLD rápida y la PCR convencional.

- 5
- La Fig. 4 ilustra que el enriquecimiento a través de PCR por COLD completa modificada (RBS 25nM) es robusta (un incremento de 3% a 37%) para una circunstancia en la que la mutación aumenta la temperatura de fusión. La mutación no es detectable cuando se utiliza la PCR por COLD rápida y la PCR convencional en la Fig. 4. De manera similar, la Fig. 5 ilustra que el enriquecimiento a través de la PCR por COLD completa modificada (RBS 25 nM) es robusta (un incremento de 3% a 47%) para una circunstancia en la cual la mutación no afecta a la temperatura de fusión. Nuevamente, la mutación no es detectable cuando se utiliza la PCR por COLD rápida y la PCR convencional en la Fig. 5. La Fig. 6 también ilustra que el enriquecimiento a través de PCR por COLD completa modificada (RBS 25 nM) es robusta (un incremento de 3% a 45%) para una circunstancia en la que la mutación reduce la temperatura de fusión. En la Fig. 6 el enriquecimiento a través de PCR por COLD rápida también es robusta (es decir, debido a la temperatura de fusión reducida). De nuevo, en la Fig. 6 la mutación no es detectable cuando se utiliza PCR convencional. La Fig. 7 ilustra los resultados para una delección por reducción de la temperatura. El enriquecimiento a través de la PCR por COLD completa modificada (RBS 25nM) es robusta (un incremento de 3% a 45%), así como el enriquecimiento a través de la PCR por COLD rápida. De nuevo, la mutación no es detectable cuando se utiliza PCR convencional.
- 10
- 15
- 20
- 25
- La Fig. 8 muestra datos de secuenciación de Sanger para el enriquecimiento de alelos mutantes HCC1008 de muestras procesadas utilizando RBS90, e ilustra que el enriquecimiento con PCR por COLD completa modificada en presencia de la secuencia de bloqueo de referencia de 90 pb es robusta (un incremento de 3% a 38%). Comparando los resultados en la Fig. 5, que muestra datos de secuenciación de Sanger para el enriquecimiento de alelos mutantes HCC1008 de muestras procesadas utilizando RBS60, a los resultados en la Fig. 8 confirma que el método de la presente invención es robusto con secuencias de bloqueo de referencia de diferentes longitudes. En todos los casos y para todas las mutaciones estudiadas hasta el momento, la PCR por COLD completa modificada (en presencia de RBS) parece tener el mejor comportamiento, ya que enriquece todos los tipos de mutaciones (la  $T_m$

## ES 2 665 500 T3

aumenta, retiene o disminuye las mutaciones), en un tiempo de reacción corto, y con mejor enriquecimiento que la PCR por COLD completa (sin RBS).

# ES 2 665 500 T3

## LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Dana-Farber Cancer Institute, Inc. Makrigiorgos, Gerassimos	
	<120> Enriquecimiento de una PCR por COLD completa con secuencia de bloqueo de referencia	
5	<130> 5472-00027	
	<160> 13	
	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótidos para la amplificación de la cadena de la polimerasa del gen p53 humano	
15	<400>	1
	<b>gcttctctttt tctatcctg</b>	<b>20</b>
	<210> 2	
20	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótidos para la amplificación de la cadena de la polimerasa del gen p53 humano	
25	<400> 2	
	<b>cttacctcgc ttagtgct</b>	<b>18</b>
	<210> 3	
30	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótidos para la amplificación de la cadena de la polimerasa del gen p53 humano	
35	<400>	3
	<b>tggtaatcta ctgggacg</b>	<b>18</b>
	<210> 4	
40	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótidos para la amplificación de la cadena de la polimerasa del gen p53 humano	
	<400> 4	

ES 2 665 500 T3

	<b>cggagattct cttcctct</b>	<b>18</b>
5	<210> 5 <211> 48 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de oligonucleótidos para la amplificación de la cadena de la polimerasa del gen p53 humano	
	<400> 5	
10	<b>tttttttttt tttttttttt tttttttttt tggtaatcta ctgggacg</b>	<b>48</b>
	<210> 6 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Cebador de oligonucleótidos para la amplificación de la cadena de la polimerasa del gen p53 humano	
	<400>	<b>6</b>
20	<b>ggacggaaca gcttt</b>	<b>15</b>
	<210> 7 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador de oligonucleótidos para la amplificación de la cadena de la polimerasa del gen p53 humano	
	<400> 7	
30	<b>ctggccgcgt gtctc</b>	<b>15</b>
	<210> 8 <211> 60 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido que se hibrida con el gen p53 humano	
	<400> 8	
	<b>ctctgtgctc cggctctctcc caggacaggc acaaacacgc acctcaaagc tgttccgtcc</b>	<b>60</b>
40	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de oligonucleótidos para la amplificación de la cadena de la polimerasa del gen p53 humano	



ES 2 665 500 T3

<400> 9  
 gcttctcttt tcctatcctg 20  
 <210> 10  
 <211> 18  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de oligonucleótidos para la amplificación de la cadena de la polimerasa del gen p53 humano  
 10 <400> 10  
 cttacctcgc ttagtgct 18  
 <210> 11  
 <211> 18  
 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de oligonucleótidos para la amplificación de la cadena de la polimerasa del gen p53 humano  
 20 <400> 11  
 ttgcttctct tttcctat 18  
 <210> 12  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador de oligonucleótidos para la amplificación de la cadena de la polimerasa del gen p53 humano  
 <400> 12  
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttgcttctct tttcctatcc 60  
 30 <210> 13  
 <211> 90  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido que se hibrida con el gen p53 humano  
 <400> 13  
 cttcctctgt ggcgccgtct ctcccaggac aggcacaaaac acgcacctca aagctgttcc 60  
 gtcccagtag attaccacta ctcaggatag 90

40

## REIVINDICACIONES

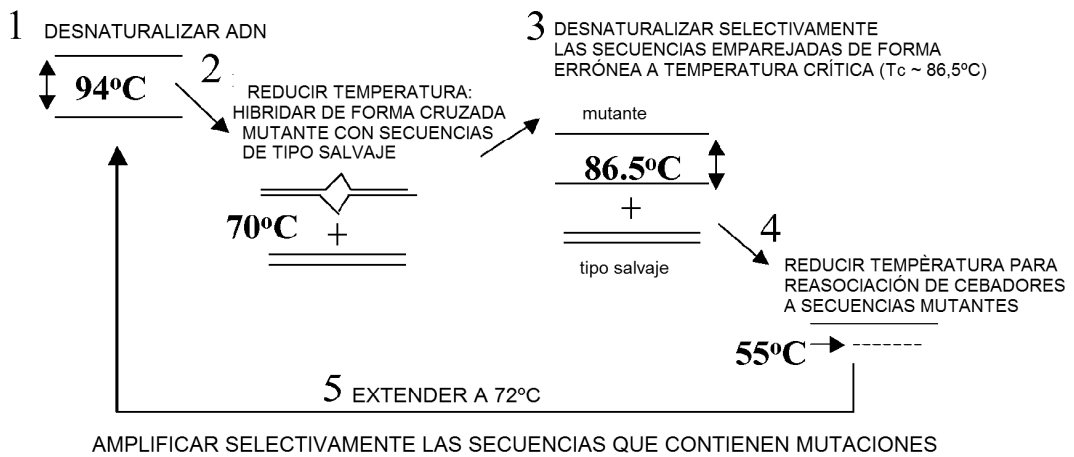
1. Un método para enriquecer una secuencia de ácido nucleico diana en una mezcla de reacción de amplificación, comprendiendo dicho método:
- 5 a. proporcionar un par de cebadores capaz de reasociarse a una secuencia de referencia y también a una o más secuencias diana que son al menos 50% homólogas a dicha secuencia de referencia;
  - b. preparar una mezcla de reacción de amplificación que incluye al menos los siguientes constituyentes:
    - 10 una muestra de ácido nucleico que tiene la secuencia de referencia y de la que se sospecha que tiene la una o más secuencias diana que son al menos 50% homólogas a dicha secuencia de referencia y que también son amplificables por el par de cebadores, y
    - una cantidad en exceso de la secuencia de bloqueo de referencia con relación a la cantidad de secuencias de referencia, siendo la secuencia de bloqueo de referencia totalmente complementaria con al menos una parte de la secuencia de una de las cadenas de la secuencia de referencia entre sus sitios de cebador;
  - 15 c. aumentar la temperatura de la mezcla de reacción de la que se sospecha que tiene dicha secuencia diana hasta una primera temperatura de desnaturalización que está por encima de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de la secuencia de referencia y por encima de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de la secuencia diana, con el fin de formar las cadenas de referencia desnaturalizadas y las cadenas diana desnaturalizadas;
  - d. reducir la temperatura de la mezcla de reacción con el fin de permitir la formación de dúplex de la secuencia de bloqueo de referencia y la cadena de referencia complementaria y heterodúplex de la secuencia de bloqueo de referencia y las cadenas dianas;
  - 20 e. aumentar la temperatura de dicha mezcla de reacción hasta una temperatura crítica ( $T_c$ ) suficiente para permitir la desnaturalización preferente de dichos heterodúplex de la secuencia de bloqueo de referencia y cadenas dianas en preferencia a la desnaturalización de los dúplex de la secuencia de bloqueo de referencia y las cadenas de referencia;
  - f. reducir la temperatura de la mezcla de reacción con el fin de permitir que dicho par de cebadores se reasocie a las cadenas dianas de cadena sencilla y a cualquier cadena de referencia de cadena sencilla en la mezcla de reacción; y
  - 25 g. extender dicho par de cebadores con el fin de enriquecer dicha secuencia diana con relación a dicha secuencia de referencia;
  - h. repetir las etapas c hasta g durante dos o más ciclos con el fin de enriquecer dicha secuencia diana con relación a dicha secuencia de referencia.
- 30
2. El método de la reivindicación 1, en el que se bloquea un extremo 3' en la secuencia de bloqueo de referencia para inhibir la extensión, o un extremo 5' en la secuencia de bloqueo de referencia comprende un nucleótido que previene la exonucleólisis 5' a 3' por parte de Taq ADN polimerasas.
3. El método de la reivindicación 1, en el que
- 35 (i) la secuencia de bloqueo de referencia se proporciona en la etapa (b) como una secuencia de bloqueo de referencia de ácido nucleico de cadena sencilla, o
  - (ii) la secuencia de bloqueo de referencia se proporciona en la etapa (b) como una secuencia de bloqueo de referencia de ácido nucleico de doble cadena que se desnaturaliza para formar secuencias de bloqueo de referencia en la etapa b) cuando la mezcla de reacción se somete a la primera temperatura de desnaturalización, o
  - 40 (iii) la secuencia de bloqueo de referencia es un ADN de cadena sencilla, ARN, ácido nucleico peptídico o ácido nucleico bloqueado.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la secuencia de bloqueo de referencia es una quimera entre ADN de cadena sencilla, ARN, ácido nucleico peptídico o ácido nucleico bloqueado u otro nucleótido modificado, en donde opcionalmente las posiciones del ácido nucleico peptídico o el ácido nucleico bloqueado en la secuencia de la quimera se seleccionan para que coincidan con las posiciones en las que se sospecha que estén presentes mutaciones, maximizando con ello la diferencia entre la temperatura necesaria para desnaturalizar heterodúplex de la secuencia de bloqueo de referencia y las cadenas dianas y la temperatura necesaria para desnaturalizar dúplex de la secuencia de bloqueo de referencia y la cadena de referencia complementaria.
- 45
5. El método de la reivindicación 1, en el que la secuencia de bloqueo de referencia es totalmente complementaria con una de las cadenas de la secuencia de referencia entre sus sitios de unión con el cebador o se solapa en cualquier extremo de los sitios de unión con el cebador, o en donde la secuencia de bloqueo de referencia es igual a o más corta que la secuencia de referencia.
- 50
6. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de enfriamiento d) es de menos de un minuto.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la secuencia de bloqueo de referencia está presente en la mezcla de reacción en una cantidad sustancialmente igual a 25 nM.
- 55

8. El método de la reivindicación 1, en el que la temperatura de fusión de la secuencia diana de doble cadena es mayor que o igual a la temperatura de fusión de la secuencia de referencia de doble cadena, y la primera temperatura de desnaturalización está por encima de la temperatura de fusión de la secuencia diana de doble cadena.
- 5 9. El método de la reivindicación 1, en el que dichas secuencias de referencia y diana se amplifican primero sometiendo la muestra de ácido nucleico a PCR y sometiendo luego al menos una parte de la muestra de ácido nucleico amplificada al método de enriquecimiento de la reivindicación 1, en donde dicho método se realiza opcionalmente en un dispositivo de PCR en tiempo real.
- 10 10. El método de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia diana comprende una mutación homocigota, o en el que dicha secuencia diana se metila diferentemente de la secuencia de referencia, y antes de implementar el método de la reivindicación 1 en la mezcla de reacción la muestra de ácido nucleico se trata con bisulfito de sodio.
11. El método de la reivindicación 1, en el que dichas secuencias de referencia y diana comprenden al menos 25 pares de bases.
- 15 12. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método se repite durante dos o más ciclos, o en el que dicha Tc se aplica durante 1 segundo-60 segundos.
- 20 13. El método de la reivindicación 1, que comprende, además, la etapa de analizar dicha mezcla de reacción con una secuencia diana enriquecida, utilizando uno o más de los métodos seleccionados del grupo que consiste en MALDI-TOF, fusión HR, secuenciación di-desoxi, secuenciación de una sola molécula, pirosecuenciación, secuenciación de alto rendimiento de segunda generación, SSCP, RFLP, dHPLC, CCM, PCR digital y PCR cuantitativa.
14. El método de la reivindicación 1, en el que dicha mezcla de reacción contiene un colorante de detección de ácidos nucleicos o que se realiza en condiciones en tiempo real utilizando una sonda marcada.
15. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa g) de extensión del cebador comprende aumentar la temperatura de la mezcla de reacción con el fin de fomentar la extensión de los cebadores reasociados.

FIGURA 1

TÉCNICA ANTERIOR

**A PRINCIPIO DE PCR POR COLD COMPLETA**  
(Co-amplificación a Baja temperatura de Desnaturalización)



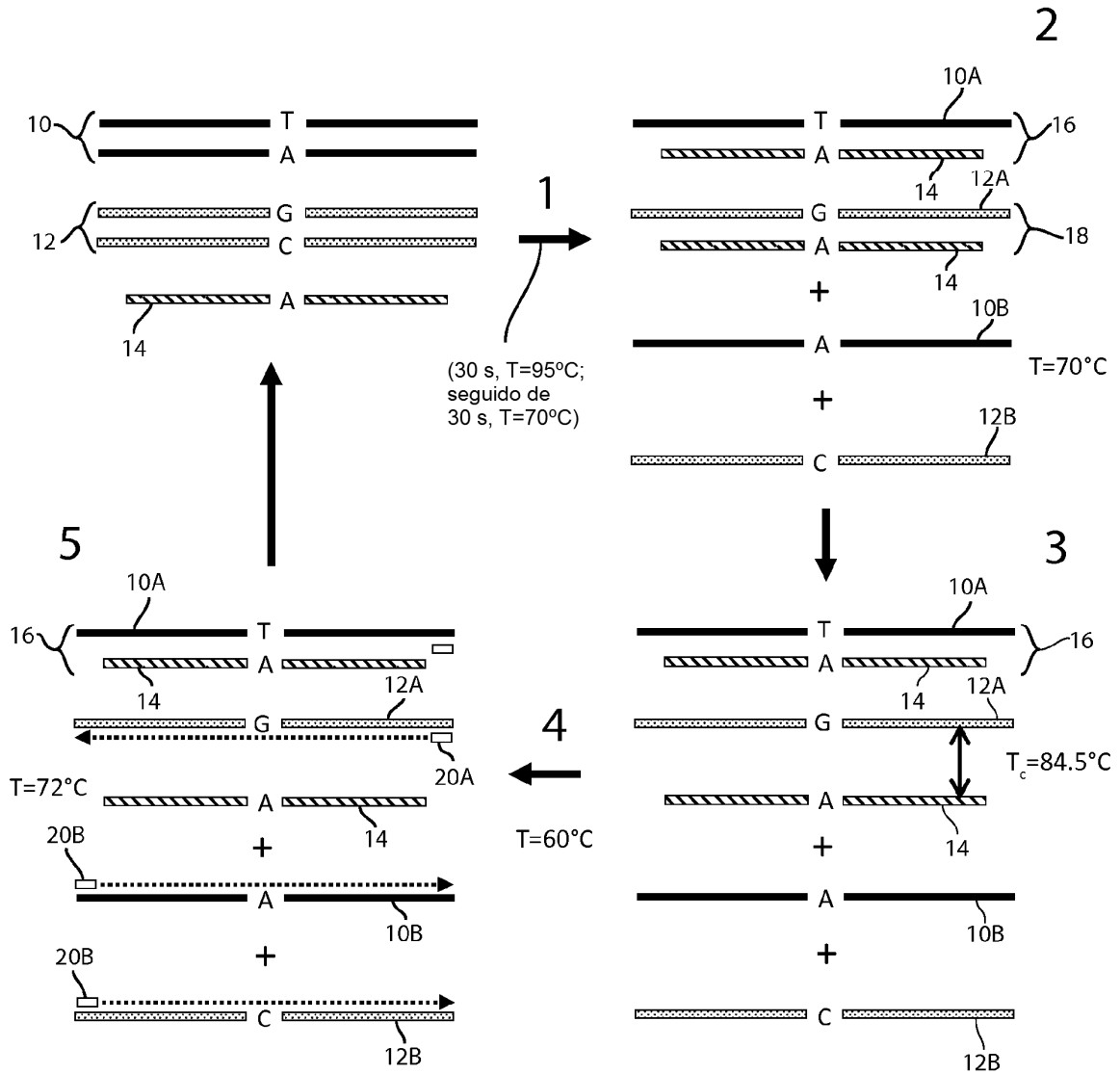
**B PCR POR COLD**

(PCR por COLD mediada por enlazador simple, múltiple o común)

- |                           |                           |                         |                                                    |                                                          |
|---------------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| MALDI-TOF<br>(Objetivo 1) | Fusión HR<br>(Objetivo 2) | Secuenciación di-desoxi | Secuenciación de molécula sencilla<br>(Objetivo 3) | Pirosecuenciación, SSCP, dHPLC, CCM, RFLP, QRT-PCR, etc. |
|---------------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|

**Figura 1. A.** Ilustración del protocolo de enriquecimiento. Se representa un ejemplo para una secuencia del exón 8 de p53 de 167 pb. La formación de emparejamientos erróneos en cualquier lugar a lo largo de la secuencia durante la PCR permite una desnaturalización y amplificación preferente de alelos secundarios (mutantes) en todo ciclo de la PCR. **B.** Reemplazo de PCR con el método de enriquecimiento: Todos los ensayos de testado genético basado en PCR están para beneficiarse por enriquecimiento por mutación durante la etapa de PCR que les precede.

FIGURA 2



**FIGURA 3**  
**amplicón de 87 pb, RBS60**

5' - IGGTAATCTACTGGGACGGAAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTTGTGCCCTGTCCCTGGGAGAGACCCGGCCACAGAGGAAGAGAATCTCCGC-3'  
3' - PO<sub>4</sub> - 5' RBS60

3' - ACCATTAGATGACCCTGCCTTGTGAAACTCCACGCACAAAACACGGACAGGACCCTCTCTGGCCGGTGTCTCCCTCTTAGAGGGCG- 5'

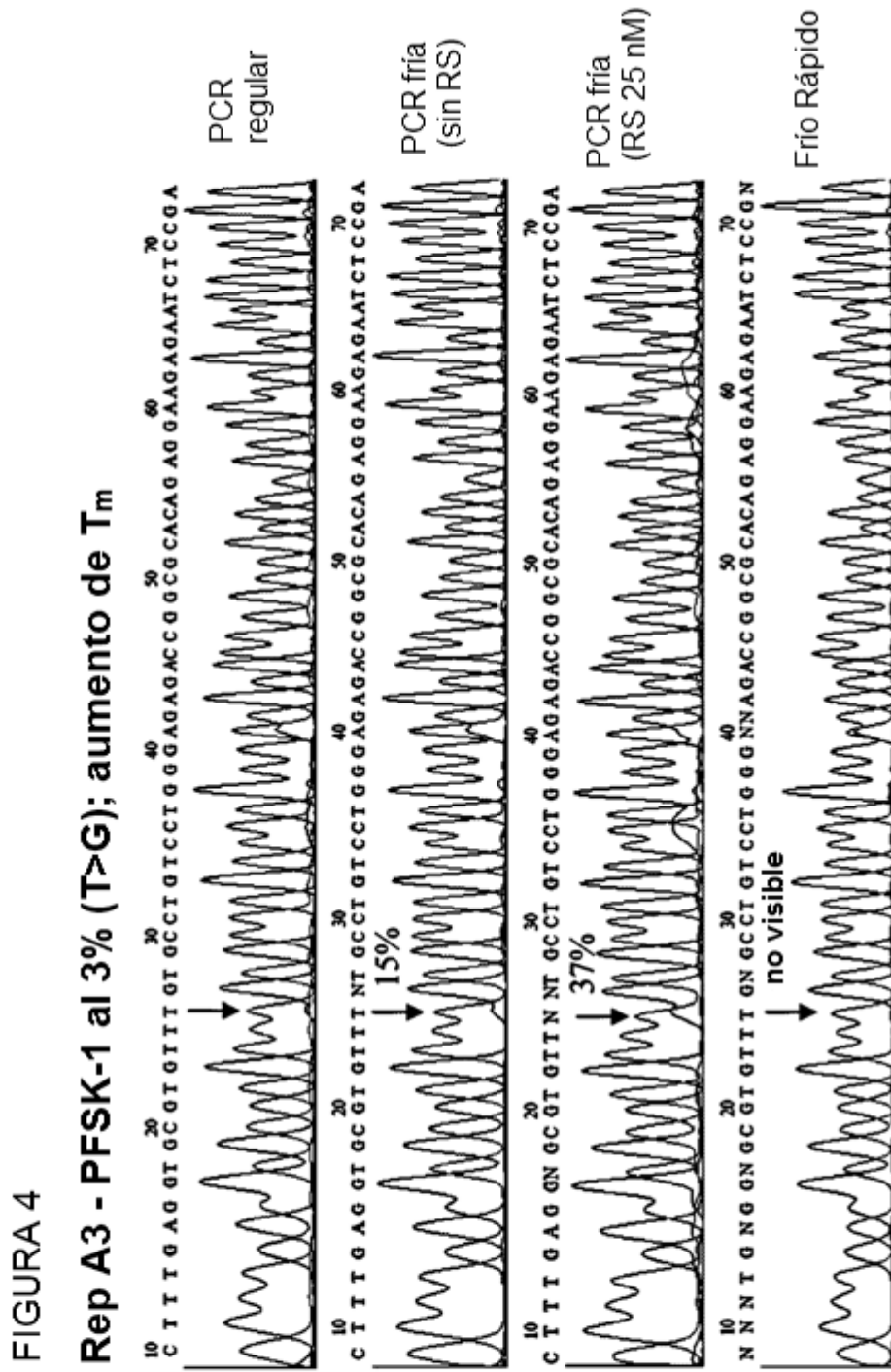


FIGURA 5

**Rep B2 - HCC1008 al 3% (G>C); T<sub>m</sub>-equivalente**

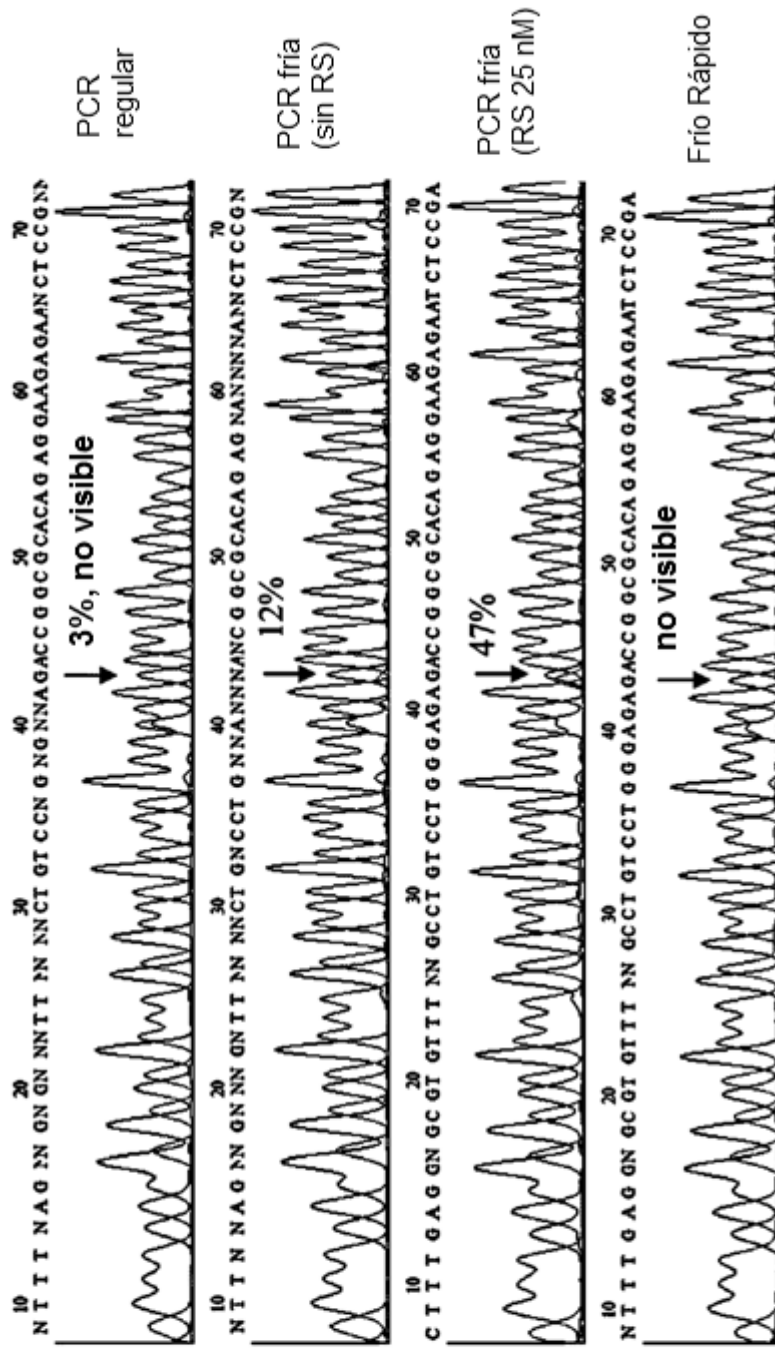




FIGURA 6

**Rep C3 - HCC2218 al 3% (C>T); reducción de T<sub>m</sub>**

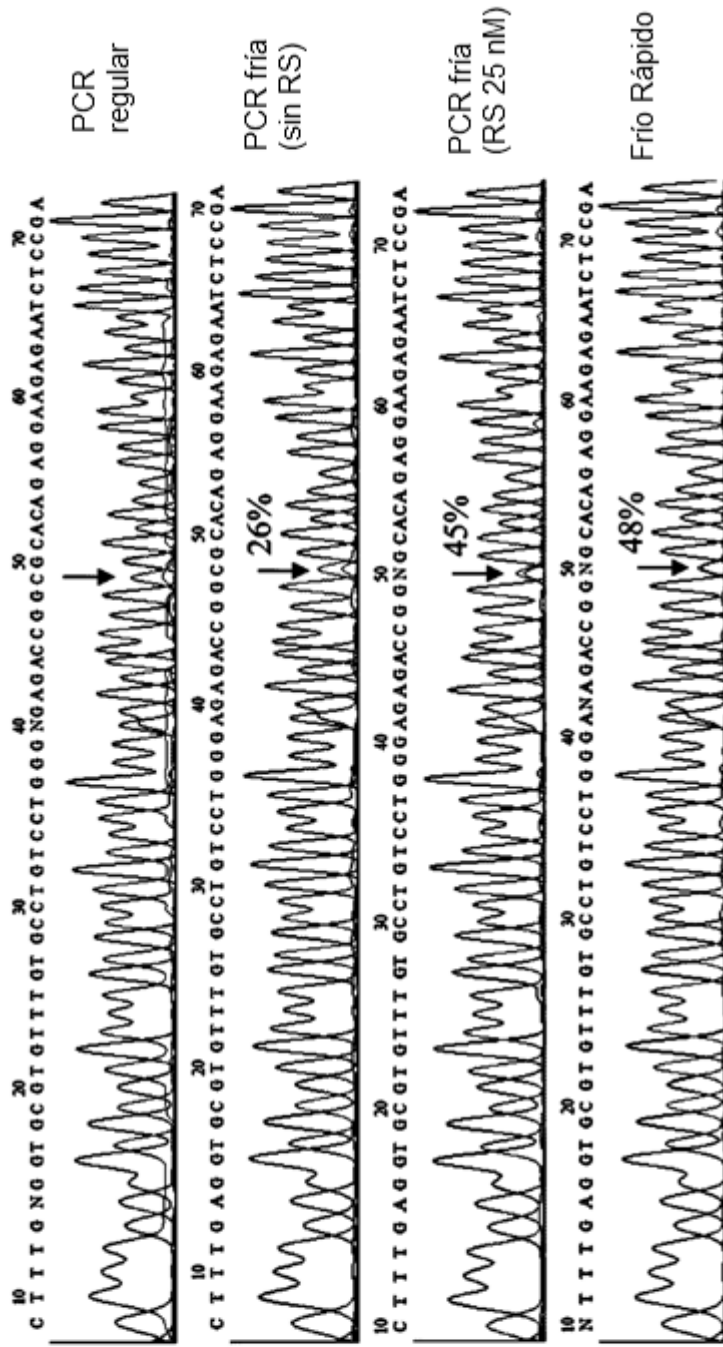
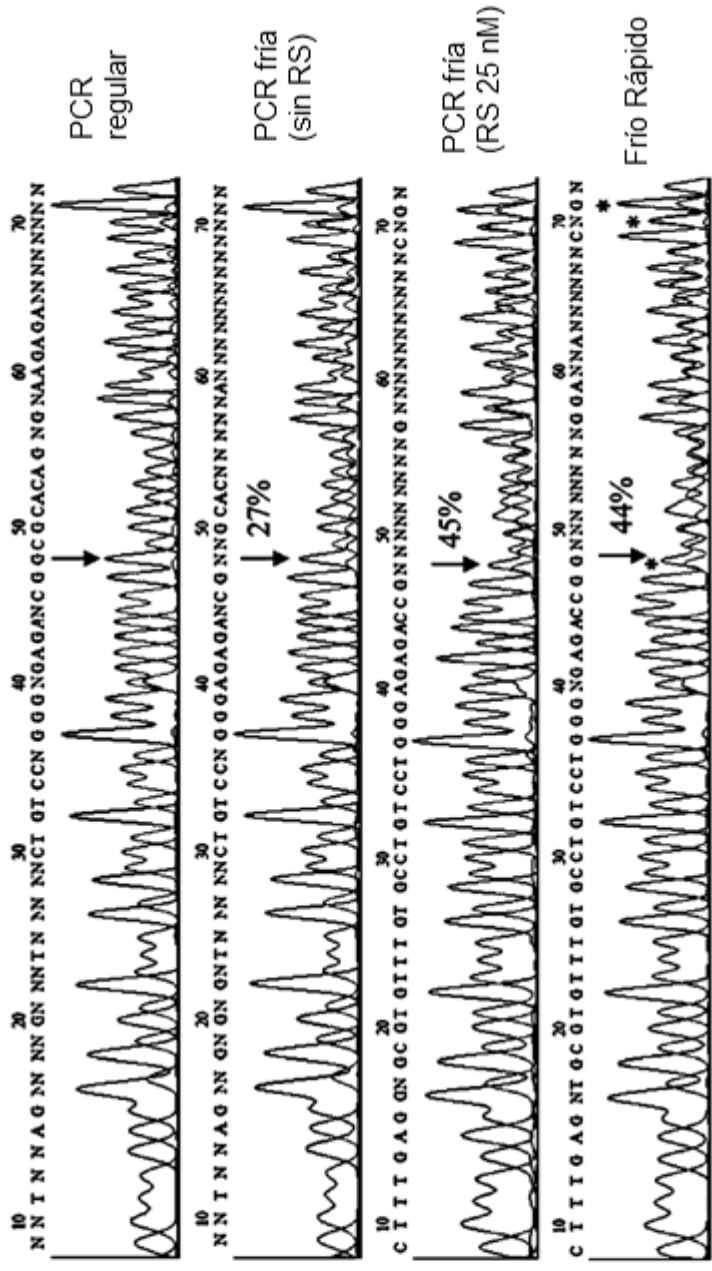


FIGURA 7  
**Rep D1 - TL92 al 3% (1 pb G del); reducción de T<sub>m</sub>**



Las estimaciones de enriquecimiento para la delección son una media de las alturas de los picos para tres posiciones de bases diferentes, indicadas con un \*.

FIGURA 8

validación de RS90; HCC 1008 al 3% (mutación G>C)

