

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 525**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2012 PCT/US2012/055620**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13040491**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012 E 12831521 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2756101**

54 Título: **Composiciones de sonda:antisonda para detección de ADN o ARN de alta especificidad**

30 Prioridad:

15.09.2011 US 201161534925 P

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

03.10.2018

73 Titular/es:

**SHAHER, DAVID A. (100.0%)
245 Danbury Lane
Atlanta, GA 30327, US**

72 Inventor/es:

SHAHER, DAVID A.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 684 525 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

Composiciones de sonda: antisonda para detección de ADN o ARN de alta especificidad

Campo de la divulgación

5 Esta divulgación se refiere al campo de la tecnología de sondas de ácidos nucleicos, y más específicamente a composiciones y métodos para identificar y cuantificar secuencias de ADN o ARN. En particular, se refiere a la marcación y detección de dianas génicas durante o después de la amplificación.

Antecedentes

10 La detección de secuencias de polinucleótidos diana se basa usualmente en métodos que hibridan sondas de ADN marcadas con una secuencia diana de interés. Para que funcione efectivamente, los productos de hibridación sonda-diana deben lavarse después de la hibridación para eliminar las sondas no unidas y sondas que están débilmente unidas a dianas no específicas. Sin embargo, bajo las condiciones de la PCR en tiempo real (Patente de los Estados Unidos 4.965.188, Patente de los Estados Unidos 5.210.015, Patente de los Estados Unidos 5.487.972, Patente de los Estados Unidos 5.538.848), no es factible una etapa de lavado, y por lo tanto, nuevas sondas que generen selectivamente señalización cuando están unidas a una diana coincidente y que han disminuido o detenido la señalización cuando no están unidas y flotan libremente en la solución. Para lograr este fin, se ha dependido de las sondas que emplean la excitación y la transferencia de energía fluorescente entre un donante y una molécula aceptora, tal como entre dos fluoróforos, o entre un fluoróforo y un detenedor ([Didenko V, (2001) *Biotechniques* 31:1106-1116, 1118, 1120-1121; Chen et al., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 30: 94: 10756-10762; Shafer, D., Publicación U.S. No. 2009/0209434; Abacus Diagnostica Oy, Publicación Internacional WO 2010/130877; Li et al., (2002) *Nucleic Acids Research*, 30(2):E5). El espectro de emisión de fluorescencia del donante debe solaparse con el espectro de absorción o excitación del aceptor. La energía del estado excitado de la molécula donadora fluorescente se transfiere luego a la molécula aceptora cuando están en proximidad cercana cerca (10 a 100 angstroms). Sin embargo, si la molécula aceptora es en sí misma fluorescente, proporciona una señal emitida a una longitud de onda más larga. Si la molécula aceptora es un detenedor efectivo, la señalización fluorescente disminuye significativamente y puede apagarse esencialmente.

15 TAQMAN.RTM y las sondas de baliza molecular son sondas comunes de este tipo para la detección de PCR en tiempo real. En ambos casos, sirven como una sonda interna que se utiliza junto con un par de cebadores opuestos que flanquean la región objetivo de interés. Los cebadores amplifican el segmento diana y la sonda se une selectivamente a una secuencia de identificación entre los sitios del cebador, causando de este modo aumentos en la señalización fluorescente en relación con los aumentos en la frecuencia objetivo. Si bien estos sistemas de sonda son similares en efecto, emplean diferentes mecanismos de detección.

20 Una sonda TAQMAN.RTM comprende un oligonucleótido sintético de aproximadamente 20 a 30 bases que complementa una secuencia diana, y que está marcado en los extremos opuestos con un donador fluorescente y un aceptor (Patente de los Estados Unidos 5.538.848). Típicamente, el extremo 5' tendrá un fluoróforo de longitud de onda más corta tal como fluoresceína y el extremo 3' se marcará con un fluoróforo que emite una longitud de onda más larga (por ejemplo, TAMRA.RTM) o un detenedor no fluorescente tal como BLACK HOLE QUENCHER.RTM. Los detenedores internos también se han utilizado. Si bien la patente de TAQMAN: RTM ha expirado, esta tecnología sigue siendo el sistema de sonda dominante para la PCR en tiempo real.

25 Las sondas de balizas moleculares también usan interacciones fluorescentes para detectar y cuantificar un producto de PCR, teniendo cada sonda típicamente un extremo marcado con fluorescencia 5' y un extremo marcado con detenedor 3' (Patente de los Estados Unidos 5,925,517; Tyagi et al., (1996) *Nat Biotechnology* 14: 303 - 308). Sin embargo, las sondas de balizas moleculares incluyen además segmentos de extremo corto de aproximadamente 5 a 7 bases que son complementarios y se unirán en solución, formando una estructura de tallo-bucle en donde el detenedor y los extremos marcados con fluoróforo se juntan y se suprime la señalización.

30 Las sondas SCORPION.RTM también proporcionan un mecanismo de detección de tallo-bucle similar a las balizas moleculares, excepto que la sonda también tiene un segmento unido que sirve como cebador de amplificación (Whitcombe et al., (1999) *Nat. Biotechnol.* 17: 804-807, Patente de Estados Unidos 6.326.145). Estas sondas mantienen una configuración de bucle de tallo en el estado no hibridado con el fluoróforo apagado. Cuando ocurre la desnaturalización seguida por hibridación, el segmento de la sonda se une a la plantilla, abriendo así la estructura de tallo-bucle y liberando la fluorescencia.

35 Similar a SCORPION.RTM, SUNRISE.RTM. las sondas comprenden un cebador unido a una sonda de horquilla que se extiende durante la amplificación. Esto separa el marcador de detenedor interno del fluoróforo de terminal 5' (Nazarenko et al., (1997) *Nucl. Acids Res.* 25: 2516-2521).

40 Las sondas convencionales de doble marcado requieren un diseño selectivo y son costosas. Su síntesis es difícil y requieren la adición manual después de la síntesis de al menos un marcador, así como la purificación por cromatografía líquida a alta presión. TAQMAN.RTM y las sondas de baliza molecular también requieren dos cebadores opuestos que flanquean la sonda. Para funcionar efectivamente durante el paso de hibridación, TAQMAN.RTM y las

sondas de baliza molecular deben ser más largas y tener una Tm (temperatura de fusión) 5 a 10 grados más alta que los cebadores, ya que la sonda debe unirse firmemente al objetivo antes de la extensión. Este requisito hace que sea difícil diseñar o desarrollar sondas doblemente marcadas que puedan detectar selectivamente SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) o mutaciones de base única, y en consecuencia, los falsos positivos son un problema común.

5 Las técnicas FISH (hibridación fluorescente in situ) requieren cuatro etapas de procesamiento: 1) la preparación de sondas marcadas, 2) hibridación de sondas a dianas desnaturalizadas fijas, 3) el lavado de sondas no unidas, y 4) excitación y detección fluorescentes (Barch MJ, editor. "The ACT Cytogenetics Laboratory Manual" 2da edición, Nueva York: Raven Press, 1991). Las etapas de lavado cuidadoso son críticas para la detección efectiva ya que la relación señal a ruido depende en gran medida de la rigurosidad del lavado. El lavado excesivo puede reducir en gran medida la señalización.

10 La detección de microarreglos se asemeja a la detección de FISH. Los arreglos se basan típicamente en la impresión de vidrio o sustratos de silicio con sondas de ADNc de oligonucleótidos unidos; aplicar dianas de ADN o ARN marcadas con fluorescencia que deben hibridarse con las sondas; lavar los arreglos rigurosamente; y luego detectar los objetivos unidos, usualmente mediante escaneo láser (Schena et al., (1995) Science 270: 467 - 470; Heller et al., (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 2150 - 21515) . Al igual que las sondas FISH, los pasos de lavado son una vez más complejos y lentos. Sin embargo, la preparación y el marcado de los objetivos son costosos ya que cada muestra objetivo es única, lo que limita su utilidad para los ensayos de rutina basados en microarreglos, especialmente para el diagnóstico clínico.

15 El documento US 2009/209434 divulga composiciones y métodos para detectar dianas de ácidos nucleicos no marcadas usando sondas de polinucleótidos marcados y antisondas parcialmente complementarias.

El documento WO 2010/130877 divulga una sonda de oligonucleótido de doble cadena que tiene una primera sonda con un marcador emisor de señal detectable y una segunda sonda parcialmente complementaria con la primera sonda con un segundo marcador de detención de señal.

20 Li et al. (supra) divulgan dúplex de sondas de ácidos nucleicos homogéneos que consisten en dos oligodesoxirribonucleótidos complementarios de diferentes longitudes marcados con un fluoróforo y un detenedor en proximidad cercana. Como dúplex, las sondas son detenidas, pero emiten fluorescencia al desplazar la sonda más corta por el objetivo coincidente, detectando así el objetivo.

25 Watanabe et al. (BioTechniques 43: 479-484 (2007)) divulgan una sonda competitiva en un diseño de ensayo para genotipificar variaciones genéticas de microsatélites mediante un proceso de amplificación inteligente que suprime la amplificación de fondo exponencial del alelo de tipo silvestre y mejora la especificidad. La sonda competitiva es un cebador con una aminación de 3' y está diseñada para inhibir la falta de fusiónamiento del cebador de discriminación con alelos no específicos en el ensayo

Resumen

35 La presente divulgación abarca sistemas de sonda adecuados para la detección en tiempo real y punto final de secuencias de ADN o ARN con énfasis particular en sondas que pueden discriminar variantes de bases individuales tales como las SNP y mutaciones puntuales. La presente divulgación está especialmente dirigida a proporcionar sondas adecuadas para qPCR (PCR en tiempo real) en las que segmentos de genes pequeños se amplifican exponencialmente y se detectan cuantitativamente. La presente divulgación proporciona una serie de sistemas de sondas que están relacionados estructural y funcionalmente pero que divergen en grados respectivos de especificidad y/o sensibilidad, y que pueden combinarse para proporcionar nuevas capacidades de diagnóstico o cuantitativas.

40 Un aspecto principal de la divulgación es un sistema de sonda:antisonda que comprende dos oligonucleótidos marcados, una sonda y una antisonda, que pueden interactuar entre sí. La secuencia de sonda es complementaria a la secuencia diana deseada, y la secuencia antisonda es complementaria a la sonda, excepto que comprende al menos una base no coincidente en una posición no terminal. La antisonda está diseñada para proporcionar un mecanismo de comprobación de errores para la sonda.

45 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un sistema para detectar selectivamente una secuencia de nucleótidos diana, comprendiendo dicho sistema al menos un sistema de sonda:antisonda que comprende;

(a) un oligonucleótido de sonda que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una primera secuencia de nucleótidos diana, y una primera unidad estructural unida a ella; y

50 (b) un oligonucleótido antisonda que comprende una secuencia de nucleótidos completamente complementaria al oligonucleótido de sonda excepto por al menos una base no coincidente en una posición no terminal, y una segunda unidad estructural de marcador, en donde la segunda unidad estructural de marcador está unida al oligonucleótido antisonda o es una región del oligonucleótido antisonda,

en donde:

- (i) el oligonucleótido de sonda está configurado para mayor afinidad de hibridación para la primera secuencia de nucleótidos diana que para el oligonucleótido antisonda; y el oligonucleótido antisonda está configurado para una mayor afinidad de hibridación para el oligonucleótido de sonda que el oligonucleótido de sonda tiene afinidad de hibridación por una segunda secuencia de nucleótidos diana de interés;
- 5 (ii) en presencia de la primera secuencia de nucleótidos diana, el oligonucleótido de sonda y la primera secuencia de nucleótidos diana forman un dúplex, con lo que la primera y segunda unidades estructurales de marcador no interactúan, proporcionando de ese modo una primera señal detectable;
- (iii) en ausencia de la primera secuencia de nucleótidos diana, el oligonucleótido de sonda y el oligonucleótido antisonda forman un dúplex, permitiendo así que las primera y segunda unidades estructurales de marcador interactúen para proporcionar una señal detectable modulada, en donde la primera y las señales detectables moduladas son distinguibles; y
- 10 (iv) en presencia de la segunda secuencia de nucleótidos diana que difiere de la primera secuencia diana por al menos una no coincidencia de base, el oligonucleótido de sonda y el oligonucleótido antisonda forman preferentemente un dúplex, inhibiendo así el oligonucleótido de sonda para formar un dúplex con la segunda secuencia de nucleótidos diana.
- 15 Preferiblemente, el dúplex del oligonucleótido de sonda y la primera secuencia de nucleótidos diana, y el dúplex del oligonucleótido de sonda y el oligonucleótido antisonda difieren en al menos aproximadamente 2 kcal/mol en ΔG y al menos aproximadamente 4°C en T_m ; y en donde el dúplex del oligonucleótido de sonda y la segunda secuencia de nucleótidos diana, y el dúplex del oligonucleótido de sonda y la primera secuencia de nucleótidos diana difieren en al menos aproximadamente 4 kcal/mol en ΔG y al menos aproximadamente 8°C en T_m .
- 20 Preferiblemente, la secuencia de oligonucleótidos de sonda está configurada con una posición base no coincidente aproximadamente a dos bases de distancia de una no coincidencia esperada entre la segunda secuencia de nucleótidos diana y la secuencia de la sonda; por lo que dichas dos bases no coincidentes generan una región interna no hibridada de dos o tres bases del dúplex oligonucleótido de sonda:segunda secuencia de nucleótidos diana, teniendo de este modo dicho dúplex un ΔG y T_m menor que el ΔG y la T_m del dúplex oligonucleótido de sonda: oligonucleótido antisonda.
- 25 Preferiblemente, una unidad estructural de marcador es un emisor de fluorescencia, y la otra unidad estructural de marcador comprende un modulador de fluorescencia; en donde el modulador de fluorescencia se selecciona del grupo que consiste en: un compuesto detenedor, un compuesto fluorescente, una partícula metálica y un conjugado rico en guanina.
- 30 Preferiblemente, el oligonucleótido de sonda comprende un emisor de fluorescencia y bien sea un modulador de fluorescencia o un segundo emisor fluorescente, y en donde el oligonucleótido antisonda comprende un modulador de fluorescencia y opcionalmente comprende un emisor de fluorescencia o un segundo modulador de fluorescencia.
- 35 Preferiblemente, el oligonucleótido antisonda se combina con un ensayo de sonda Taqman o Molecular Beacon; en donde el oligonucleótido antisonda comprende un modulador de fluorescencia y comprende una secuencia parcialmente complementaria a una sonda Taqman o Molecular Beacon.
- 40 Preferiblemente, el sistema comprende adicionalmente un segundo oligonucleótido de sonda, en donde dichos primero y segundo oligonucleótidos de sonda hibridan selectivamente con diferentes secuencias de nucleótidos diana de una plantilla de ácido nucleico; y en donde los dos oligonucleótidos de sonda tienen cada uno una unidad estructural de marcador unida a los mismos, y en donde las unidades estructurales de marcador proporcionan dos señales detectables diferentes o la misma señal detectable; en donde
- (i) el primer oligonucleótido de sonda comprende una cebador-sonda que está configurada para cooperar con un oligonucleótido cebador para amplificar un primer amplicón con un primer marcador, proporcionando así una señal relativa a la frecuencia de amplicón, y
- 45 (ii) el segundo oligonucleótido de sonda es o bien un segundo cebador-sonda o una sonda interna que comprende un segundo marcador y una secuencia complementaria a una secuencia diana que comprende un segmento de secuencia variable del primer amplicón, o una secuencia variable en cualquier parte de una plantilla de ácido nucleico; después de lo cual la diferencia en la señalización entre el primer cebador-sonda y la segunda sonda proporciona un indicador de la frecuencia de la secuencia de variante con respecto a la frecuencia del primer amplicón; o
- 50 una sonda de terminación de bloqueo no marcada para suprimir selectivamente la amplificación de qPCR y la detección de una primera secuencia diana frente a una segunda secuencia diana; en donde la sonda de terminación comprende:
- (i) un oligonucleótido complementario a la primera secuencia de nucleótidos diana,
- (ii) un extremo 5' modificado para resistir la digestión con exonucleasa,

(iii) un extremo 3' modificado para resistir la extensión de la polimerasa, y

(iv) en donde la sonda de terminación está configurada además con una T_m y un ΔG que excede la T_m y el ΔG de los cebadores y/o sondas del ensayo de qPCR por al menos aproximadamente 5 kcal/mol en ΔG y en al menos aproximadamente 5°C en T_m .

5 Preferiblemente, al menos uno de los oligonucleótidos de sonda y el oligonucleótido antisonda comprende al menos uno de: un nucleótido no natural, un aglutinante de surco menor (MGB) y un ácido nucleico Zip (ZNA).

Preferiblemente, el sistema que comprende una segunda sonda está configurado para detectar una eliminación variable de múltiples bases dentro de los codones 746 a 753 del exón 19 del gen EGFR, comprendiendo dicho sistema al menos un cebador no marcado, y dos sistemas de sonda:antisonda con diferente marcaje; en donde el primer sistema de sonda comprende una sonda-cebador complementaria a una primera secuencia no específica; en donde el segundo sistema de sonda es complementario a la secuencia silvestre en el sitio de eliminación del exón 19 e inhibe o excluye la detección de plantillas diana que comprenden una eliminación de múltiples bases dentro de los codones 746 a 753 del exón 19 del gen EGFR; después de lo cual que se establece la presencia y la frecuencia de una eliminación de exón 19 comparando la señalización relativa de los dos sistemas de sonda; y en donde el conjunto de sonda:antisonda-cebador no específica es SEQ ID NOs.: 56, 57 y 53, o SEQ ID NOs.: 79, 80 y 12; y en donde el conjunto de sonda-antisonda-cebador solo silvestre de eliminación-19 es SEQ ID NOs.: 81, 82 y 53, o SEQ ID NOs.: 54, 55 y 53, y en donde cada conjunto de sonda:antisonda-cebador no específico y el conjunto de sonda-antisonda-cebador solo silvestre de eliminación-19 puede incluir opcionalmente cebador suplementario SEQ ID NO.: 78.

Preferiblemente, el sistema se selecciona del grupo que consiste en:

20 una sonda iDDS, en donde el extremo 3' del oligonucleótido de sonda, y opcionalmente el oligonucleótido antisonda, se bloquea para prevenir la extensión de la polimerasa; y en donde el sistema comprende además un par de cebadores flanqueantes configurados para amplificar una región de ácido nucleico que comprende la primera secuencia de nucleótidos diana;

25 una sonda Flip, en donde el oligonucleótido antisonda comprende además, en el extremo 3' del mismo, un primer oligonucleótido cebador; en donde, opcionalmente, el oligonucleótido antisonda y el primer oligonucleótido cebador están enlazados por una región espaciadora abásica; y el sistema comprende además un segundo oligonucleótido cebador, en donde el primer y el segundo oligonucleótidos cebadores están configurados para amplificar una región de ácido nucleico que comprende la primera secuencia de nucleótidos diana;

30 una sonda ZIPR que comprende un sistema de detección de amplicón de cebador-sonda, en donde el oligonucleótido de sonda comprende una secuencia cebadora y está configurada para cooperar con un oligonucleótido cebador para amplificar una secuencia de nucleótidos diana, después de lo cual se genera una señal detectable cuando el oligonucleótido de sonda se incorpora a un amplicón; y

35 un cebador-sonda G-Force que comprende: (i) un segmento de sonda marcado fluorescente en 5' que comprende una secuencia rica en citosina de aproximadamente 7 a 9 bases, (ii) un espaciador abásico, (iii) una secuencia antisonda rica en guanina complementaria con la región de secuencia rica en citosina, y (iv) una secuencia de cebador; después de lo cual, cuando se incorpora el oligonucleótido cebador-sonda marcado en los amplicones generados, se habilita una señal detectable.

40 Preferiblemente, el sistema comprende además un sistema de amplificación isotérmica ISAM adecuado para amplificar y detectar una secuencia diana de ARN o ADN, en donde el oligonucleótido cebador-sonda está configurado para cooperar con un cebador flanqueante para amplificar la secuencia diana; en donde el cebador flanqueante o el oligonucleótido cebador-sonda o ambos comprenden además una secuencia promotora de ARN polimerasa 5'; y en donde el sistema de amplificación-detección comprende además una enzima promotora de ARN polimerasa, una enzima transcriptasa reversa y una enzima RNasaH; y en donde un oligonucleótido antisonda comprende opcionalmente una secuencia complementaria a la secuencia promotora de ARN polimerasa; y en donde dichos oligonucleótidos cebador-sonda están configurados para comprender uno o ambos cebadores; con lo que la señalización y la transcripción del ARN se proporcionan desde uno o ambos extremos del amplicón; y opcionalmente, se fija un cebador a un sustrato sólido; o

50 en donde cuando el sistema es una sonda iDDS, el oligonucleótido de la sonda iDDS es complementario a una secuencia diana interna que comprende de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud; el oligonucleótido antisonda comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 nucleótidos de longitud; y uno o dos de los cebadores flanqueantes comprenden además una secuencia promotora de ARN polimerasa 5'; y un sistema de amplificación-detección que comprende una enzima promotora de ARN polimerasa, una enzima de transcriptasa reversa y una enzima RNasaH; y, opcionalmente, se fija un cebador a un sustrato sólido.

55 Preferiblemente, el sistema comprende una primera sonda de iDDS complementaria a la primera secuencia de nucleótidos diana, una segunda sonda iDDS opcional complementaria a una segunda secuencia de nucleótidos diana, y una sonda de terminación de bloqueo no marcada que comprende:

(i) un oligonucleótido complementario de la segunda secuencia de nucleótidos diana, comprendiendo dicha segunda secuencia de nucleótidos diana un objetivo de alta frecuencia y que tiene una secuencia sustancialmente similar pero no idéntica a la primera secuencia de nucleótidos diana que comprende un objetivo de baja frecuencia;

(ii) un extremo 5' modificado resistente a la digestión con exonucleasa;

5 (iii) un extremo 3' modificado resistente a la extensión de la polimerasa; o

(iv) uno o más nucleótidos no naturales opcionales o un aglutinante de surco menor opcional (MGB) o una combinación de los mismos;

en donde la sonda de terminación de bloqueo está configurada para comprender una T_m y un ΔG que difiere de la T_m y el ΔG de los cebadores o las sondas iDDS o ambas en al menos 4 kcal/mol en ΔG y en al menos 6 °C en T_m .

10 Preferiblemente, el sistema es la sonda iDDS configurada para detectar una posición de base nucleotídica variable del exón 21 del gen EGFR, comprendiendo dicho sistema los oligonucleótidos SEQ ID NOs.: 7-12 y 39-41.

Preferiblemente, el sistema de sonda: antisonda está configurado para detectar una variante de nucleótido del exón 19, 20 o 21 del gen EGFR, un gen VKORC1, un gen CYP2C9, un gen uidA de E. coli, un gen 16s de bacteria gram positiva, un gene 16s de bacteria gram negativa, un gen mycobacterium inhA, un gen mycobacterium rpoB, un gen mycobacterium 16S, un gen hemaglutinina (HA) del virus de la influenza, un gen matriz (M) del virus influenza A, un gen no estructural (NS) de influenza Virus B y un gen KRAS.

15

Preferiblemente, el sistema de sonda:antisonda comprende las secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NOs.: 1 y 2, SEQ ID NOs.: 3 y 4, SEQ ID NOs.: 7 y 8, SEQ ID NOs.: 9 y 10, SEQ ID NOs.: 13 y 14, SEQ ID NOs.: 17 y 18, SEQ ID NOs.: 19 y 20, SEQ ID NOs.: 23 y 24, SEQ ID NOs.: 36 y 37, SEQ ID NOs.: 54 y 55, SEQ ID NOs.: 56 y 57, SEQ ID NOs.: 64 y 65, SEQ ID NOs.: 66 y 67, SEQ ID NOs.: 70 y 71, SEQ ID NOs.: 72 y 73, SEQ ID NOs.: 79 y 80, SEQ ID NOs.: 81 y 82, SEQ ID NOs.: 85 y 86, SEQ ID NOs.: 88 y 89, y SEQ ID NOs.: 91 y 92.

20

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1A ilustra esquemáticamente la estructura y el mecanismo de la sonda DDS general.

La figura 1B ilustra esquemáticamente el sistema DDS interno (iDDS) de acuerdo con la divulgación.

La Figura 1C ilustra esquemáticamente el sistema ZIPR DDS terminal.

La figura 2A ilustra esquemáticamente el sistema DDS de FLIP.

30 La Figura 2B ilustra esquemáticamente el sistema de do sondas DDS: iDDS de ZIPR dos para cuantificar los amplicones totales y la proporción de los mismos de una variante particular.

La Figura 2C ilustra esquemáticamente el sistema de dos sondas DDS:iDDS de G-Force para cuantificar los amplicones totales y la proporción de los mismos de una variante particular.

La figura 3A ilustra esquemáticamente el sistema "Terminadora silvestre" ("WTx") de dos etapas de la divulgación.

La figura 3B ilustra esquemáticamente el sistema "Terminadora silvestre" de una etapa ("WTx") de la divulgación.

35 La Figura 4A ilustra esquemáticamente las sondas DDS de terminales combinadas con la amplificación isotérmica ISAM.

La Figura 4B ilustra esquemáticamente las sondas DDS internas combinadas con la amplificación isotérmica de ISAM.

La figura 4C ilustra esquemáticamente sondas DDS con amplificación ISAM en chip.

40 La Figura 5 ilustra configuraciones de marcaje alternativas para mejorar la señalización con sistemas de sonda:antisonda de DDS (izquierda) donde la sonda tiene tanto un emisor de fluorescencia como un modulador de fluorescencia y la antisonda tiene un modulador de fluorescencia, (medio) donde la sonda tiene un emisor de fluorescencia y un modulador de fluorescencia y la antisonda tienen un emisor de fluorescencia y un modulador de fluorescencia, y (derecha) donde la sonda tiene dos emisores de fluorescencia y la antisonda tiene dos moduladores de fluorescencia.

45 La figura 6 ilustra un sistema de sonda:antisonda de iDDS de acuerdo con la divulgación para la detección de la variante de SNP de tipo silvestre de VKORC1 (gen de epóxido reductasa de vitamina K). A medida que qPCR descendiendo cada ciclo de desnaturalización a 95 °C a fusión/amplificación/detección a aproximadamente 52-62 °C, la sonda se une primero al objetivo coincidente (arriba) debido a la coincidencia correcta en el sitio SNP (**negrita G**) y por lo tanto mayor afinidad termodinámica (medida por AG y T_m). Si no hay disponible un objetivo coincidente, la sonda se

unirá entonces en segundo lugar a la antisonda a un ΔG y T_m menor (medio) debido a la falta de coincidencia diseñada en la antisonda para bajar la T_m unos 5-6 grados y el ΔG hacia abajo alrededor de 2- 2.5 kcal/mol En este caso y en la mayoría de los casos, la afinidad termodinámica entre la sonda y el segundo objetivo con un SNP no coincidente (**negrita A**) es significativamente menor que la afinidad de la sonda con la antisonda, alrededor de 5-6 grados más baja en T_m y 2-2.5 kcal/mol menor en ΔG (abajo). Por lo tanto, el sistema de sonda: antisonda detecta selectivamente el objetivo correcto e inhibe o evita la unión y la detección de un objetivo incorrecto.

La Figura 7A ilustra la región del exón 21 del gen EGFR que comprende las posiciones 2535-2616 del par de bases que se amplificaron para detectar el marcador de cáncer del sitio SNP L858R. La plantilla mutante (parte superior) y la plantilla silvestre (parte inferior) se muestran con el sitio variable SNP 858 en **negrita** y las secuencias de cebador comunes en **negrita**.

La Figura 7B ilustra los componentes de sonda:antisonda de 858R para detectar la variante mutante de EGFR mediante qPCR en donde tanto la sonda como la antisonda están diseñadas con una base no coincidente. La no coincidencia insertada en el antisonda (T-T) reduce la afinidad térmica del dúplex sonda:antisonda relativo al dúplex objetivo de sonda:mutante. La no coincidencia auxiliar diseñada en la sonda (C-C) anticipa una diana silvestre con la variante SNP de 858L que se encuentra a dos bases de distancia de la no de coincidencia auxiliar. Cuando la sonda mutante encuentra tal objetivo, se produce una "burbuja de hibridación" de 3 bases como se muestra (CCG), disminuyendo la afinidad térmica e impidiendo la detección de objetivos falsos. Con un diseño efectivo, estas interacciones termodinámicas dan como resultado tres niveles distintos de hibridación que difieren unos de otros en aproximadamente 5-6 grados en T_m y aproximadamente de 2-2.5 kcal/mol en ΔG . En consecuencia, a medida que desciende la temperatura durante la etapa de fusión de qPCR, la sonda mutante hibrida preferentemente con la secuencia diana mutante si está presente debido a la T_m y ΔG más altas para ese dúplex como se muestra (arriba). La T_m y ΔG para el dúplex sonda:antisonda es significativamente más baja (medio), pero aún mucho más alta que la T_m y ΔG del dúplex sonda mutante:diana silvestre (abajo) debido a la no coincidencia de SNP (GA) y la no coincidencia auxiliar (CC) que trabajan juntos para crear una "burbuja de hibridación" multi-base. Los valores calculados de T_m y ΔG se representan en la figura para cada nivel de hibridación y para las diferencias entre estos niveles, con base en el programa de Análisis de fusión de dos estados (hibridación) del servidor web DINAMelt (funciona a 58 grados) [N. R. Markham y M. Zuker. Servidor web DINAMelt para la predicción de Fusión de ácidos nucleicos. Nucleic Acids Res. 33, W577-W581, 2005]. Cabe señalar que los niveles de T_m para este sistema son elevados en relación con otras fuentes de análisis de T_m comúnmente empleadas (por ejemplo, sitios web de Operon e IDT).

La Figura 8A es una gráfica que muestra la señal fluorescente generada por qPCR usando iDDS con un oligonucleótido de sonda específico para la variante de SNP de tipo silvestre de VKORC1 con secuencias de nucleótidos diana de tipo silvestre (W) y variante mutante (M).

La Figura 8B es una gráfica que muestra la señal fluorescente generada por qPCR usando iDDS con un oligonucleótido de sonda específico para la variante de SNP mutante de VKORC1 con secuencias de nucleótidos diana de tipo silvestre (W) y variante mutante (M).

La Figura 9 es una gráfica que muestra la señal fluorescente generada por qPCR usando iDDS con un oligonucleótido de sonda específico para la variante del SNP de 858R mutante de EGFR con secuencias de nucleótidos diana de tipo silvestre (W) y variante mutante (M).

La Figura 10A es una gráfica que muestra la señal fluorescente generada por qPCR usando iDDS con un oligonucleótido de sonda específico para el SNP mutante de E. coli O157:H7 con secuencias de nucleótidos diana de tipo silvestre (W) y (dos concentraciones) variante mutante (M).

La Figura 10B es una gráfica que muestra la señal fluorescente generada por qPCR usando TaqManMGB con un oligonucleótido de sonda específico para el SNP mutante de E. coli O157: H7 con secuencias de nucleótidos diana de tipo silvestre (W) y variante mutante (M).

La Figura 11A es una gráfica que muestra la señal fluorescente generada por qPCR usando oligonucleótidos iDDS específicos para bacterias gram positivas (P) y gram negativas (N) con una secuencia de nucleótidos diana gram positiva.

La Figura 11B es una gráfica que muestra la señal fluorescente generada por qPCR usando oligonucleótidos iDDS específicos para bacterias gram positivas (P) y gram negativas (N) con una secuencia de nucleótidos diana gram negativa.

La Figura 12 es una gráfica que muestra la señal fluorescente generada por qPCR usando DDS de ZIPR con un oligonucleótido de sonda específico para una secuencia de nucleótidos diana del gen del virus de influenza H3.

La Figura 13A es una gráfica que muestra las señales fluorescentes generadas por qPCR utilizando oligonucleótidos de sonda DDS de FLIP específicos para una región diana en el gen 16S de Mycobacterium tuberculosis que difiere de la misma región diana en Mycobacterium paratuberculosis por una base única, usando cuatro concentraciones de la secuencia de nucleótidos diana de M. tuberculosis y una secuencia de nucleótidos diana de control de M. paratuberculosis.

La Figura 13B es una gráfica que muestra las señales fluorescentes generadas por qPCR usando una sonda TaqMan específica para una región diana en el gen 16S de *Mycobacterium tuberculosis* que difiere de la misma región diana en *Mycobacterium paratuberculosis* por una base única, usando cuatro concentraciones de Secuencia de nucleótidos diana de *M. tuberculosis* y secuencia de nucleótidos diana de control de *M. paratuberculosis*.

5 La figura 14 es una gráfica que muestra las señales fluorescentes generadas por qPCR usando mejora de objetivo en dos etapas con una sonda de bloqueo "Terminadora silvestre" y una sonda iDDS específica para EGFR variante 858R con una muestra mixta de 0.28% de secuencia de nucleótido diana 858R y 99,8% de secuencia de nucleótidos diana variante de tipo silvestre.

10 La Figura 15 es una gráfica que muestra las señales fluorescentes generadas por qPCR usando un cebador-sonda de G-Force con plantillas de *M. tuberculosis* silvestre (W) o mutante (M) que no difieren en sus secuencias de cebador.

La Figura 16A es una gráfica que muestra las señales fluorescentes generadas por qPCR utilizando tanto una sonda de G-Force no discriminatoria como una sonda de iDDS que es específica para la secuencia silvestre y que usa una plantilla mutante de *M. tuberculosis* (M).

15 La Figura 16B es una gráfica que muestra las señales fluorescentes generadas por qPCR utilizando tanto una sonda de G-Force no discriminatoria como una sonda de iDDS de tipo silvestre con cantidades diferentes de plantilla de *M. tuberculosis* silvestre (W) versus mutante (M).

20 La Figura 17 es una gráfica que muestra las señales fluorescentes generadas por qPCR usando mejora de objetivo en una etapa con una sonda de bloqueo de "Terminadora silvestre" y una sonda iDDS específica para la EGFR variante mutante de 858R con una muestra mixta de 2% de secuencia de nucleótido diana 858R y 98% de una secuencia de nucleótidos diana variante de tipo silvestre.

La Figura 18 es una gráfica que muestra la señal fluorescente generada por ZIPR e ISAM.

La figura 19 es una gráfica que muestra la señal fluorescente generada por iDDS e ISAM.

La Figura 20 es una imagen digital de una detección de arreglo de ISAM en chip, puntos Cy3, círculos FAM.

25 La Figura 21 es una gráfica que muestra la detección de un mutante Del-19 del EGFR con una sonda iDDS silvestre solamente y una sonda ZIPR no específica en donde las curvas muestran dos señales en paralelo con una plantilla 100% silvestre y una señal iDDS plana con una plantilla 100% mutante.

La Figura 22 es una gráfica que muestra la detección de mutantes Del-19 del EGFR con una sonda iDDS silvestre solamente y una sonda ZIPR no específica en donde las curvas muestran dos señales en paralelo con una señal iDDS inferior con una plantilla silvestre/mutante 50/50, y una señal iDDS plana con una plantilla 100% mutante.

30 La Figura 23 es una gráfica que muestra la detección de mutantes Del-19 del EGFR con una sonda iDDS solo silvestre y una sonda ZIPR no específica con una plantilla 100% mutante con una señal iDDS plana con una plantilla 100% mutante.

La Figura 24 muestra el esquema de detección para el ensayo del mutante Del-19 del EGFR.

Descripción detallada de la divulgación

35 Antes de que la presente divulgación se describa con mayor detalle, debe entenderse que esta divulgación no está limitada a realizaciones particulares descritas, y como tales pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente divulgación estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

40 Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor interviniente, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente otra cosa, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor declarado o interviniente en ese rango establecido, está abarcado dentro de la divulgación. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños se pueden incluir independientemente en los rangos más pequeños y también están abarcados dentro de la divulgación, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el rango establecido. Cuando el rango establecido incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen uno o ambos límites incluidos también se incluyen en la divulgación.

45 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento también se pueden usar en la práctica o prueba de la presente divulgación, los métodos y materiales preferidos se describen a continuación.

50 Como será evidente para los expertos en la técnica tras leer esta divulgación, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en este documento tiene componentes y características discretos que pueden separarse fácilmente o combinarse con las características de cualquiera de las otras varias realizaciones sin salir del

alcance o el espíritu de la presente divulgación. Cualquier método citado puede llevarse a cabo en el orden de los eventos citados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

Las realizaciones de la presente divulgación emplearán, a menos que se indique otra cosa, técnicas de medicina, química orgánica, bioquímica, biología molecular, farmacología y similares, que están dentro de la experiencia en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura.

Debe observarse que, tal como se usa en la especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. En la especificación y las reivindicaciones, se hará referencia a una serie de términos que se definirán para tener los siguientes significados a menos que sea evidente una intención contraria.

Como se usa aquí, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a menos que se especifique otra cosa. En esta divulgación, "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la legislación de patentes de los EE. UU. y puede significar "incluye", "que incluye" y similares; "consistente esencialmente en" o "consiste esencialmente" o similar, cuando se aplica a métodos y composiciones abarcadas por la presente divulgación se refiere a composiciones como las divulgadas en este documento, pero que pueden contener grupos estructurales adicionales, componentes de composición o etapas de método (o análogos o derivados de los mismos como se discutió anteriormente). Tales grupos estructurales adicionales, componentes de composición o etapas de método, etc., sin embargo, no afectan materialmente a las características básicas y novedosas de las composiciones o métodos, en comparación con las composiciones o métodos correspondientes divulgados en este documento. "Consistente esencialmente en" o "consiste esencialmente" o similar, cuando se aplica a métodos y composiciones abarcadas por la presente divulgación tienen el significado atribuido en la legislación de patentes de los EE. UU. y el término está abierto, permitiendo la presencia de más de lo que se cita siempre que las características básicas o novedosas de lo que se cita no se modifiquen por la presencia de más de lo que se cita, sino que se excluyen las realizaciones de la técnica anterior.

Antes de describir las diversas realizaciones, se proporcionan las siguientes definiciones y se deben usar a menos que se indique otra cosa.

Definiciones

Los términos y expresiones utilizados en este documento tienen su significado reconocido en la técnica, que se puede encontrar haciendo referencia a textos y publicaciones estándar conocidos por los expertos en la técnica. Las siguientes definiciones se proporcionan para aclarar su uso específico en el contexto de esta divulgación.

El término "complementario" se refiere a un número suficiente de pares de bases coincidentes en una secuencia de oligonucleótidos para interactuar específicamente (hibridar) con la secuencia de ácido nucleico diana que se va a amplificar o detectar. En la técnica, se necesita un grado muy alto de complementariedad para la especificidad y la sensibilidad de la hibridación, aunque no necesita que sea del 100%.

El término "desnaturalización" se refiere al desplegamiento y separación de cadenas de ADN complementarias, y puede realizarse mediante tratamiento con calor o desnaturalizante.

El término "unidad estructural detectable" como se usa aquí se refiere a una molécula marcadora (isotópica o no isotópica) que se incorpora indirectamente o directamente en un oligonucleótido para facilitar la detección. La síntesis de oligonucleótidos marcados se puede llevar a cabo mediante varios métodos conocidos por los expertos en la técnica, y diversas moléculas fluorescentes son adecuadas para marcación con sonda.

El término "marcada detectablemente" como se usa aquí se refiere a un oligonucleótido que está marcado con un fluoróforo u otra especie molecular que provoca una respuesta física o química que se puede observar o detectar a simple vista o mediante un instrumento. Como se usa aquí, un "marcador" o "etiqueta" se refiere a una molécula que, cuando se agrega, por ejemplo, sin limitación, mediante enlace covalente o hibridación, a otra molécula, por ejemplo, también sin limitación, proporciona un polinucleótido o fragmento de polinucleótido o mejora un medio para detectar la otra molécula.

El término "ADN", como se usa aquí, se refiere a la forma polimérica de desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina o citosina) en un estado de cadena sencillo o de cadena doble e incluye moléculas de ADN lineales o circulares. Al discutir las moléculas de ADN, las secuencias se pueden describir mediante la convención de dar solamente la secuencia en la dirección 5' a 3'.

Los términos "amplificación de ADN" y "amplificación" se refieren a cualquier proceso que aumente las copias de una secuencia de ADN específica mediante amplificación enzimática. Un proceso comúnmente utilizado es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El proceso de PCR de Mullis se describe en la patente de EE.UU. Nos. 4.683.195 y 4.683.202. La PCR implica el uso de una ADN polimerasa termoestable, cebadores y ciclos de calentamiento, que separan las cadenas de ADN y amplifican exponencialmente una región genética de interés. Se puede usar cualquier tipo de PCR, tal como PCR cuantitativa, RT-PCR, PCR de inicio en caliente, LAPCR, PCR multiplex, PCR de caída, etc. Ventajosamente, se usa PCR en tiempo real. El producto de extensión de la reacción en cadena será un dúplex discreto de ácido nucleico con terminales que corresponden a los extremos de los cebadores empleados.

- Los términos "amplificar enzimáticamente" o "amplificar" como se usan aquí se refieren a la amplificación de ADN. Actualmente, el método más común es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Otros métodos de amplificación incluyen LCR (reacción en cadena de la ligasa), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA); Amplificación de Q β replicasa (Q β RA); replicación autosostenida (3SR); y NASBA (amplificación basada en las secuencias de ácido nucleico), que puede realizarse tanto en ARN como en ADN.
- El término "región flanqueante", como se usa aquí, se refiere a un tramo de nucleótidos en una secuencia que es 5' o 3' de otra región de la secuencia de nucleótidos.
- El término "fluoróforo" como se usa aquí se refiere a cualquier grupo informador cuya presencia puede detectarse por sus propiedades de emisión de luz.
- Los términos "detenedor de fluorescencia" o "detenedor" tal como se usan aquí se refieren a moléculas que interfieren con o absorben la fluorescencia emitida por un fluoróforo cercano. Los detenedores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, Dabsyl o un BLACK HOLE QUENCHER.RTM que son moléculas aromáticas no fluorescentes. Un detenedor también puede ser una segunda molécula fluorescente, por ejemplo TAMRA (carboxitetrametilrodamina), que emite en una longitud de onda diferente.
- El término "hibridación" tal como se usa aquí se refiere al proceso de asociación de dos cadenas de ácido nucleico para formar un dúplex antiparalelo estabilizado mediante enlaces de hidrógeno entre cadenas opuestas. Los términos "hibridación" y "unión" se usan indistintamente y se refiere a la formación de pares de bases A-T y C-G complementarias entre las secuencias de nucleótidos de dos segmentos de polinucleótidos. Las cadenas hibridadas se llaman "dúplex".
- Los términos "hibridar específicamente a" e "hibridación específica" e "hibridar selectivamente a", como se usan aquí, se refieren a la unión, duplexación o hibridación de una molécula de ácido nucleico preferentemente a una secuencia de nucleótidos particular bajo condiciones rigurosas.
- El término "afinidad de hibridación" como se usa aquí se refiere a la propiedad de un oligonucleótido para complementarse con e hibridar con otra secuencia de nucleótidos para formar un dúplex de ácido nucleico.
- El término "inmovilizado en un soporte sólido", como se usa aquí, se refiere a un oligonucleótido unido a un sustrato en una ubicación particular, de modo que puede ser sometido a lavado u otra manipulación física o química sin ser desalojado. En la técnica se conoce un número de soportes sólidos y métodos de inmovilización, y se pueden usar en los métodos de esta divulgación.
- El término "ácido nucleico bloqueado (LNA)" como se usa aquí se refiere a un nucleótido modificado con un puente extra que conecta el oxígeno 2' y el carbono 4'. El puente "bloquea" la ribosa en la conformación 3'-endo (norte), que frecuentemente se encuentra en los dúplex de forma A. Los nucleótidos de LNA se pueden incorporar a un oligonucleótido para aumentar la estabilidad de un dúplex de ácido nucleico.
- El término "temperatura de fusión" (T_m) como se usa aquí se refiere a una temperatura a la cual los dúplex hibridados se deshibridan y vuelven a su estado de cadena sencillo. De la misma manera, la hibridación no ocurrirá entre dos cadenas a temperaturas superiores a la temperatura de fusión del dúplex resultante. Es ventajoso que la diferencia en T_m de los dúplex de fragmento de oligonucleótido de esta divulgación sea de aproximadamente 1 °C hasta aproximadamente 10 °C para que sea fácilmente detectable.
- El término "posición de base no coincidente" tal como se usa aquí se refiere a cuando, en un ácido nucleico dúplex, dos bases de nucleótidos opuestas no se aparean de una manera complementaria. Por ejemplo, una adenina formará enlaces de hidrógeno con timidina correctamente, mientras que la citosina o la guanidina formarán enlaces de hidrógeno más débiles o nulos con la adenina, siendo por lo tanto no coincidentes. Alternativamente, en un ácido nucleico dúplex, una posición de base no coincidente puede deberse a la adición o eliminación de un miembro de un par complementario de bases opuestas, o debido a la sustitución de un miembro de un par complementario de bases opuestas con una base no natural, un sitio abásico o un espaciador.
- El término "señal detectable modulada" como se usa aquí se refiere a una señal detectable emitida por una unidad estructural de marcador que se reduce en intensidad o cambia de otra manera tal como, pero no limitado a, un cambio en la longitud de onda de tal manera que la señal modulada es detectablemente distinta de una señal no modulada. Una señal modulada puede ser, por ejemplo, una señal detenida en donde parte o la totalidad de la energía de la señal no modulada es absorbida por una segunda unidad estructural de marcador de tal manera que la señal modulada sea menos intensa que la señal original. Alternativamente, por ejemplo, una primera señal a partir de una primera unidad estructural de marcador puede ser un estimulante para que una segunda unidad estructural de marcador emita una señal de una longitud de onda diferente.
- El término "región multi-base no hibridada" como se usa aquí se refiere a una región de un ácido nucleico dúplex que comprende al menos dos, y preferiblemente tres o cuatro, bases opuestas que no coinciden, formando así una "burbuja de hibridación" de bases no dúplex.

- El término "nucleótido" como se usa aquí se refiere a una subunidad de un ácido nucleico (ya sea ADN o ARN o un análogo de los mismos) que puede incluir, pero no se limita a, un grupo fosfato, un grupo azúcar y una base que contiene nitrógeno, así como análogos de tales subunidades. Los términos "nucleótido" y "nucleósido" incluyen aquellas unidades estructurales que contienen no solo las bases de purina y pirimidina de origen natural, por ejemplo, adenina (A), timina (T), citosina (C), guanina (G) o uracilo (U), sino también a bases modificadas o análogas conocidas por los expertos en la técnica.
- El término "oligonucleótido", como se usa aquí, se refiere a una serie de residuos de nucleótidos enlazados que comprenden un número suficiente de bases de nucleótidos para usarse en una reacción de PCR. Una secuencia de oligonucleótidos corta puede basarse en, o diseñarse a partir de, una secuencia genómica o de ADNc y se usa para amplificar, confirmar o revelar la presencia de un ADN o ARN idéntico, similar o complementario en una célula o tejido particular. Los oligonucleótidos pueden sintetizarse químicamente y pueden usarse como cebadores o sondas. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" como se usan aquí también pueden referirse a ARN o ADN modificado o no modificado.
- Los términos "ácido nucleico", "secuencia de ácido nucleico" u "oligonucleótido" también abarcan un polinucleótido. Un "polinucleótido" se refiere a una cadena lineal de nucleótidos conectados por un enlace fosfodiéster entre el grupo 3'-hidroxilo de un nucleósido y el grupo 5'-hidroxilo de un segundo nucleósido que a su vez está enlazado a través de su grupo 3'-hidroxilo a el grupo 5'-hidroxilo de un tercer nucleósido y así sucesivamente para formar un polímero compuesto por nucleósidos enlazados mediante un esqueleto de fosfodiéster. Un "polinucleótido modificado" se refiere a un polinucleótido en el que los nucleótidos naturales se han reemplazado parcialmente con nucleótidos modificados.
- El término "ácido nucleico peptídico (PNA)" es un polímero de origen no natural similar a ADN o ARN en donde el esqueleto está compuesto por unidades repetitivas de N-(2-aminoetil)-glicina enlazadas por uniones peptídicas. La unión entre cadenas de ADN/PNA es más fuerte que entre cadenas de ADN/ADN y, por lo tanto, la T_m (temperatura de "fusión") de una doble hélice de ADN de adenina/ATINA de 6 bases es de 31 °C en comparación con un dúplex de ADN/ADN similar que se desnaturaliza a 10 °C.
- El término "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" como se usa aquí se refiere a una reacción de amplificación de ADN termocíclica, mediada por polimerasa, que emplea moléculas plantilla, cebadores oligonucleotídicos complementarios a las moléculas plantilla, una ADN polimerasa termoestable y desoxirribonucleótidos, e implica tres procesos repetidos (desnaturalización, hibridación y extensión de cebadores) que se realizan a distintas temperaturas y etapas. En muchas realizaciones, los procesos de hibridación y extensión pueden realizarse simultáneamente. La muestra de nucleótidos que se va a analizar puede ser un producto de amplificación por PCR proporcionado a partir de una técnica de ciclicación rápida descrita en la patente de EE.UU. Nos. 6.569.672; 6.569.627; 6.562.298; 6.556.940; 6.569.672; 6.569.627; 6.562.298; 6.556.940; 6.489.112; 6.482.615; 6.472.156; 6.413.766; 6.387.621; 6.300.124; 6.270.723; 6.245.514; 6.232.079; 6.228.634; 6.218.193; 6.210.882; 6.197.520; 6.174.670; 6.132.996; 6.126.899; 6.124.138; 6.074.868; 6.036.923; 5.985.651; 5.958.763; 5.942.432; 5.935.522; 5.897.842; 5.882.918; 5.840.573; 5.795.784; 5.795.547; 5.785.926; 5.783.439; 5.736.106; 5.720.923; 5.720.406; 5.675.700; 5.616.301; 5.576.218 y 5.455.175. Otros métodos de amplificación incluyen, sin limitación, NASBR, SDA, 3SR, TSA y la replicación de círculo rodante.
- El término "polimerasa" como se usa aquí se refiere a una enzima que cataliza la adición secuencial de unidades monoméricas a una cadena polimérica. En realizaciones ventajosas de esta divulgación, la "polimerasa" funcionará añadiendo unidades monoméricas cuya identidad está determinada por una plantilla complementaria de una secuencia específica. Las ADN polimerasas tales como AND pol 1 y Taq polimerasa añaden desoxirribonucleótidos al extremo 3' de una cadena de polinucleótidos de una manera dependiente de plantilla, sintetizando así un ácido nucleico complementario. Las polimerasas pueden extender un cebador una vez o pueden amplificar repetidamente dos cadenas complementarias usando dos cebadores.
- El término "cebador", como se usa aquí, se refiere a un oligonucleótido complementario a un segmento de ADN que se va a amplificar o replicar. Típicamente, los cebadores se usan en PCR. Un cebador se hibrida con (o "fusiona" a) el ADN de plantilla y es utilizado por la enzima polimerasa como punto de partida para el proceso de replicación/amplificación. Por "complementario" se entiende que la secuencia de cebador puede formar un complejo de enlace de hidrógeno estable con la plantilla.
- Los cebadores de la presente invención se seleccionan para que sean "sustancialmente" complementarios a diferentes cadenas de una secuencia de ADN objetivo, pero no necesitan reflejar la secuencia exacta de la plantilla. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no complementario se puede unir al extremo 5' del cebador, siendo el resto del cebador complementario a la cadena. Alternativamente, las bases no complementarias se pueden intercalar en un cebador, siempre que haya suficiente complementariedad con el objetivo para hibridar e iniciar un producto de extensión.
- El término "sonda", como se usa aquí, se refiere a oligonucleótidos que son secuencias de ácido nucleico de longitud variable, usadas en la detección de secuencias de ácido nucleico idénticas, similares o complementarias por hibridación. Una secuencia de oligonucleótidos utilizada como sonda de detección puede marcarse con una unidad estructural detectable. En la técnica se conocen diversas unidades estructurales de marcado, tales como compuestos radioactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes o electroquimioluminiscentes.

- 5 El término "sonda:antisonda" como se usa aquí se refiere a un par de oligonucleótidos que tienen casi o exactamente el mismo número de posiciones de base y que tienen secuencias sustancialmente complementarias de tal manera que, en ausencia de una tercera secuencia de nucleótidos hibridada con la sonda o antisonda, dichos oligonucleótidos pueden formar un dúplex. Está dentro del alcance de la divulgación para los oligonucleótidos de sonda y antisonda ser moléculas separadas o estar enlazadas como una región de una entidad molecular sencilla.
- Los términos "detener" o "detiene" o "que detiene" o "detenido" tal como se usan aquí se refieren a la reducción de la señal producida por una molécula. Incluye, pero no se limita a, reducir la señal producida a cero o por debajo de un límite detectable. Por lo tanto, una molécula dada puede ser "inactivada" por otra molécula y aun así producir una señal detectable, aunque la señal se reduce en gran medida.
- 10 El término "qPCR" se refiere a una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, también llamada reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (Q-PCR/qPCR/qrt-PCR) que se usa para amplificar y detectar simultáneamente la cantidad de una molécula de ADN diana. La cantidad se puede expresar bien sea como un número de copias o como una cantidad relativa normalizada para el ADN de entrada. La detección continúa a medida que la reacción progresa en tiempo real a diferencia de la PCR estándar, donde el producto de la reacción se detecta en su punto final. Dos métodos comunes para la detección de productos en PCR en tiempo real son: (1) colorantes fluorescentes no específicos que se intercalan con cualquier ADN de doble cadena, y (2) oligonucleótidos específicos de la secuencia que están marcados con un informador fluorescente y permiten la detección después de hibridación con su ADN diana complementario.
- 15 El término "detectar selectivamente" como se usa aquí se refiere a la capacidad de las sondas de oligonucleótidos de la divulgación para distinguir una secuencia de nucleótidos de otra hibridando selectivamente a una secuencia bajo las mismas o similares condiciones de hibridación y, cuando se une a una secuencia y no a la otra, para proporcionar una señal detectable que indique tal unión.
- 20 El término "espaciador" como se usa aquí se refiere a cualquier entidad molecular tal como, pero sin limitación, un espaciador de múltiples carbonos, al menos un nucleótido abásico artificial, un péptido o cualquier otra unidad estructural abásica extendido que pueda unirse al extremo de un oligonucleótido o que puede unir dos oligonucleótidos entre sí, proporcionando medios para bloquear el avance de la polimerasa sobre el espaciador.
- 25 El término "sistema" como se usa aquí se refiere a una combinación de al menos dos oligonucleótidos que cooperan para hibridar selectivamente con una secuencia de nucleótidos diana y generar una señal detectable que indica la presencia de la secuencia diana. El sistema puede incluir además oligonucleótidos de cebador útiles para la amplificación de la polimerasa de una secuencia de nucleótidos a partir de un ácido nucleico de plantilla para formar un amplicón amplificado, comprendiendo dicho amplicón una secuencia de nucleótidos de la que se sospecha que es una secuencia diana.
- 30 Los términos "diana" y "secuencia de nucleótidos diana" se refieren a un oligonucleótido que se desea detectar. El analito diana para uso en los métodos divulgados puede ser un oligonucleótido aislado, un oligonucleótido inmovilizado en un soporte sólido, o en solución libre. Para la aplicación a los métodos de la presente divulgación, una "diana" puede referirse a cualquier ácido nucleico aislado de una planta, un sujeto animal o humano, un organismo eucariota bacteriano, viral o unicelular, ya sea del organismo completo, un tejido del mismo, o de una célula o células cultivadas.
- 35 El término "plantilla" como se usa aquí se refiere a una cadena polinucleotídica diana, por ejemplo, sin limitación, una cadena de ADN de origen natural no modificada, que utiliza una polimerasa como un medio para reconocer qué nucleótido debe incorporar luego en una cadena creciente para polimerizar el complemento de la cadena de origen natural. Las plantillas pueden ser individuales o de doble cadena. En aplicaciones de la presente divulgación que requieren ciclos repetidos de polimerización, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cadena de plantilla puede modificarse mediante la incorporación de nucleótidos modificados, y aún servir como plantilla para que una polimerasa sintética polinucleótidos adicionales.
- 40 El término "sonda terminadora" como se usa aquí se refiere a un oligonucleótido complementario de una secuencia de nucleótidos ubicada dentro de un amplicón, donde la sonda "terminadora" tiene un extremo 5' modificado resistente a una exonucleasa y un extremo 3' modificado bloqueado a una actividad de polimerasa. La secuencia de la "sonda de terminación" se puede seleccionar o modificar de tal manera que la afinidad de hibridación de la sonda "terminadora" con su secuencia de ácido nucleico complementario sea mayor que las afinidades de hibridación de un oligonucleótido de sonda con una secuencia de ácido nucleico diana y de la sonda oligonucleótido a un oligonucleótido antisonda complementario.
- 45 El término "reacción termocíclica" como se usa aquí se refiere a una reacción de múltiples etapas en donde al menos dos etapas se logran cambiando la temperatura de la reacción.
- 50 El término "polimerasa termoestable" como se usa aquí se refiere a una enzima de ADN o ARN polimerasa que puede soportar temperaturas extremadamente altas, tales como las que se aproximan a 100 °C. Ejemplos de polimerasas termoestables incluyen Taq, Tth, Pfu, Vent y Vent profunda.
- 55

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica de la biología molecular. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento pueden usarse en la práctica de la presente divulgación, los métodos y materiales adecuados se describen en este documento.

5 Abreviaturas

DDS, interruptor de detección de ADN; iDDS, interruptor de detección de ADN interno; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; qPCR, PCR cuantitativa (PCR en tiempo real); LNA, ácido nucleico bloqueado; PNA, ácido nucleico peptídico; FISH, Hibridación Fluorescente In Situ; Tm, temperatura de fusión; ISAM, método de amplificación isotérmica; SNP, polimorfismo de nucleótido sencillo, ZNA, ácido nucleico Zip.

10 Descripción

Los sistemas, composiciones y métodos de sonda de la presente divulgación proporcionan detección sensible y específica de secuencias diana de ADN o ARN, particularmente para evaluar productos de PCR que se amplifican y detectan mediante PCR en tiempo real (qPCR). Varias realizaciones de la presente divulgación facilitan la discriminación de variantes de bases individuales (SNPs de polimorfismos de un solo nucleótido) que distinguen patógenos bacterianos y virales, cánceres y condiciones genéticas, incluyendo variantes o mutantes resistentes a fármacos o sensibles a fármacos que desafían la detección con sistemas de sonda de PCR en tiempo real ordinaria o con sondas de microarreglos basadas en hibridación. Otras realizaciones facilitan la detección de dos aspectos del mismo amplicón, tales como una secuencia de cebador en común y un SNP interno que puede ser una variante, para determinar la frecuencia relativa de tales secuencias variantes en una muestra.

Una aplicación particularmente útil de los sistemas de sonda:antisonda de acuerdo con la presente divulgación son realizaciones particulares que mejoran selectivamente la amplificación y detección de una secuencia diana específica en presencia de una proporción significativamente mayor de una secuencia similar que difiere de la diana por una sola base no coincidente. Por ejemplo, se puede obtener una muestra biológica de un paciente humano o animal que tiene un cáncer, donde la población de células en una muestra de biopsia consiste en un porcentaje mucho mayor de células normales que las células cancerosas. Es importante, por lo tanto, proporcionar una señal detectable correspondiente al pequeño número de células cancerosas al tiempo que se evitan las señales positivas falsas de las células normales. Es importante destacar que, en tales situaciones, la célula cancerosa puede diferir de las células normales por un polimorfismo de nucleótido sencillo. Los sistemas de la presente divulgación, por lo tanto, son ventajosos para amplificar selectivamente y detectar secuencias de nucleótidos diana de la minoría de células que tienen el cambio de base única de interés tal como un SNP asociado al cáncer y no la secuencia normal dominante (tipo silvestre). Los sistemas de la divulgación, por ejemplo, pueden detectar al menos tan poco como 0,2% de una especie diana que contiene un mutante de base única en el medio de aproximadamente el 99,8% de una especie diana no mutante.

La presente divulgación abarca realizaciones de una composición sonda:antisonda, denominada aquí una sonda de Conmutación de Detección de ADN (DDS), que comprende dos oligonucleótidos marcados, un oligonucleótido de sonda y un oligonucleótido antisonda, que son complementarios en secuencia e idénticos en longitud y que, en la ausencia de una secuencia de nucleótidos diana complementaria al oligonucleótido de sonda, interactúa para formar un dúplex. El oligonucleótido de sonda comprende una secuencia complementaria a una secuencia diana que se desea detectar e incluye además una primera unidad estructural de marcador unida a la misma. El oligonucleótido antisonda de los sistemas de la presente divulgación comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a, y típicamente la misma longitud que, el oligonucleótido de sonda, y una segunda unidad estructural de marcador unida a la misma. Se contempla que la secuencia de nucleótidos de la antisonda incluirá al menos una base no coincidente con una base del oligonucleótido de sonda. Se contempla además que, si bien las secuencias de sonda y antisonda que son complementarias también tienen la misma longitud, está dentro del alcance de la divulgación que otras secuencias de nucleótidos puedan unirse bien sea a la sonda o a la antisonda. Estas secuencias unidas, mientras extienden la longitud de la sonda o antisonda, ellas mismas no se hibridan e interactúan con la sonda o antisondas, sino que se seleccionan preferiblemente para complementar, por ejemplo, una región de un amplicón distinto de una secuencia diana del oligonucleótido de sonda.

Los sistemas de la divulgación exhibirán bien sea: (i) un estado de señalización modulado cuando el oligonucleótido de sonda se une a la antisonda y sus componentes de marcaje que interactúan se unen, o (ii) un estado de señalización distinguible de manera detectable cuando el oligonucleótido de sonda se une a una secuencia de nucleótidos diana y los componentes de marcaje están separados.

En las diversas realizaciones de los sistemas de sonda:antisonda de la divulgación, y en particular cuando los sistemas se usan en análisis de PCR en tiempo real, el oligonucleótido de sonda tendrá una primera unidad estructural de marcador en el extremo 5' del mismo, en donde dicha unidad estructural de marcador puede ser, por ejemplo, un donador de fluorescencia (un fluoróforo), y el extremo 3' opuesto está bloqueado para evitar la extensión del oligonucleótido por una 5'-3' polimerasa. En estas realizaciones, la antisonda puede haber unido en el extremo 3' una segunda unidad estructural de marcador que es un compuesto detenedor de fluorescencia. Por consiguiente, como se muestra, por ejemplo, en las Figuras 1, 2, 5 - 7, en estas realizaciones, cuando el oligonucleótido de sonda y el oligonucleótido antisonda están asociados para formar un ácido nucleico dúplex, la primera unidad estructural de marcador, es decir, el fluoróforo y la segunda unidad estructural de marcador, es decir, el compuesto detenedor de

fluorescencia, se ponen en proximidad cercana, después de lo cual se modula la emisión de fluorescencia del fluoróforo, reduciendo o eliminando de ese modo cualquier fluorescencia detectable. En el caso de que la sonda se una preferentemente a una secuencia de nucleótidos diana y no al oligonucleótido antisonda, el compuesto detenedor de fluorescencia y el fluoróforo se separan espacialmente, la emisión de fluorescencia ya no se detiene, y, por lo tanto, es detectable, lo que indica la presencia de la secuencia de nucleótidos diana.

En el caso de una secuencia diana coincidente, el oligonucleótido de sonda se une más firmemente a la secuencia diana en lugar de a la secuencia antisonda, desencadenando una señal detectable y, en el caso de una diana no coincidente de manera incorrecta, la sonda se unirá más firmemente a la antisonda, inhibiendo o previniendo de este modo la formación de dúplex sonda:diana no coincidente y detección de una diana no coincidente incluso cuando las temperaturas de hibridación son subóptimas. La secuencia de sonda puede comprender opcionalmente una base de ayuda no coincidente que está posicionada a aproximadamente 2 bases de distancia de una posición de base variante direccionada deseada que se desea detectar, de tal forma que si la posición de base variante no coincide con la base correspondiente en el oligonucleótido de sonda, se forma una "burbuja de hibridación", como se muestra en la figura 7B, para mejorar la discriminación de una base única, y cualquier extremo 3' no marcado se bloquea opcionalmente para prevenir la extensión de la polimerasa.

En otras realizaciones de este sistema de la divulgación, la primera unidad estructural de marcador del oligonucleótido de sonda puede ser el compuesto detenedor de fluorescencia, y la segunda unidad estructural de marcador del oligonucleótido antisonda puede ser el fluoróforo. Se contempla además que la unidad estructural de marcador puede ser un primer fluoróforo que tras la estimulación emite una fluorescencia que tiene una primera longitud de onda. Cuando los oligonucleótidos de sonda y antisonda están en estrecha proximidad debido a su hibridación entre sí, la fluorescencia emitida de la unidad estructural de marcador puede servir como una radiación de estimulación para la segunda unidad estructural de marcador que también es un fluoróforo (es decir, un sistema basado en FRET). La segunda unidad estructural de marcador estimulada puede emitir fluorescencia a una longitud de onda más larga que la de la primera fluorescencia. Por consiguiente, existe una diferencia entre (i) la longitud de onda de fluorescencia detectada cuando la sonda y la antisonda están asociadas y (ii) la longitud de onda de fluorescencia de la unidad estructural de marcador de la sonda que es detectable solo cuando los oligonucleótidos de sonda y antisonda están disociados, como cuando el oligonucleótido de sonda se compleja con una secuencia de nucleótidos diana.

Con la selección apropiada de la longitud y secuencia del sistema de sonda:antisonda diseñado para un objetivo particular de interés, el sistema incluye un mecanismo inherente de verificación de errores que favorece termodinámicamente uno de los dos estados de unión y detección. El estado uno, que se produce cuando una secuencia de nucleótidos diana está presente que coincide con la secuencia de oligonucleótidos de sonda, es donde el oligonucleótido de sonda se une preferentemente a la secuencia diana complementaria en lugar de al oligonucleótido antisonda, lo que desencadena una detección positiva. El estado dos ocurre cuando no está presente una diana, o una diana que tiene al menos una base no coincidente con la secuencia de oligonucleótidos de sonda, de modo que el oligonucleótido de sonda se une preferentemente al oligonucleótido antisonda, bloqueando o previniendo la detección de una diana no coincidente, incluso bajo hibridación subóptima o temperaturas de fusión por PCR. Ejemplos de tales sistemas de sonda:antisonda de acuerdo con la divulgación han logrado una discriminación de base única a temperaturas de fusión de qPCR de entre aproximadamente 52°C y aproximadamente 62°C, como se muestra, por ejemplo en las Figuras 6-11.

Se descubrió además que tal discriminación se mantuvo, incluso cuando los mismos ensayos se realizaron a temperaturas de fusión mucho más bajas (es decir, por debajo de 50 °C). El mecanismo de unión y bloqueo de antisonda, por lo tanto, proporciona un mecanismo multitemperatura único para prevenir o reducir la probabilidad de obtener resultados positivos falsos. Esta capacidad se produce porque las diferencias en la unión competitiva entre las secuencias de sonda, antisonda y diana crean tres niveles de unión termodinámica: 1) un primer nivel elevado basado en una fuerte unión complementaria entre la sonda y una diana totalmente coincidente; 2) un segundo nivel intermedio basado en la unión más débil entre la sonda y la antisonda que da como resultado al menos una posición de base no coincidente diseñada dentro de la antisonda; y 3) un tercer nivel inferior basado en la unión termodinámica fuertemente reducida que generalmente ocurre entre la sonda y una diana no coincidente (Figura 6). Los sistemas de la divulgación, por lo tanto, comprenden una sonda que se une primero a una diana totalmente coincidente si ta diana está presente y se une de forma secundaria a la antisonda si está presente una diana no correcta. La sonda que se une a una diana incorrecta, por lo tanto, es efectivamente evitada o bloqueada.

Cuando dos secuencias de nucleótidos diana potenciales difieren en dos o más bases, tales diferencias provocarán una gran divergencia en la unión termodinámica entre el oligonucleótido de sonda y la secuencia diana correcta (coincidente) frente al oligonucleótido de sonda y la secuencia diana incorrecta (es decir, no coincidente). En tales casos, casi cualquier no coincidencia insertada en la antisonda dará como resultado una unión sonda a antisonda que es termodinámicamente intermedia entre (a) sonda para unión de la diana coincidente y (b) sonda para unión de la diana no coincidente.

Sin embargo, cuando el objetivo es discriminar una diferencia de base única entre una diana y otra, una secuencia similar y un análisis termodinámico indican que las variantes esperadas no crearían un cambio termodinámico significativo, puede ser necesario modificar adicionalmente el sistema de sonda:antisonda incluyendo una no coincidencia auxiliar en la secuencia de oligonucleótidos de sonda, típicamente dentro de dos bases del sitio variante

de base única que se desea detectar de modo que la sonda que se une a la diana no coincidente abre una "burbuja de hibridación" de múltiples bases que acentúa las diferencias termodinámicas (Figura 7B). Esta modificación de la sonda puede aumentar la discriminación de base única cuando la variante de base no coincidente de interés tiene un efecto limitado sobre la T_m o ΔG . En ocasiones, la variante de base no coincidente solo reducirá la T_m a aproximadamente 5 °C o menos, y el ΔG también podría disminuir solo 2 kcal/mol o menos. Sin embargo, cuando se introduce una no coincidencia de auxiliar, la T_m puede caer al menos aproximadamente 10 °C-15 °C y/o al menos aproximadamente 4 a 5 kcal/mol en ΔG con respecto a la T_m y ΔG característico de unión entre la sonda y el objetivo deseado

Se ha encontrado que se puede esperar una discriminación de base única si: (i) la no coincidencia antisonda con la sonda se coloca donde reducirá la T_m en al menos aproximadamente 5 °C y/o el ΔG en al menos aproximadamente 2 kcal/mol en comparación con la sonda de unión a una diana que coincide correctamente, y (ii) el mutante de base única no coincidente o variante reduce aún más la sonda a la unión de la diana no coincidente al menos aproximadamente 5 °C más en T_m y/o al menos aproximadamente 2 kcal/mol más en ΔG con respecto a la unión de sonda a antisonda. Estos parámetros termodinámicos se logran generalmente seleccionando un sitio no coincidente que se encuentra entre la segunda base de cada extremo y las 2 o 3 bases centrales del oligonucleótido de sonda e insertando una base no coincidente en una posición que de otro modo comprende un A, T o C, en donde una base T típicamente se inserta en un sitio A, una base A típicamente se inserta en un sitio T, o una base T se inserta en un sitio C (produciendo una no coincidencia GT débil). Cuando el sistema de acuerdo con la divulgación se usa como una sonda interna entre cebadores flanqueantes durante un procedimiento de amplificación tal como PCR en tiempo real, cualesquier extremos 3' no modificados de la sonda o antisonda también deben bloquearse para prevenir la extensión de la polimerasa.

La presente divulgación abarca además realizaciones de métodos para fabricar composiciones de sistema de sonda:antisonda para la discriminación de bases sencillas, comprendiendo los métodos las siguientes etapas: (a) obtener (i) un oligonucleótido de sonda complementario a una secuencia de nucleótidos diana deseada, y (ii) un oligonucleótido antisonda que tiene el mismo número de posiciones de nucleótidos que el oligonucleótido de sonda y una secuencia que es complementaria a la sonda excepto por al menos una posición de base no coincidente o deficiente, y donde la sonda y la antisonda tienen cada una, una unidad estructural de marcador unida a la misma, siendo seleccionados las unidades estructurales de marcaje como cooperantes cuando la sonda se une a la antisonda para proporcionar un estado de señalización modulado, es decir negativo o reducido, y cuando la sonda se une a una secuencia de nucleótidos diana proporciona un estado de señalización que indica formación de dúplex sonda:diana; (b) determinar mediante análisis termodinámico las fuerzas de unión de hibridación entre la sonda, la antisonda y las secuencias diana; (c) medir las fuerzas de unión entre la secuencia de sonda y la secuencia diana deseada, la secuencia de sonda y la secuencia antisonda, y la secuencia de sonda y una secuencia diana no coincidente, en donde las fuerzas de unión se definen como ΔG y/o T_m ; (d) determinar si las fuerzas de unión de sonda a antisonda son más bajas que las fuerzas de unión de sonda a diana coincidente, en donde una diferencia de al menos aproximadamente 2 kcal/mol en niveles de ΔG y/o al menos aproximadamente 5°C en niveles de T_m indica que la sonda se unirá preferentemente a la secuencia diana coincidente y no a la antisonda; (e) determinar si la sonda a las fuerzas de unión diana no coincidentes son inferiores que las fuerzas de unión de sonda a antisonda, una diferencia de al menos aproximadamente 2 kcal/mol en niveles de ΔG y/o al menos aproximadamente 5°C en niveles de T_m lo que indica que la sonda se unirá preferentemente a la antisonda y no a la diana no coincidente; (f) determinar si las diferencias en las fuerzas de unión entre la sonda y la diana coincidente versus la sonda y la antisonda versus la sonda y la diana no coincidente comprenden niveles descendentes de unión termodinámica por lo que la sonda se unirá a una diana correcta, si está disponible, y secundariamente a la antisonda, con lo que se evitaría o prevendría la unión de la sonda a una diana no coincidente incorrecta; (g) modificar opcionalmente la antisonda en una o más posiciones de base para disminuir o aumentar las fuerzas de unión entre los oligonucleótidos de sonda y antisonda; (h) opcionalmente modificar la sonda en una o más posiciones de base y dentro de aproximadamente 2 posiciones de base de una posición de base que corresponde a un polimorfismo de base única de la secuencia diana proporcionando así una "burbuja de hibridación" cuando la sonda hibrida con una región de la secuencia diana que tiene una variante de SNP y de ese modo disminuye las fuerzas de unión entre el oligonucleótido de la sonda y la diana no coincidente; (i) evaluar la composición de sonda:antisonda probando con una secuencia diana que tiene un SNP dentro de la región complementaria al oligonucleótido de sonda y con una diana que no tiene el SNP; y (j) repetir las etapas (c)-(i), obteniendo de ese modo un sistema de sonda:antisonda que identifica una secuencia de nucleótidos diana de una secuencia similar que tiene al menos una diferencia de nucleótidos.

Realizaciones de los sistemas de sonda:antisonda de la divulgación pueden incluir oligonucleótidos de sonda o antisonda modificados por tener con uno o más componentes que pueden aumentar la especificidad de la sonda con su secuencia diana correspondiente aumentando la unión complementaria, tal como, pero no limitado a, nucleótidos diferentes de adenosina, citosina, guanina y timidina, diversos nucleótidos no naturales, que incluyen, pero no se limitan a, LNA (ácido nucleico bloqueado) o PNA (ácido nucleico peptídico) o BNA (ácido nucleico puenteado) y/o las modificaciones estructurales MGB (aglutinante de surco menor), ZNA (ácido nucleico Zip) y similares.

Esta modificación de la sonda puede aumentar la discriminación de base única cuando la variante de base no coincidente de interés tiene un efecto limitado sobre la T_m o ΔG . En ocasiones, la variante básica no coincidente solo reducirá la T_m a aproximadamente 5 °C o menos, y el ΔG también podría disminuir solo 2 kcal/mol o menos. Sin embargo, con la base no coincidente introducida y la "burbuja de hibridación", la T_m puede descender

aproximadamente 10 °C-15 °C y/o 4 a 5 kcal/mol en ΔG con respecto a la T_m y ΔG característica de la unión entre la sonda y la diana deseada.

Los sistemas de sonda:antisonda de la divulgación pueden incluir además una posición de base no coincidente en la sonda o antisona seleccionada de una base natural no complementaria, una base universal, una base artificial, una base extra no coincidente, una base faltante, un sitio abásico, un espaciador, un enlazante o cualquier medio estructural que pueda disminuir la unión complementaria entre el oligonucleótido de sonda y el oligonucleótido antisona, o entre el oligonucleótido de sonda y la secuencia diana deseada.

Para potenciar la señalización o detención, las realizaciones de los sistemas de sonda:antisonda pueden incluir además oligonucleótidos de sonda y/o oligonucleótidos antisona que están marcados en ambos extremos, en donde una sonda puede comprender un emisor de fluorescencia y un modulador de fluorescencia, y una antisona puede comprender un modulador de fluorescencia y opcionalmente un emisor de fluorescencia, o alternativamente, una sonda puede comprender dos emisores de fluorescencia y una antisona puede comprender dos moduladores de fluorescencia. Si el oligonucleótido de sonda comprende un emisor fluorescente en 3', ese extremo puede modificarse opcionalmente con un espaciador entre el oligonucleótido de sonda y el fluoróforo en 3'.

Las realizaciones de la presente divulgación abarcan además sistemas que incorporan el sistema de sonda:antisonda en ensayos de PCR en tiempo real. Estas realizaciones incluyen, pero no están necesariamente limitadas a:

1. Sondas iDDS: para qPCR como se ilustra en la Figura 1B, en donde el oligonucleótido de sonda se selecciona para que sea complementario con una secuencia diana que se encuentra entre dos cebadores de PCR de flanco; y en donde se bloquea cualquier extremo 3' no marcado del oligonucleótido de sonda o antisona para evitar la extensión de la polimerasa a partir del mismo. Las sondas iDDS son especialmente adecuadas para detectar una secuencia de nucleótidos diana deseada en presencia de secuencias relacionadas que difieren de la secuencia deseada por un polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP).

2. La composición de sonda:antisonda también puede comprender componentes marcados de sonda y antisona que están unidos terminalmente para comprender una molécula, en donde el componente antisona comprende una secuencia que es deficiente en la unión complementaria al componente de sonda, en comparación con la afinidad de la sonda por una secuencia de nucleótidos diana.

3. Sondas ZIPR: Para usar en qPCR como se ilustra en la figura 1C, la sonda marcada, denominada aquí "sonda ZIPR", comprende un oligonucleótido de sonda que comprende una secuencia de cebador y que de ese modo permite la amplificación y detección simultánea de un segmento diana en el extremo terminal de un producto amplificado por PCR en lugar de en una secuencia interna localizada entre los sitios de cebador de PCR, en donde el extremo 3' del oligonucleótido de la sonda ZIPR no está bloqueado para evitar la extensión de la polimerasa. El oligonucleótido antisona emparejado también sirve para disminuir la detección de dianas falsas. Se pueden usar dos de tales cebador-sonda en los extremos opuestos de una diana que se desea amplificar, donde ambos pueden comprender el mismo marcaje para proporcionar una doble señalización. Alternativamente, cada uno de ellos puede marcarse de manera diferente para proporcionar una señalización de dos colores.

4. Sondas FLIP: para su uso en detección en tiempo real de alta especificidad o detección de punto final de dianas amplificadas, como se ilustra en la Figura 2A, el componente antisona del sistema de sonda:antisonda puede comprender un segmento marcado conjugado al extremo 5' de un oligonucleótido cebador mediante un conector abásico tal como un espaciador. Esta modificación de las estructuras de sonda:antisonda altera la cinética del cebador de modo que la señalización detectada muestra curvas de amplificación lineal frente a curvas de amplificación **sigmoideas** normales para que la detección y la evaluación cuantitativa de una muestra puedan realizarse con precisión tanto en el punto final como en monitorización en tiempo real durante la amplificación, como se muestra, por ejemplo, en la Figura 13A. Las secuencias de sonda y antisona también pueden ser completamente complementarias, sin una no coincidencia, excepto que la sonda se fabrica un poco más larga que la secuencia antisona, en una o más bases. Las curvas de amplificación lineal producidas por esta composición de sonda:antisonda son comparables a las curvas lineales producidas por LATE PCR. En LATE-PCR, sin embargo, la amplificación lineal se consigue proporcionando cebadores con concentraciones desiguales con un cebador muy limitado en cantidad que da como resultado una amplificación asimétrica (Sanchez et al. (2004) 101: 1933-1938; Wangh et al., Patente US No. 7.632.642).

5. Sondas G-Force: para su uso en PCR en tiempo real, como se ilustra en la Figura 2C, es un oligonucleótido de cebador-sonda, denominado sonda "G-Force", que tiene tres segmentos: un segmento de sonda marcada, un segmento antisona que puede plegarse junto con el segmento de sonda y un segmento de cebador específico de la diana en el extremo 3'. El segmento de sonda se marca en 5' con un fluoróforo e incluye una secuencia rica en C de aproximadamente 6 a aproximadamente 9 bases. El segmento antisona es rico en G y complementario al segmento rico en C y comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 bases. Cuando estos segmentos se pliegan e hibridan juntos debido a sus secuencias complementarias, las guaninas en el segmento antisona sirven como un detenedor para absorber las emisiones fluorescentes de la sonda. Los segmentos de sonda y antisona están unidos por un conector abásico tal como un espaciador que facilita el plegado y la unión de estos segmentos juntos y que evita la copia del segmento de sonda cuando el cebador-sonda se incorpora en un amplicón. El conector abásico puede estar flanqueado por una o más bases A o T para facilitar el plegado y la unión de sonda a antisona.

5 Esta sistema de sonda:antisonda G-Force exhibe dos estados estructurales y de señalización: (i) una estructura plegada y un estado de señalización que ocurre cuando el cebador-sonda no está asociada con otro ácido nucleico hibridado, donde el segmento rico en citidina se pliega y se une al segmento rico en guanina, llevando el marcador emisor de fluorescencia al lado de guaninas que absorben fluorescencia, y (ii) una segunda estructura y estado de señalización cuando el cebador-sonda se incorpora a una diana amplificada, con lo que la unidad de señalización se despliega y las emisiones fluorescentes son liberadas. Sin embargo, después del primer ciclo de amplificación, la plantilla diana se extiende permanentemente con una secuencia complementaria al segmento antisonda rico en guanina, facilitando así la unión de sonda y la señalización en ciclos de amplificación subsecuentes. Las dianas amplificadas se marcan de ese modo y se detectan cuantitativamente con un fluoróforo por amplicón. Se puede usar un cebador-sonda similar con el mismo o diferente marcado en el otro extremo del amplicón para proporcionar señalización doble o señalización de dos colores.

15 En una realización preferida de este sistema, el cebador-sonda de G-Force tiene una estructura de sonda:antisonda 5'-3' que comprende FAM-CCCCTCCA-espaciador₁₈-AGGAGGGGG más el cebador 3'. Debido a la G extra en el segmento antisonda, cuando el segmento de sonda rico en C se une al segmento antisonda rico en G, el fluoróforo estará en la vecindad de al menos dos bases G. Alternativamente, la sonda puede tener secuencias complementarias que contienen aproximadamente dos o más C cerca del extremo 5' del segmento de sonda y aproximadamente dos o más G cerca del extremo 3' del segmento antisonda.

20 6. Sondas DDS dobles: se contempla que se pueden usar dos sistemas de sonda DDS de acuerdo con la presente divulgación simultáneamente para detectar diferentes partes de la misma diana amplificada, como se muestra esquemáticamente en las Figuras 2B y 2C. Tal sistema puede comprender un cebador-sonda marcado tal como, pero no limitado a, una sonda ZIPR, una sonda G-Force, una sonda FLIP, y similares, para detectar y cuantificar dianas amplificadas, y combinarse con una sonda iDDS interna que está marcada de manera diferente, para detectar y cuantificar aquellas dianas amplificadas que tienen una secuencia interna específica, tal como una variación de SNP.

25 Se contempla adicionalmente que las realizaciones de la divulgación pueden incorporar una pluralidad de sistemas de sonda:antisonda de acuerdo con la divulgación que pueden detectar selectivamente una pluralidad de secuencias diana, en donde una señal positiva con la primera sonda en relación con una señal negativa o débil de la segunda sonda confirma la presencia de una secuencia variante o mutante que comprende la primera secuencia diana.

30 Una sonda interna adecuada para uso en esta realización puede comprender un sistema de sonda iDDS: antisonda. Un cebador-sonda útil, pero no limitante, puede ser el cebador-sonda de G-Force, donde el cebador-sonda cuantifica las dianas amplificadas y la composición de sonda:antisonda interna cuantifica la frecuencia de una secuencia diana interna específica. El uso de ambas sondas permite la medición de la frecuencia relativa de la secuencia variante de interés. En la PCR en tiempo real, el cebador-sonda puede exhibir una curva alta y la sonda interna exhibirá una curva con un ángulo inferior proporcional a la frecuencia mutante o variante, como se muestra, por ejemplo, en las Figuras 16A y 16B.

35 Un problema común en el diagnóstico molecular es la aparición de diversas, pequeñas mutaciones estrechamente relacionadas que pueden tener un efecto similar en la estructura y la función de un producto génico o en la expresión génica. Por ejemplo, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de pulmón pueden determinarse mediante el análisis de unos pocos biomarcadores mutacionales en el gen del EGFR o el gen de KRAS. Sin embargo, aunque algunos de estos mutantes importantes específicos de enfermedad pueden comprender una sustitución de base única, tal como la mutación L858R 2573T> G de EGFR Exon 21, otros biomarcadores de cáncer son más variables aunque están confinados a una región de secuencia pequeña. Clínicamente, saber qué eliminación específica o qué sustitución de base no es tan importante ya que los resultados clínicos de una cualquiera de una serie de tales mutaciones son efectivamente los mismos. Si bien la secuenciación se puede realizar para determinar si está presente alguna de estas mutaciones estrechamente relacionadas, la secuenciación no es efectiva cuando la frecuencia del mutante es inferior a aproximadamente 10 por ciento. Una forma de superar este problema es emplear dos sondas dirigidas a la misma plantilla, una detectando la secuencia silvestre si está presente y la otra no específica y detectando cualquier secuencia silvestre o mutante, con lo que las diferencias en la señalización pueden indicar la presencia de una variante mutante sin especificar qué variante mutante está presente. Esta estrategia de dos sondas se puede aplicar con una sonda iDDS o un cebador-sonda específica para el tipo silvestre, y un cebador-sonda no específico que detecta cualquier variante en la misma región diana.

45 7. Sondas iDDS y Terminadora: otro aspecto de la divulgación es que el sistema de sonda:antisonda puede adaptarse adecuadamente para un sistema de mejora de objetivo de dos sondas adecuado para PCR en tiempo real u otros métodos de amplificación-detección para amplificar y detectar selectivamente una primera secuencia de nucleótidos diana que difiere en una o más bases de una segunda secuencia de nucleótidos diana estrechamente relacionada. En general, la primera secuencia diana es una variante mutante de interés y la segunda secuencia diana puede ser la secuencia de tipo silvestre ("normal"). Este sistema de dos sondas incluye un primer sistema de sonda:antisonda interna marcada tal como una sonda iDDS y una segunda sonda "Terminadora" interna sin marcar (denominada "Terminadora silvestre" si es específica para una variante de secuencia de nucleótidos de tipo silvestre) que tiene una función de bloqueo de PCR polimerasa, como se muestra en las Figuras 3A y 3B.

La primera sonda incluye una primera secuencia diana, o el complemento de la misma, y tiene al menos una posición de base que solo coincide con la primera secuencia diana, pero no con la segunda secuencia diana. La sonda de terminación comprende la segunda secuencia diana, o el complemento de la misma, e incluye al menos una posición de base encontrada en la segunda secuencia diana pero no en la primera secuencia diana. La sonda de terminación se modifica adicionalmente en el extremo 5' para inhibir o prevenir la digestión con 5' nucleasa de la misma, y se modifica en el extremo 3' para inhibir o prevenir la extensión de la polimerasa 3' a partir de la misma.

La longitud y/o posición de la sonda de terminación se puede seleccionar de tal manera que la afinidad de la sonda de terminación y la segunda secuencia diana sea sustancialmente mayor que la afinidad de la primera sonda y la primera secuencia diana. Preferiblemente, la afinidad de la primera sonda y la sonda de terminación para la segunda secuencia de nucleótidos diana puede diferir en al menos aproximadamente 6°C en T_m y/o al menos aproximadamente 4 o más kcal/mol en ΔG . Además, la sonda de terminación puede modificarse opcionalmente para mejorar adicionalmente la unión a su secuencia diana coincidente utilizando uno o más nucleótidos artificiales tales como un LNA, una modificación química tal como ZNA o MGB, o una combinación de los mismos.

Como consecuencia de las diferencias termodinámicas entre las dos sondas, la sonda de terminación se unirá más fuertemente a la segunda secuencia diana, e inhibirá o impedirá la amplificación de la segunda secuencia diana. También inhibirá o impedirá la unión de la primera sonda a la segunda secuencia diana. Por lo tanto, este sistema amplificará y/o detectará selectivamente la primera secuencia diana, proporcionando así un sistema de mejora objetivo útil para detectar mutantes o variantes poco frecuentes o de baja frecuencia, tales como en diagnósticos de cáncer, resistencia a fármacos o exploración genética prenatal.

La sonda de terminación se puede modificar en el extremo 5' mediante la unión de una molécula tal como biotina, ZNA, MGB, BHQ y similares, incorporación de bases de ARN 2'-O-Metilo, unión de un tramo de bases no complementarias seleccionadas de manera aleatoria. La sonda de terminación puede modificarse en el extremo 3' mediante la unión de una molécula bloqueante (por ejemplo, un fosfato, un espaciador, un grupo amino y similares), o una cadena de bases no complementarias seleccionadas de manera aleatoria.

Por consiguiente, el sistema de mejora de objetivo de dos sondas de la divulgación puede usarse en un método para amplificar y detectar selectivamente una primera secuencia diana que difiere en una o más bases de una segunda secuencia diana, incluso si la cantidad de la segunda secuencia diana es significativamente mayor que el de la primera secuencia diana. Las realizaciones de este método, por lo tanto, pueden comprender las siguientes etapas: (a) obtener un sistema de sonda:antisonda de detección, una sonda de terminación no marcada, y un par de cebadores flanqueantes; en donde: el sistema de sonda: antisonda de detección comprende un sistema de sonda:antisonda marcado donde la sonda marcada incluye una primera secuencia de nucleótidos diana o el complemento de la misma; la sonda de terminación caracterizada por: (i) incluir la segunda secuencia de nucleótidos diana o el complemento de la misma, en donde la afinidad de unión de la sonda de terminación por la segunda secuencia diana es mayor que la afinidad de unión de la sonda marcada por la primera secuencia diana, (ii) tener un extremo 5' modificado para inhibir o prevenir la digestión con 5' nucleasas, (iii) tener un extremo 3' modificado para inhibir o prevenir la extensión de la 3' polimerasa, y (iv) tener una longitud mayor que la de la sonda marcada, y opcionalmente incluye modificaciones internas o terminales para mejorar la unión tal como un LNA o BNA, un ZNA o un MGB; (b) obtener una muestra biológica sospechosa de comprender la primera o la segunda secuencia diana, o una mezcla de las mismas; (c) preamplificar la primera secuencia diana mientras bloquea la amplificación de la segunda secuencia diana con la sonda de terminación; en donde esta etapa comprende opcionalmente entre aproximadamente 30 y aproximadamente 75 ciclos de PCR con fusiónamiento a baja temperatura a aproximadamente 48°C a aproximadamente 57°C y en donde cada etapa de desnaturalización, fusiónamiento o extensión está limitada a aproximadamente 5 segundos o menos; (d) combinar una alícuota, o una alícuota diluida de la muestra preamplificada, con el par de cebadores flanqueantes, y el sistema de sonda:antisonda, siendo dicha alícuota aproximadamente 5 por ciento o menos de la reacción de amplificación, y una alícuota diluida es una dilución de la alícuota de al menos 1:100 y típicamente en el rango de aproximadamente 1:300 a aproximadamente 1:1000; y (e) amplificar y detectar la presencia de la primera secuencia diana mediante PCR en tiempo real u otros medios.

El sistema de mejora de objetivo de dos sondas de la divulgación proporciona análisis de PCR en tiempo real de muestras sospechosas de contener una baja frecuencia de una primera secuencia diana (típicamente, pero sin limitación, la secuencia mutante de interés) mezclada con una frecuencia relativamente alta de la segunda secuencia diana (tal como, pero no limitada a, una secuencia de tipo silvestre). Dado que ambas plantillas diana son amplificadas por los mismos cebadores, los componentes de reacción de PCR (cebadores, enzimas, etc.) se agotarán para la plantilla más abundante, en la medida en que la amplificación y detección de la primera secuencia diana se inhibirán o prevendrán. Se ha encontrado, por ejemplo, que se detectaron efectivamente mutantes de baja frecuencia en el rango de aproximadamente 2 por ciento a aproximadamente 0,002 por ciento del contenido de mutante. Además, se contempla que este método será útil para seleccionar mutantes o variantes de baja frecuencia en sangre u otros tejidos alejados de la fuente.

El método puede modificarse adicionalmente proporcionando otra composición de sonda:antisonda específica para la segunda secuencia diana en la etapa (e) anterior para confirmar la inhibición o bloqueo de la segunda secuencia diana. Este método modificado puede producir dos curvas de amplificación: una primera curva que indica la presencia mejorada de la primera secuencia diana (típicamente positiva e indicando el mutante de interés) y una segunda curva

que indica la presencia disminuida de la segunda secuencia diana (típicamente negativa que indica la secuencia de interés silvestre o normal).

5 8. Sondas de cebador DDS y sondas Terminadoras: el sistema de mejora de objetivo de dos sondas de la divulgación puede modificarse adicionalmente reemplazando un cebador de PCR con una composición cebador-sonda que puede
10 amplificar y detectar no específicamente al menos parte de la región de secuencia direccionada por la sonda de terminación. Para lograr este fin, el cebador-sonda comprende una secuencia de cebador que precede a la totalidad o parte de la región objetivo de la sonda de terminación. Dado que el cebador-sonda puede amplificar cualquier secuencia silvestre o mutante dentro de esa región, incluidas las sustituciones, supresiones o inserciones de bases, y si la secuencia silvestre ha sido bloqueada específicamente por la sonda de terminación, entonces una señal positiva con el cebador-sonda indica que una secuencia mutante está presente en esa región diana. Por lo tanto, un sistema de ensayo puede detectar múltiples variantes de secuencia de interés, y no se requieren múltiples ensayos específicos de secuencia. Con este sistema, el cebador-sonda puede ser la sonda ZIPR, la sonda G-Force, la sonda Half-Universal, la sonda Universal, una sonda SUNRISE.RTM o cualquier otro cebador-sonda adecuado para la detección de PCR en tiempo real. Este sistema se puede usar con un procedimiento de dos etapas o de una etapa, como se muestra en las Figuras 3A y 3B.

Para confirmar la detección de mutantes no específicos, puede usarse una segunda composición de sonda: antisonda que comprende la segunda secuencia diana o su complemento. Con esta modificación, una señal negativa o disminuida con la segunda sonda: antisonda y una señal positiva con el cebador-sonda pueden confirmar la presencia de una secuencia variante o mutante en la muestra.

20 Cualquiera de las sondas de los sistemas de sonda: antisonda de la divulgación se pueden anclar a un sustrato, preferiblemente mediante un enlazador covalente, usando métodos bien conocidos en la técnica, y el antisonda se aplica en solución junto con las dianas no marcadas. La discriminación de una base única se puede lograr con dianas múltiples cuando se usa una temperatura de hibridación común, aunque cada sonda se puede haber optimizado para temperaturas de hibridación algo diferentes. Esta característica tolerante a la temperatura permite un diseño más fácil y un rendimiento más confiable cuando se detectan múltiples dianas de alta especificidad, tales como los SNP o los mutantes de una base única.

25 9. Sondas DDS y Método de Amplificación Isotérmica (ISAM): la presente divulgación proporciona además un método de amplificación isotérmica (ISAM) que incorpora el sistema de sonda: antisonda divulgado aquí para amplificar exponencialmente una diana de ADN o ARN y detectar los productos en tiempo real o en el punto final, comprendiendo el método las etapas: (a) obtener una muestra que contiene una secuencia diana de ARN o ADN; (b) añadir a dicha muestra (i) un par de oligonucleótidos cebadores que pueden amplificar una secuencia diana isotérmicamente, en donde un cebador o ambos cebadores incluyen una secuencia promotora de ARN polimerasa, (ii) un oligonucleótido cebador-sonda que comprende una primera secuencia de cebador, y una antisonda coincidente u, opcionalmente un cebador-sonda de dos segmentos que incluye una secuencia promotora de ARN polimerasa y la primera secuencia de cebador, y una antisonda complementaria a la secuencia promotora de ARN polimerasa, (iii) un cebador modificado que comprende una secuencia promotora de ARN polimerasa y una segunda secuencia de cebador u, opcionalmente, un cebador-sonda de dos segmentos que comprende una secuencia promotora de ARN polimerasa y una segunda secuencia cebadora, y una antisonda complementaria a la secuencia promotora de ARN polimerasa, y (iv) una mezcla de reacción que comprende un regulador de reacción un promotor de ARN polimerasa, una transcriptasa reversa y RNasa H; (c) amplificar la secuencia diana bajo condiciones isotérmicas o casi isotérmicas, comprendiendo dichas condiciones una temperatura única en el rango de aproximadamente 35°C a aproximadamente 50°C, opcionalmente en el rango de aproximadamente 40°C a aproximadamente 42°C, o que comprende dos temperaturas alternas, cada una de dichas temperaturas en el rango de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 50 °C, opcionalmente alternando entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 45 °C; y (d) determinar la señalización fluorescente periódicamente durante la amplificación o en un punto final definido para determinar la presencia y la frecuencia de la secuencia diana amplificada.

Con las composiciones de sonda: antisonda anteriores y método de amplificación, una secuencia diana de ARN puede amplificarse directamente para generar un producto de ADN amplificado que se une con una secuencia promotora de ARN polimerasa en uno o ambos extremos y un marcador donador fluorescente en uno o ambos extremos. Un producto diana de ADN puede amplificarse, modificarse y marcarse de manera similar. Con este método, la amplificación exponencial máxima puede ocurrir rápidamente en aproximadamente 20 a 30 minutos, una tasa que es más rápida que la PCR típica o los métodos de PCR en tiempo real donde cada etapa está limitada por las condiciones de ciclización utilizadas. (Figura 4A, 18). Aunque la amplificación de ISAM puede ser difícil de lograr con algunas condiciones de secuencia, la amplificación diana de ISAM es más robusta (produciendo 20 a 50% más de producto) cuando ambos cebadores se unen con una secuencia promotora de ARN polimerasa.

55 En otra realización de este método de la divulgación, los componentes de sonda: antisonda se pueden dirigir a una secuencia interna entre los sitios de cebador. En esta realización, la sonda puede comprender el primer componente de marcaje de un par donador-aceptor fluorescente y una secuencia interna de las secuencias de cebador. La antisonda puede comprender el segundo componente de marcaje del par donador-aceptor fluorescente, y una secuencia que es parcialmente deficiente en la unión complementaria a la sonda. (Figura 4B, 19). La antisonda puede comprender además múltiples posiciones de bases que no coinciden o que carecen de unión complementaria a la sonda. Esta secuencia antisonda modificada estructuralmente se requiere para las condiciones de amplificación isotérmica a baja temperatura.

En otra realización de las composiciones de sonda:antisonda anteriores, acopladas con el método de amplificación isotérmica ISAM, el extremo 5' de un cebador o cebador-sonda se puede anclar a un sustrato de arreglo, óptimamente mediante un enlazador covalente, y las dianas de ARN o ADN se amplifican isotérmicamente mientras se unen al sustrato del chip. (Figura 4C, 20) Con este método se pueden detectar múltiples dianas a medida que se amplifican en tiempo real o en el punto final y no se requiere etapa de lavado para eliminar las sondas marcadas no unidas.

Un aspecto de la divulgación, por lo tanto, abarca realizaciones de un sistema para detectar selectivamente una secuencia de nucleótidos diana, comprendiendo dicho sistema al menos un sistema de sonda:antisonda que comprende: (a) un oligonucleótido de sonda que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una primera secuencia de nucleótidos diana y una primera unidad estructural de marcador unida al mismo; y (b) un oligonucleótido antisonda que comprende una secuencia de nucleótidos completamente complementaria al oligonucleótido de sonda excepto por al menos una base no coincidente en una posición no terminal, y una segunda unidad estructural de marcador, donde la segunda unidad estructural de marcador está unida al oligonucleótido antisonda o es una región del oligonucleótido antisonda, donde: (i) el oligonucleótido de sonda está configurado para una mayor afinidad de hibridación para la primera secuencia de nucleótidos diana que para el oligonucleótido antisonda; y el oligonucleótido antisonda está configurado para una mayor afinidad de hibridación para el oligonucleótido de sonda que para la segunda secuencia de nucleótidos diana de interés; (ii) en presencia de la primera secuencia de nucleótidos diana, el oligonucleótido de sonda y la primera secuencia de nucleótidos diana forman un dúplex, con lo que las primera y segunda unidades estructurales de marcador no interactúan, proporcionando de ese modo una primera señal detectable; (iii) en ausencia de la primera secuencia de nucleótidos diana, el oligonucleótido de sonda y el oligonucleótido antisonda forman un dúplex, permitiendo así que las primera y segunda unidades estructurales de marcador interactúen para proporcionar una señal detectable modulada, en donde la primera y las señales detectables moduladas son distinguibles; y (iv) en presencia de una segunda secuencia de nucleótidos diana que difiere de la primera secuencia diana por al menos una no coincidencia de bases, el oligonucleótido de sonda y el oligonucleótido antisonda forman preferentemente un dúplex, inhibiendo de esta manera que el oligonucleótido de sonda forme un dúplex con la segunda secuencia de nucleótidos diana.

En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el dúplex del oligonucleótido de sonda y la primera secuencia de nucleótidos diana, y el dúplex del oligonucleótido de sonda y el oligonucleótido antisonda difieren en al menos aproximadamente 2 kcal/mol en ΔG y al menos aproximadamente 4 °C en T_m ; y en donde el dúplex del oligonucleótido de sonda y la segunda secuencia de nucleótidos diana, y el dúplex del oligonucleótido de sonda y la primera secuencia de nucleótidos diana difieren en al menos aproximadamente 4 kcal/mol en ΔG y al menos aproximadamente 8°C en T_m .

En realizaciones de este aspecto de la divulgación, la secuencia de oligonucleótidos de sonda puede configurarse con una posición de base no coincidente aproximadamente a dos bases de distancia de una no coincidencia esperada entre la segunda secuencia de nucleótidos diana y la secuencia de la sonda; por lo que las dos bases no coincidentes generan una región interna no hibridada de dos o tres bases del dúplex de oligonucleótido de sonda:segunda secuencia de nucleótidos diana, teniendo el dúplex un ΔG y T_m menor que el ΔG y la T_m del dúplex oligonucleótido de sonda:oligonucleotídico antisonda.

En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el oligonucleótido de sonda puede unirse a un sustrato sólido.

En realizaciones de este aspecto de la divulgación, una unidad estructural de marcador puede ser un emisor de fluorescencia, y la otra unidad estructural de marcador puede comprender un modulador de fluorescencia seleccionado del grupo que consiste en: un compuesto detenedor, un compuesto fluorescente, una partícula metálica y un conjugado rico en guanina.

En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el oligonucleótido de sonda puede comprender un emisor de fluorescencia y un modulador de fluorescencia o un segundo emisor fluorescente, y en donde el oligonucleótido antisonda comprende un modulador de fluorescencia y opcionalmente comprende un emisor de fluorescencia o un segundo modulador de fluorescencia.

En realizaciones de este aspecto de la divulgación, al menos uno de los oligonucleótidos de sonda y el oligonucleótido antisonda puede comprender al menos uno de: un nucleótido no natural, un aglutinante de surco menor (MGB) y un ácido nucleico de Zip (ZNA).

En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el sistema puede ser una sonda de IDSD en donde el extremo 3' del oligonucleótido de la sonda, y opcionalmente el oligonucleótido antisonda, puede bloquearse para prevenir la extensión de la polimerasa; y donde el sistema puede comprender además un par de cebadores flanqueantes configurados para amplificar una región de ácido nucleico que comprende la primera secuencia de nucleótidos diana.

En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el sistema puede ser una sonda Flip, en donde el oligonucleótido antisonda puede comprender además, en el extremo 3' del mismo, un primer oligonucleótido cebador y el sistema puede comprender además un segundo oligonucleótido cebador, donde el primer oligonucleótido cebador y los segundos oligonucleótidos cebadores pueden configurarse para amplificar una región de ácido nucleico que comprende la primera secuencia de nucleótidos diana.

En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el oligonucleótido antisonda y el primer oligonucleótido cebador se pueden enlazar mediante una región espaciadora abásica.

5 En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el sistema puede ser una sonda ZIPR que comprende un sistema de detección de amplicón de cebador-sonda, donde el oligonucleótido de sonda comprende una secuencia de cebador y está configurado para cooperar con un oligonucleótido cebador para amplificar una secuencia de nucleótidos diana, con lo cual se genera una señal detectable cuando el oligonucleótido de sonda se incorpora en un amplicón.

10 En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el sistema puede comprender adicionalmente un segundo oligonucleótido de sonda, en donde dichos primero y segundo oligonucleótidos de sonda hibridan selectivamente con diferentes secuencias de nucleótidos diana de una plantilla de ácido nucleico; y donde cada uno de los dos oligonucleótidos de sonda puede tener una unidad estructural de marcador unido al mismo, y en donde las unidades estructurales de marcador proporcionan dos señales detectables diferentes o la misma señal detectable.

15 En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el primer oligonucleótido de sonda puede comprender un cebador-sonda que está configurado para cooperar con un oligonucleótido cebador para amplificar un primer amplicón con un primer marcador, proporcionando así una señal relativa a la frecuencia de amplicón, y en donde el segundo oligonucleótido de sonda es un segundo cebador-sonda o una sonda interna que puede comprender un segundo marcador y una secuencia complementaria a una secuencia diana; en donde la secuencia diana puede comprender un segmento de secuencia variable del primer amplicón, o una secuencia variable en otro lugar en una plantilla de ácido nucleico; con lo que la diferencia en la señalización entre el primer cebador-sonda y la segunda sonda proporciona un indicador de la frecuencia de la secuencia de variante con respecto a la frecuencia del primer amplicón.

20 En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el al menos un sistema de sonda se puede seleccionar del grupo que consiste en: un cebador-sonda de ZIPR, una sonda de IDS interna o una sonda Flip interna.

25 En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el sistema cebador-sonda comprende alternativamente un cebador-sonda G-Force que comprende: (i) un segmento de sonda marcado fluorescente en 5' que comprende una secuencia rica en citosina de aproximadamente 7 a 9 bases, (ii) un espaciador abásico, (iii) una secuencia antisonda rica en guanina complementaria a la región de secuencia rica en citosina, y (iv) una secuencia de cebador; con lo cual, cuando se incorpora el oligonucleótido cebador-sonda marcado en los amplicones generados, se habilita una señal detectable.

30 En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el sistema comprende además un sistema de amplificación isotérmica ISAM adecuado para amplificar y detectar una secuencia diana de ARN o ADN, en donde el oligonucleótido cebador-sonda está configurado para cooperar con un cebador flanqueante para amplificar la secuencia diana; en donde el cebador flanqueante comprende además una secuencia promotora de ARN polimerasa 5'; y en donde el sistema de amplificación-detección comprende además una enzima promotora de ARN polimerasa, una enzima transcriptasa reversa y una enzima RNasaH; en donde el oligonucleótido cebador-sonda comprende opcionalmente una secuencia promotora de ARN polimerasa 5'; y en donde un oligonucleótido antisonda comprende opcionalmente una secuencia complementaria a la secuencia promotora de ARN polimerasa; y en donde dichos oligonucleótidos de cebador-sonda están configurados para comprender uno o ambos cebadores; con lo que la señalización y la transcripción del ARN se proporcionan desde uno o ambos extremos del amplicón; y opcionalmente, se fija un cebador a un sustrato sólido.

40 En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el sistema comprende además un sistema de amplificación isotérmica ISAM adecuado para amplificar y detectar una secuencia diana de ARN o ADN, en donde el oligonucleótido de sonda IDS es complementario de una secuencia diana interna que comprende aproximadamente 20 a aproximadamente 25 nucleótidos en longitud; y en donde el oligonucleótido antisonda comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 nucleótidos de longitud; y en donde uno o dos de los cebadores flanqueantes comprende además una secuencia promotora de ARN polimerasa 5'; y un sistema de amplificación-detección que comprende una enzima promotora de ARN polimerasa, una enzima transcriptasa reversa y una enzima RNasaH; y opcionalmente, se fija un cebador a un sustrato sólido.

En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el sistema está configurado para detectar una posición de base de nucleótido variable del exón 21 del gen EGFR, comprendiendo dicho sistema los oligonucleótidos SEQ ID NOs.: 7-12 y 39-41.

50 En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el sistema está configurado para detectar una eliminación variable de múltiples bases dentro de los codones 746 a 753 del exón 19 del gen EGFR, comprendiendo dicho sistema al menos un cebador no marcado, y dos sistemas de sonda: antisonda con marcado diferente; en donde el primer sistema de sonda comprende un cebador-sonda complementario a una primera secuencia no específica; en donde el segundo sistema de sonda es complementario a la secuencia silvestre en el sitio de eliminación del exón 19 e inhibe o excluye la detección de plantillas diana que comprenden una eliminación de múltiples bases dentro de los codones 746 a 753 del exón 19 del gen EGFR; con lo que se evalúa la presencia y frecuencia de una eliminación de exón 19 comparando la señalización relativa de los dos sistemas de sonda.

5 En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el conjunto de sonda: antisonda-cebador no específico es SEQ ID NOs.: 56, 57 y 53, o SEQ ID NOs.: 79, 80 y 12; y en donde el conjunto de sonda-antisonda-cebador solo silvestre de eliminación-19 es SEQ ID NOs.: 81, 82 y 53, o SEQ ID NOs.: 54, 55 y 53, y en donde cada conjunto de sonda:antisonda-cebador no específico y el conjunto de sonda-antisonda-cebador solo silvestre de eliminación-19 puede incluir opcionalmente cebador suplementario SEQ ID NO.: 78.

En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el oligonucleótido antisonda se combina con un ensayo de sonda Taqman o Molecular Beacon; en donde el oligonucleótido antisonda comprende un modulador de fluorescencia y comprende una secuencia parcialmente complementaria a una sonda Taqman o Molecular Beacon.

10 En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el sistema de sonda:antisonda está configurado para detectar una variante de nucleótido del exón 19, 20 o 21 del gen EGFR, un gen VKORC1, un gen CYP2C9, un gen uidA de E. coli, un el gen 16s de bacterias gram positivas, un gen 16s de bacterias gram negativas, un gen mycobacterium inhA, un gen mycobacterium rpoB, un gen mycobacterium 16S, un gen de la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza, un gen matriz (M) del virus influenza A, un gen no estructural (NS) del virus de la influenza B y un gen KRAS.

15 En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el sistema de sonda:antisonda comprende las secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NOs.: 1 y 2, SEQ ID NOs.: 3 y 4, SEQ ID NOs.: 7 y 8, SEQ ID NOs.: 9 y 10, SEQ ID NOs.: 13 y 14, SEQ ID NOs.: 17 y 18, SEQ ID NOs.: 19 y 20, SEQ ID NOs.: 23 y 24, SEQ ID N°: 36 y 37, SEQ ID NO: 54 y 55, SEQ ID NO: 56 y 57, SEQ ID NO: 64 y 65, SEQ ID NO: 66 y 67, SEQ ID NO: 70 y 71, SEQ ID NO: 72 y 73, SEQ ID NO: 79 y 80, SEQ ID NO: 81 y 82, SEQ ID NO: 85 y 86, SEQ ID NO: 88 y 89, y SEQ ID NOs.: 91 y 92.

20 En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el sistema comprende además una sonda de terminación de bloqueo no marcada para suprimir selectivamente la amplificación de qPCR y la detección de una primera secuencia diana frente a una segunda secuencia diana; en donde la sonda de terminación comprende: (i) un oligonucleótido complementario a la primera secuencia de nucleótidos diana, (ii) un extremo 5' modificado para resistir la digestión con exonucleasa, (iii) un extremo 3' modificado para resistir la extensión de la polimerasa y (iv) en donde la sonda de terminación está configurada además con una Tm y un ΔG que excede la Tm y el ΔG de los cebadores y/o sondas del ensayo de qPCR en al menos aproximadamente 5 kcal/mol en ΔG y en al menos aproximadamente 5°C en Tm.

25 En realizaciones de este aspecto de la divulgación, el sistema, para mejorar la unión, la sonda de terminación comprende además al menos uno de un nucleótido no natural, un aglutinante de surco menor (MGB) y un ácido nucleico de Zip (ZNA).

30 Otro aspecto de la divulgación abarca realizaciones de un sistema para mejora de objetivo de qPCR, en donde el sistema comprende un primer subsistema y un segundo subsistema, en donde el primer subsistema comprende: (i) el oligonucleótido de sonda de terminación no marcado complementario a la primera secuencia de nucleótidos diana; (ii) un par de cebadores configurado para amplificar regiones de ácido nucleico que comprenden una primera y una segunda secuencia de nucleótidos diana; y el segundo subsistema comprende: (i) una alícuota diluida del producto de amplificación generado por el primer subsistema de preamplificador en donde la alícuota diluida comprende aproximadamente 0,05% o menos del producto de amplificación de preamplificador; (ii) al menos un sistema de sonda:antisonda complementario con al menos la segunda secuencia de nucleótidos diana, y (iii) al menos un cebador configurado para amplificar regiones de ácido nucleico que comprenden la primera y la segunda secuencia de nucleótidos diana; con lo cual, la preamplificación con el primer subsistema y la re-amplificación y detección con el segundo subsistema proporciona medios para amplificar y detectar selectivamente la segunda secuencia de nucleótidos diana cuando la frecuencia de la primera secuencia de nucleótidos diana supera la frecuencia de la segunda secuencia de nucleótidos diana por una relación de 20:1 o más.

35 Debe enfatizarse que las realizaciones de la presente divulgación, particularmente, cualquier realización "preferida", son simplemente ejemplos posibles de las implementaciones, simplemente establecidas para una comprensión clara de los principios de la divulgación. Se pueden realizar muchas variaciones y modificaciones a las realizaciones descritas más arriba de la divulgación sin apartarse sustancialmente del espíritu y principios de la divulgación. Todas estas modificaciones y variaciones pretenden incluirse en este documento dentro del alcance de esta divulgación, son la presente divulgación y están protegidas por las siguientes reivindicaciones.

40 Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo realizar los métodos y usar las composiciones y compuestos divulgados y reivindicados aquí. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, la temperatura está en °C y la presión está en o cerca de la atmosférica. La temperatura y presión estándar se definen como 20 °C y 1 atmósfera.

55 Ejemplos

Ejemplo 1

Condiciones de ciclización: Se llevó a cabo el PCR en tiempo real con un instrumento Mx4000 (Stratagene, Inc) utilizando HOTSTART-IT PROBE.RTM qPCR master mix (USB, Inc.) (2x) complementado con 1 µl de 25 mM de MgCl₂ en una reacción de 20 µl. Para iniciar las condiciones de arranque en caliente, el tubo se calentó hasta 95°C durante 5 minutos seguido de 40 ciclos de PCR en dos etapas (desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, fusión/ampliación/extendido a 58°C durante 1 minuto). Las plantillas utilizadas fueron oligonucleótidos ULTRAMER.RTM (Integrated ADN Technologies, Iowa, EE. UU.) que comprenden el segmento del gen EGFR direccionado con o sin la transversión T> G.

Ejemplo 2

Composiciones de sonda: antisonda de DDS interna (iDDS) para detectar variantes de VKORC1 SNP: una variante de SNP importante relacionada con la dosificación de warfarina se localiza en el gen VKORC1 que codifica la epóxido reductasa de vitamina K, subunidad 1, en el sitio -1639 de la misma, que comprende un cambio de G> A en el mutante versus el tipo silvestre. Para detectar estas dos variantes de SNP mediante PCR en tiempo real, las sondas, antisondas y cebadores de más adelante se usaron en las siguientes concentraciones finales:

Sonda VK-1639G: 5'-FAM-CGCACCCGGCCAATG-Phos-3' (SEQ ID NO.: 1) a 200 nM;

15 Antisonda VK-1639G: 5-CATCGGCCGGGTGCG-BHQ1-3' (SEQ ID NO.: 2) a 400 nM

Sonda VK-1639A: 5-FAM-ATTGGCCAGGTGCG-Phos-3' (SEQ ID NO.: 3) a 200 nM

Antisonda VK 1639A: 5-CGCACCTGGCCTAT-BHQ1-3' (SEQ ID NO.: 4) a 400 nM

Cebador de avance VK: 5-CCTCTGGGAAGTCAAGCAAG-3' (SEQ ID NO.: 5) a 200 nM

Cebador reverso VK: 5-AAATGCTAGGATTATAGGCGTGA-3' (SEQ ID NO.: 6) a 200 nM

20 Mientras que las sondas y antisondas contienen las variantes de bases sencillas dirigidas para VKORC1, cada antisonda se modificó con una base no coincidente (posición 4 de antisonda silvestre, posición 12 de antisonda mutante) para reducir la unión de la sonda a la antisonda en relación con la unión de la sonda a una diana que coincida correctamente. La no coincidencia prevista en la estructura de sonda:antisonda consistía en lograr una afinidad entre la sonda y la antisonda que es intermedia entre la afinidad entre la sonda y la diana correcta versus la sonda y una diana incorrecta.

25 La Figura 6 muestra cómo la secuencia de la sonda silvestre interactúa: (1) con la secuencia diana silvestre deseada, (2) con la secuencia antisonda seleccionada, y (3) con una secuencia diana incorrecta (en este caso la secuencia mutante) para crear tres niveles diferentes de afinidad termodinámica medidos por T_m y ΔG. Estas sondas, antisondas y dianas se someten luego a ciclos de PCR en tiempo real y detección en donde la temperatura desciende repetidamente desde la desnaturalización a 95 grados hasta una temperatura de fusión/ampliación de aproximadamente 58 °C, y luego de regreso hasta 95 °C (con o sin una etapa de extensión a aproximadamente 72 °C).

30 La señalización fluorescente se evaluó en cada etapa de fusión/ampliación. La sonda para corregir la unión de la diana se produce primero a aproximadamente 5°C por encima de la temperatura de fusión/ampliación, y luego, la unión de sonda a antisonda se produce en segundo lugar aproximadamente a la temperatura de fusión/ampliación. La unión de diana correcta activa la señalización mientras que la unión antisonda desactiva la señalización. Termodinamicamente, la sonda para la unión a una diana incorrecta solo puede producirse por última vez, o no realizarse, ya que solo puede producirse efectivamente a aproximadamente 5 °C por debajo de la temperatura a la que se produce la unión de la sonda a la antisonda. Además, dado que se proporciona un exceso de dos a uno de antisondas, la unión de sonda a diana incorrecta está efectivamente bloqueada. Típicamente, la unión del cebador también se optimiza para la temperatura de fusión/ampliación de PCR. Debido a estas características estructurales y termodinámicas del ensayo basado en la sonda: antisonda de iDDS, hay poca o ninguna oportunidad para que una sonda se una a una diana incorrecta que difiera en una base única de la diana deseada.

45 Condiciones de ciclización: El PCR en tiempo real se llevó a cabo con un instrumento Mx4000 (Stratagene, Inc) utilizando HOTSTART-IT PROBE.RTM qPCR master mix (USB, Inc.) (2x) complementado con 1 µl de 25 mM de MgCl₂ en una reacción de 20 µl. Para iniciar las condiciones de arranque en caliente, el tubo se calentó hasta 95 °C durante 5 min. Luego siguieron 40 ciclos de PCR en dos etapas (desnaturalización a 95 °C 15 seg, fusión/ampliación/extendido a 58 °C durante 1 min). Las plantillas utilizadas fueron Ultramers sintetizados por IDT que comprende el segmento del gen diana, con o sin la base mutante, y los sitios del cebador flanqueante.

50 Figuras 8A y 8B muestran las curvas de amplificación de cuatro tubos que contenían 1.000 copias de la plantilla silvestre o mutante y que usaban la sonda silvestre o mutante. Las curvas positivas (ascendentes) reflejan la detección de la plantilla mutante con la sonda mutante (figura 8B) o la detección de la plantilla silvestre con la sonda silvestre (Figura 8A). Las curvas planas reflejan la sonda silvestre con la plantilla mutante o la sonda mutante con la plantilla silvestre. Conjuntos de sonda:antisonda de iDDS silvestre y mutante similar: conjuntos para dos SNP de diagnósticos relacionados, CYP2C9*2 y CYP2C9*3, también se fabricaron y se realizaron con resultados similares.

55 CY2-W-sonda: FAM-CATTGAGGACCGTGTTCAGA-Phos (SEQ ID NO.: 64) a 200 nM;

ES 2 684 525 T3

CY2-W-antisonda: TCTTGAACACGGTCTCTATG-BHQ1 (SEQ ID NO.: 65) a 400 nM

CY2-M-sonda: FAM-CTCTTGAACACAGACCTCAATGC-Phos (SEQ ID NO.: 66) a 200 nM

CY2M-antisonda: GCATTGAGGACTGTGTTTCATGAG-BHQ1 (SEQ ID NO.: 67) a 400 nM

CY2Fcebador: AATTTTGGGATGGGGAAGAG (SEQ ID NO.: 68) a 200 nM

5 CY2R-cebador: GTTTTTCTCAACTCCTCCACAAGG (SEQ ID NO.: 69) a 200 nM

CY3W-sonsa: FAM-GAGAAGGTCAATGAATCTCTGGAC-Phos (SEQ ID NO.: 70) a 200 nM

CY3W-antisonda: GTCCTGAGATACATTGACCTTCTC-BHQ1 (SEQ ID NO.: 71) a 400 nM

CY3M-sonda: FAM-AGAAGGTCAAGGAATCTCTGGAC-Phos (SEQ ID NO.: 72) a 200 nM

CY3M-antisonda: GTCCTGAGATACCTTGACCTTCT-BHQ1 (SEQ ID NO.: 73) a 400 nM

10 CY3F-cebador: CCACATGCCCTACACAGATG (SEQ ID NO.: 74) a 200 nM

CY3R-cebador: CCTTGGGAATGAGATAGTTTCTGAA (SEQ ID NO.: 75) a 200 nM

Ejemplo 3

15 Sondas DDS internas (iDDS) para detección por PCR en tiempo real de una variante de base única del gen EGFR (en Exon 21 L858R) asociado con diagnóstico y terapia de cáncer de pulmón: Para detectar el codón mutante EG8 Exon 21 L858R sospechoso de estar presente en una muestra de ácido nucleico, y posiblemente en presencia de la secuencia de codón de 858L de tipo silvestre (normal), se sintetizaron las siguientes sondas de oligonucleótidos, antisondas y cebadores de PCR y se usaron en las concentraciones finales indicadas:

sonda EGFR 858R: FAM-CAGATTTTGGCCGGCCAAACTG-Phos (SEQ ID NO.: 7) a 200 nM

antisonda EGFR 858R: CAGTTTGGCCGCCCAATATCTG-BHQ1 (SEQ ID NO.: 8) a 400 nM

20 sonda EGFR 858L: CalRed610-CAGATTTTGGGCTGACCAAACTG-Phos (SEQ ID NO. 9) a 200 nM

antisonda EGFR 858L: CAGTTTGGCCAGCCATAATCTG-BHQ2 (SEQ ID NO.: 10) a 400 nM

Cebador de avance: GAAAACACCGCAGCATGTC (SEQ ID NO.: 11) a 200 nM

Cebador reverso: CTGCATGGTATTCTTTCTCTTCC (SEQ ID NO.: 12) a 200 nM

25 Mientras que las sondas y antisondas anteriores contienen las variantes de bases sencillas dirigidas en el codón 858, cada antisonda incluye también una base no coincidente adicional con respecto a las secuencias de sonda correspondientes en la posición 18 antisonda del mutante 858R (del terminal 5') y en la posición 18 antisonda 858L silvestre (desde el terminal 5') que reduce las afinidades de unión de las antisondas a sus sondas coincidentes (mostradas en las Figuras 7B).

30 Para estas dianas particulares, la diferencia termodinámica entre (i) la unión de la sonda y la diana correcta y (ii) la sonda y la diana incorrecta fue baja. Las sondas, por lo tanto, se diseñaron cada una para incluir una no coincidencia auxiliar adicional localizado a dos bases del sitio base variante que se desea detectar (en la posición 11 de la sonda 858R variante, y en la posición 15 de la sonda 858L silvestre, respectivamente). En el caso de la hibridación de una sonda con una diana incorrecta, se forma una "burbuja de hibridación" de tres bases (CCG), que impide la formación del dúplex y favorece la hibridación con la secuencia diana correcta o con su oligonucleótido antisonda correspondiente.

35 La Figura 9 muestra curvas de amplificación de dos tubos que contienen 1.000 copias de la plantilla mutante. La curva positiva (ascendente) reflejó la detección del mutante base individual con la sonda variante 858R. La curva plana se refleja utilizando la sonda silvestre, que no detecta la plantilla mutante.

Ejemplo 4

40 PCR en tiempo real utilizando sondas iDDS para la detección de E. coli O157:H7 patogénica basada en la detección del uidA +93 y la comparación con una sonda TaqMan-MGB: la sonda, antisonda y los cebadores se fabricaron con las siguientes secuencias y marcaje, y se usaron en las concentraciones finales indicadas:

Sonda O157 uidA mutante: FAM-CACCAACGCTGCTCAATTC-Phos (SEQ ID NO.: 13) a 200nM

Antisonda mutante: GAA TTGAGCTGCGTTGGTG-BHQ1 (SEQ ID NO.: 14) a 400nM

45 Cebador de avance uidA: CAGTCTGGATCGCGAAAAGT (SEQ ID NO.: 15) a 200nM

Cebador reverso: ACCAGACGTTGCCACATAATT (SEQ ID NO.: 16) a 200nM

Condiciones de ciclización: se llevó a cabo PCR en tiempo real como se describe en el Ejemplo 1, excepto que se realizó qPCR durante 60 ciclos y la etapa de fusión/ extensión fue a 60 °C durante 1 min.

5 La Figura 10A muestra curvas de amplificación crudas de cuatro tubos utilizando la sonda mutante O157 para detectar dos concentraciones (50 copias y 5 copias) de la plantilla mutante de E. coli (curvas positivas) versus 50 y 5 copias de la plantilla negativa de E. coli (curvas planas). No se ve ninguna detección de falso positivo con la plantilla silvestre durante 60 ciclos.

10 En comparación, la Figura 10B muestra curvas de amplificación de dos tubos usando una sonda Taqman-MGB disponible comercialmente específica para que el mutante O157 detecte 50 copias de la plantilla mutante (curva positiva (ascendente) versus 50 copias de la plantilla de control (curva predominantemente plana). La plantilla de control, que no tenía el polimorfismo asociado a patógenos, produjo un número de resultados falsos positivos (curva en ángulo ascendente) con la sonda Taqman-MGB a los 38 ciclos.

Ejemplo 5

15 PCR en tiempo real utilizando sondas iDDS para la detección de bacterias Gram negativas (GN) versus Gram positivas (GP): la sonda, antisonda y los cebadores se fabricaron con las siguientes secuencias y marcaje, y se usaron en las concentraciones finales indicadas:

Sonda GP: FAM-AAGGGGCTTGATGATTTGACGT-Phos (SEQ ID NO.: 17) a 200nM

Antisonda GP: ACGTCAAATCTTCATGCCCTT-BHQ1 (SEQ ID NO.: 18) a 400nM

Sonda GN: CalRed610-AAGGGCCATGATGACTTGA-Phos (SEQ ID NO.: 19) a 200nM

20 Antisonda GN: TCAAGTCTTCATGGCCCTT-BHQ2 (SEQ ID NO.: 20) a 400nM

Cebador de avance: TCCCGCAACGAGCGCAAC (SEQ ID NO.: 21) a 200nM

Cebador reverso: CAGCCATTGTAGCACGTGTGT (SEQ ID NO.: 22) a 200nM

25 Condiciones de ciclización: la PCR en tiempo real se realizó como se describe en el Ejemplo 1 con la etapa de fusión/ extensión a 58 °C durante 1 minuto. Ambas sondas se usaron juntas en el mismo tubo y cada tubo contenía una plantilla diferente.

La Figura 11A muestra dos curvas en un tubo con ambas sondas gram positivas y gram negativas. La curva positiva (ascendente) indica que la sonda gram positiva detecta plantillas gram positivas de aproximadamente $1,3 \times 10^4$ células, y la curva plana refleja que la sonda gram negativa no muestra detección de falsos positivos con la misma plantilla.

30 Alternativamente, la Figura 11B muestra dos curvas en un tubo en donde la curva positiva refleja la sonda específica de gram negativa que detecta la plantilla gram negativa de aproximadamente $2,6 \times 10^5$ células. La curva plana refleja la sonda gram positiva que no muestra detección de falsos positivos con esas mismas plantillas.

35 En experimentos adicionales, la sonda Gram Negativa (SEQ ID NO.: 19) se modificó con marcaje fluorescente FAM en el extremo 5' y con marcaje detenedor de BHQ1 en el extremo 3', y la antisonda de Gram Negativa (SEQ ID NO.: 20) fue marcada con BHQ1 en el extremo 3', y opcionalmente con FAM en el extremo 5'. Ambas modificaciones mejoraron la detección por qPCR, produciendo niveles más altos de señalización fluorescente exponencial y niveles de fondo más bajos.

Ejemplo 6

40 PCR en tiempo real utilizando sondas ZIPR DDS para la detección de la influenza H3N2: La sonda ZIPR H3N2 se direccionó a un sitio en el segmento de hemaglutinina (HA) de los genomas de influenza H3N2 y se marcó con FAM. La sonda comprendía una secuencia de cebador específica de diana. La antisonda está marcada con BHQ1 y es en gran parte complementaria a la sonda. El cebador se usó junto con la sonda y la antisonda para amplificar y detectar muestras de H3N2, y se usaron en las siguientes concentraciones finales:

Sonda ZIPR H3: FAM-CTGGTTCAGAGTTCCTCAACA (SEQ ID NO.: 23) a 200nM

Antisonda ZIPR H3: TGTTGATGAACTCTGAACAG-BHQ1 (SEQ ID NO.: 24) a 400nM

45 Cebador H3: CCATCAAGGATCTGATGAGGA (SEQ ID NO.: 25) a 200nM

Condiciones de ciclización: La PCR en tiempo real se realizó como se describe en el Ejemplo 1.

La Figura 12 muestra una curva de amplificación de una muestra de paciente infectada con H3N2 usando la sonda ZIPR H3 anterior.

Ejemplo 7

5 PCR en tiempo real utilizando sondas DDS de FLIP para la detección de 16S de *Mycobacterium tuberculosis* versus 16S de *Mycobacterium paratuberculosis*: la siguiente sonda DDS de FLIP para la detección específica de especies de *Mycobacterium tuberculosis* se direccionó a un sitio en el gen 16S que difiere por una base del gen 16S de *Mycobacterium paratuberculosis*. La sonda estaba marcada con 3'-FAM y comprendía una secuencia diana interna. El componente antisonda se marcó con 5'-BHQ1 y se conjugó con una secuencia de cebador 3', en este ejemplo con el cebador de avance.

10 Solo se utilizó un cebador flanqueante junto con los componentes de la sonda FLIP. Durante la amplificación del objetivo, la sonda se unió a la secuencia diana, dejando atrás la antisonda desde que se unió a un cebador que se incorpora al amplicón. Por lo tanto, la sonda podría voltearse hacia su sitio diana, lo que provocaría la detección fluorescente. El ensayo usó un segundo cebador que no estaba cargado con una antisonda. La comparación se realizó con una sonda Taqman para el mismo sitio diana, usando tanto el cebador de avance como el de reverso y las mismas muestras de prueba. Los componentes del cebador y la sonda y las concentraciones finales fueron los siguientes:

Sonda FLIP: TAGGACCACGGGATGCATGTCTT-FAM (SEQ ID NO.: 26) a 125nM

15 Antisonda-sonda FLIP: dT-BHQ1-AAGACATGCATCCCGTGGT-espaciador9-GGGATAAGCCTGGGAAACTG (SEQ ID NO.: 27) a 200nM

Sonda Taqman: FAM-CATGTCTTGTGGTGGAAAGC-BHQ1 (SEQ ID NO.: 28) a 100nM

Cebador de avance: GGGATAAGCCTGGGAAACTG (SEQ ID NO.: 29) a 200 nM

Cebador reverso: ACCCCACCAACAAGCTGATA (SEQ ID NO.: 30 a 200nM

20 Condiciones de ciclización: La PCR en tiempo real se realizó como se describe en el Ejemplo 1.

La Figura 13A muestra curvas de amplificación de cinco tubos usando la sonda DDS de FLIP específica para 16S *M. tuberculosis*. Las cuatro curvas positivas (ascendentes) reflejan la detección de cuatro muestras de *M. tuberculosis* diluidas en serie 10: 1. La curva negativa refleja una muestra de *M. paratuberculosis* que difiere en una base en la región de la sonda.

25 La Figura 13B muestra curvas de cinco tubos usando una sonda Taqman específica para 16S *M. tuberculosis* en la misma región diana que la sonda FLIP mostrada en la Figura 13A. Las cuatro curvas positivas altas son de las mismas cuatro diluciones seriadas de *M. tuberculosis* que se muestran arriba. La curva positiva inferior que se superpone a las otras curvas es de la misma muestra de control de *M. paratuberculosis* que en la Figura 13A. Esto ilustra la detección de falsos positivos que se produce con la sonda Taqman. La sonda FLIP es más estricta y evita tal detección de falsos positivos.

30 Ejemplo 8

PCR en tiempo real usando la sonda G-Force DDS para la detección del gen *rpoB* de *M. tuberculosis*: una sonda G-Force DDS para tuberculosis fue diseñada para detectar una región en el gen *rpoB* que abarca los codones 526 a 533. Una unidad de señalización de sonda:antisonda genérica se unió a un cebador y funcionó junto con el otro cebador de flanqueo para amplificar y detectar el sitio diana. La unidad de señalización de G-Force comprendía un segmento de sonda rico en citidina marcado con FAM, un espaciador flanqueado por A y un segmento antisonda rico en guanina (como se muestra en la SEQ ID NO.: 31).

40 En ausencia de una secuencia diana, los segmentos de sonda y antisonda se pliegan juntos, con el espaciador entre ellos, debido a la unión de secuencias complementarias. Como esto trae el fluoróforo al lado de una cadena de guaninas, la fluorescencia se redujo significativamente. Pero cuando la unidad de cebador/sonda se incorporó al producto, el segmento antisonda se copia, impidiendo así que el segmento de la sonda se doble al lado del segmento antisonda y, por lo tanto, se libera la señalización.

La sonda G-Force y la secuencia del cebador y las concentraciones finales son:

45 Cebador/sonda GF: FAM-CCCCTCCA-espaciador18-AGGAGGGGG-CCGCTGCGGGGTTGAC (SEQ ID NO.: 31) a 100nM; Cebador reverso: CACGCTCATGTGACAGACC (SEQ ID NO.: 32) a 200nM

La sonda G-Force se usó con dos plantillas. Uno que contiene un mutante de base única en el codón 526 (tac), y el otro la secuencia silvestre. La sonda G-Force no diferenció estas dos plantillas.

Condiciones de ciclización: La PCR en tiempo real se realizó como se describe en el Ejemplo 1.

50 La Figura 15 muestra los resultados de dos tubos con la sonda anterior que muestra curvas positivas con la plantilla tanto silvestre como mutante.

Ejemplo 9

La sonda G-Force DDS combinada con una sonda iDDS para la detección de un mutante de base única en el gen rpoB de *M. tuberculosis*: La sonda G-Force DDS del Ejemplo 8 anterior se utilizó junto con una sonda iDDS direccionada a la secuencia silvestre para el codón 526 de rpoB. Los componentes y las concentraciones de la sonda iDDS están debajo. Este ensayo fue diseñado para detectar si un mutante está presente en el codón 526, el sitio primario para mutantes resistentes a la rifampicina, sin tener que detectar cada mutante específico con una sonda IDS diferente. Por lo tanto, la sonda iDDS da una curva plana si está presente un mutante 526, mientras que la sonda G-Force todavía dará una curva positiva. Este resultado positivo/negativo confirma que el propio codón 526 está presente, y luego muestra que contiene una base mutante, independientemente de la variante de base que esté presente. Si bien este resultado positivo/negativo confirma que solo está presente un mutante resistente, el ensayo puede ser ambiguo si la muestra contiene cantidades significativas de plantillas tanto silvestres como mutantes y se detectan dos curvas positivas.

Sonda iDDS: CalFluorRed610-CGGGGTTGACCCACTAGCG-phos (SEQ ID NO.: 33) a 200nM

Antisonda: CGCTTGTGGGTCTACCCCG-BHQ2 (SEQ ID NO.: 34) a 400nM

Condiciones de ciclización: La PCR en tiempo real se realizó como se describe en el Ejemplo 1.

La Figura 16A muestra un tubo con las dos sondas anteriores y con una plantilla mutante para el sitio 526. La sonda G-Force mostró una curva positiva que detectaba la región 526-533, pero la sonda iDDS silvestre más específica para el sitio 526 no mostró una curva positiva ya que el sitio 526 es mutante. Por lo tanto, este ensayo proporciona un índice del estado del mutante rpoB 526 sin detectar un mutante específico.

Una sonda G-Force se puede combinar con una sonda iDDS para cuantificar la frecuencia de un mutante específico en una muestra. La sonda G-Force detecta todos los amplicones de la región diana mientras que la sonda iDDS solo detecta los amplicones que componen la secuencia mutante. Por lo tanto, la señal es constantemente alta para la sonda G-Force con plantillas silvestres o mutantes, mientras que la altura de señal de la sonda iDDS es proporcional a la frecuencia de la plantilla mutante versus la plantilla silvestre, y proporciona una indicación de las proporciones relativas de células silvestres versus mutantes en una población de células. Lo mismo sería cierto en reversa si la sonda iDDS detectara la secuencia silvestre y no la mutante.

Esta capacidad se muestra con una sonda G-Force para el gen inhA de *M. tuberculosis* combinado con una sonda iDDS para la secuencia inhA silvestre en el sitio de un mutante resistente a fármacos común utilizando las siguientes sondas y cebadores:

Cebador de avance: GCTCGTGGACATACCGATTT (SEQ ID NO.: 35) a 200nM;

sonda iDDS inhA: CalRed610-CCGACAACCTATCGTCTCGCC-Phos (SEQ ID NO.: 36) a 200nM;

antisonda inhA: CGAGACGATAGGTTGTCGG-BHQ2 (SEQ ID NO.: 37) a 400nM;

cebador-sonda G-Force de InhA: CCCCTCCA-espaciador18-AGGAGGGGGTCCGGTAACCAGGACTGAAC (SEQ ID NO.: 38) a 100nM

La Figura 16B muestra una prueba en donde se realizaron dos tubos con la plantilla silvestre y mutante mezclada en cualquiera de 75% silvestre: 25% mutante o 25% silvestre: 75% mutante. Si bien las curvas para la sonda G-Force fueron las mismas para cualquier plantilla, las curvas de la sonda iDDS diferían en altura proporcionalmente al porcentaje de plantilla silvestre presente.

Ejemplo 10

Detección de mutantes basada en la sonda iDDS mejorada con el método "Terminadora Silvestre": la detección de mutantes con sondas iDDS podría mejorarse mediante una etapa de preamplificación que amplificara selectivamente las plantillas mutantes dirigidas y bloqueara la amplificación de las plantillas silvestres. Después de la etapa de preamplificación, el producto de reacción se diluyó y una pequeña muestra diluida se transfirió a una reacción de PCR en tiempo real. Debido a este proceso, las plantillas de tipo silvestre fueron casi eliminadas y la reacción de qPCR comenzó con una cantidad amplificada de plantillas de mutantes. El resultado fue que una muestra con una baja frecuencia de plantillas mutantes podría ser detectada eficientemente por qPCR con una sonda iDDS incluso si la muestra original contenía una abundancia de plantillas silvestres que de otro modo oscurecerían la detección de mutantes.

La reacción de preamplificación usó un conjunto de cebadores que flanqueaban la región diana, y la reacción final usó un conjunto de cebadores que estaba parcial o totalmente entre los cebadores externos. El primer procedimiento de preamplificación se realizó en una máquina de PCR estándar durante 30 a 70 ciclos cortos. Un microlitro de la primera reacción se diluyó generalmente con 100 a 500 microlitros de agua o regulador, y luego se transfirió una muestra de un microlitro a una segunda reacción en una máquina de PCR en tiempo real.

La primera etapa usó una sonda de bloqueo Terminadora Silvestre que comprendía un oligonucleótido no marcado que era complementario de la secuencia silvestre y de aproximadamente 22 a 28 bases de longitud, aproximadamente

de 2 a 5 bases más largas que la sonda de iDDS. El extremo 5' se modificó para evitar la digestión con la 5'-nucleasa, la unión de la unidad estructural bloqueante tal como una molécula de biotina, un ZNA, un MGB o una cadena arbitraria de bases no complementarias (aproximadamente 5-10). El extremo 3' se modificó con una molécula que evita la extensión de la sonda usando tal como un fosfato, un grupo amino o un espaciador. La Tm de la sonda de bloqueo era típicamente al menos 5 °C más alta que la sonda iDDS, por lo que cualquier plantilla silvestre se uniría fuertemente a ella.

La sonda de bloqueo "Terminadora Silvestre" actuó como una antisonda en reversa, bloqueando plantillas silvestres mientras permite que las sondas iDDS para la secuencia mutante se unan y detecten plantillas mutantes. Este ejemplo ilustra la detección mejorada del sitio mutante L858R de EGFR Exon 21 (T> G) utilizando las mismas sondas iDDS descritas en el Ejemplo 2, pero proporcionando plantillas mixtas con una baja frecuencia (0,2%) de la variante de secuencia mutante en relación con la variante de secuencia silvestre.

La primera etapa de preamplificación utilizó las siguientes plantillas y componentes: Plantillas: 10,000 copias de EGFR silvestre 21 858L; 20 copias de Exon 21 858R de EGFR mutante (0.2%). Cebador de avance externo: AGCCAGGAACGTAAGTGGTGA (SEQ ID NO: 39) a 100 nM, Cebador reverso externo: TGCCTCCTTCTGCATGGTAT (SEQ ID NO: 40) a 100 nM; Sonda de bloqueo Terminadora: biotina-CTTTCCCACCAACGCAGATCAATTCCA-phos (SEQ ID NO.: 41) a 200 nM

Esta primera etapa comprendió una reacción de 20 µl usando una mezcla maestra de PCR de USB (2x). La reacción se inició calentando hasta 95°C durante 3 minutos seguido de 40 ciclos de PCR a 95°C durante 2 segundos, 50°C durante 2 segundos y 72°C a 2 segundos. Esta etapa inhibió o evitó la amplificación de plantillas silvestres mientras que las plantillas mutantes se amplificaron. De la etapa 1 diluido 1/500, se transfirió 1 µl a la etapa 2.

La segunda etapa de qPCR usa los siguientes componentes y condiciones:

Cebador de avance interno: GAAAACACCGCAGCATGTC (SEQ ID NO.: 11) a 200 nM

Cebador reverso interno: CTGCATGGTATTCTTTCTCTTCC (SEQ ID NO.: 12) a 200 nM;

Sonda mutante 858R: FAM-CAGATTTTGGCC GGGCCAAACTG-Phos (SEQ ID NO.: 7) a 200 nM;

Antisonda mutante: CAGTTTGGCCCGCCCAATATCTG-BHQ1 (SEQ ID NO.: 8) a 400 nM;

Sonda silvestre 858L: CalRed610-CAGATTTTGGGCTGACCAACTG-Phos (SEQ ID NO.: 9) a 200nM;

Antisonda silvestre: GCAGTTTGGCCAGCCCATAATCTG-BHQ2 (SEQ ID NO.: 10) a 400 nM

Condiciones de ciclización: La PCR en tiempo real se realizó como se describe en el Ejemplo 1 excepto que la etapa de fusión/extensión fue de 52 °C durante 1 minuto

La figura 14 muestra curvas de qPCR de dos tubos que contienen el mismo producto de reacción de la primera etapa de preamplificador pero con diferentes sondas, silvestres y mutantes, en cada tubo. La curva positiva (ascendente) muestra la detección del mutante muy temprano con amplificación exponencial comenzando en 9 ciclos. La curva negativa no muestra detección de la plantilla silvestre que originalmente estaba en abundancia.

Ejemplo 11

Una etapa iDDS y el método "Terminadora Silvestre" para detectar mutantes Exon 21 de EGFR: la sonda "Terminadora Silvestre" y la sonda iDDS se usaron juntas en una sola reacción de PCR en tiempo real, la sonda "Terminadora Silvestre" inhiben o bloquean la amplificación de las plantillas silvestres y la sonda iDDS que detectan las plantillas mutantes. El procedimiento solo funcionaría si la frecuencia del mutante es aproximadamente 1% o superior. En este ejemplo, se usaron 200 copias de la plantilla mutante con 10.000 copias de la plantilla silvestre (2% de mutante). Todos los cebadores y sondas fueron los mismos que en el Ejemplo 10 anterior, excepto que los cebadores internos se usaron a 400 nM. La sonda "Terminadora Silvestre" se usó a 150 nM, pero se observaron resultados similares con la sonda "Terminadora Silvestre" a 100 o 200 nM.

Condiciones de ciclización: la PCR en tiempo real se realizó como se describe en el Ejemplo 1 con la etapa de fusión/extensión a 52 °C durante 1 minuto.

La Figura 17 muestra dos curvas de un tubo que contiene la sonda "Terminadora Silvestre" y las sondas iDDS silvestres y mutantes para el sitio L858R en EGFR.

Ejemplo 12

Amplificación isotérmica ISAM con sondas ZIPR DDS y detección de qPCR: las secuencias diana de ADN o ARN pueden amplificarse isotérmicamente y detectarse con un cebador-sonda DDS en un extremo y un cebador con una secuencia promotora de ARN polimerasa 5' en el otro extremo. En este ejemplo, se usó una secuencia promotora de ARN polimerasa de T7. Este método emplea una transcriptasa reversa para crear una copia de ADNc de la región diana con el sitio T7 unido al extremo 5'. Entonces un cebador-sonda ZIPR DDS sirvió como un cebador para copiar

el ADNc que incluye el sitio T7, creando de ese modo un producto de doble cadena con una secuencia de reconocimiento del promotor T7. Una ARN polimerasa, en este caso una ARN polimerasa de T7, entonces hizo copias de ARN del producto que sirvió como plantilla para ciclos de amplificación adicionales, alternando entre los productos de ADN y ARN generados. RNasaH facilitó este proceso al degradar la cadena de ARN de un híbrido de ARN:ADN.

5 RNasaH puede proporcionarse por separado, o como una enzima transcriptasa reversa con función de RNasa, para hacer copias de ADNc de los productos de ARN.

Se utilizó un kit básico de NUCLISENS.RTM (BioMerieux, Inc). Durante la amplificación, los cebadores-sondas ZIPR marcadas con fluorescencia se incorporaron en los productos de ADN y se separaron de cualesquiera antisondas disponibles marcadas con detenedor, proporcionando de este modo la detección por qPCR. Debido a la amplificación

10 a baja temperatura, las antisondas se hicieron más cortas. La sonda y los componentes del cebador se usaron de la siguiente manera:

GAPDH-Cy3F1: Cy3- GAGTCAACGGATTTGGTCGT (SEQ ID NO.: 42) a 200nM;

GAPDH-BHQ2: ATCCGTTGACTC-BHQ2 (SEQ ID NO.: 43) a 400nM;

15 GAPDH-T7R1: AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGACAAGCTTCCCGTTCTCAG (SEQ ID NO.: 44) a 200nM.

Esta prueba se realizó con 1 ng de ARN de GAPDH como plantilla inicial. La etapa de RT inicial se realizó a 65 °C durante 5 minutos, y luego a 41 °C durante 5 minutos. El ISAM exponencial se realizó entonces usando tal como una máquina de qPCR o un baño de agua entre 37 y 45 grados, típicamente entre 40 °C a 42 °C. En un ejemplo, la etapa de qPCR se ejecutó con dos temperaturas ligeramente diferentes, ciclización hacia adelante y hacia atrás entre 42 °C

20 durante 30 segundos, y 40 °C durante 30 segundos, durante 80 ciclos. Las emisiones fluorescentes se evaluaron en la segunda etapa por ciclo (etapa de 40 °C).

En la figura 18, la curva de amplificación positiva muestra la detección de los productos de ADN de qPCR ISAM con el cebador-sonda ZIPR DDS. Los productos de ARN no fueron detectados. La mayor parte de la fase de amplificación exponencial se completó en los primeros 20 minutos.

25 Ejemplo 13

Amplificación isotérmica de ISAM con sondas internas de DDS (iDDS): la amplificación de ISAM y la detección de qPCR se pueden realizar como en el Ejemplo 12 anterior, pero usando una sonda de DDS interna en lugar de un cebador-sonda terminal. Además, tanto los cebadores de avance como de reverso podrían tener una secuencia T7 adjunta, una modificación que aumenta la cantidad de productos generados aproximadamente del 20 al 50 por ciento.

30 Sin embargo, debido a la baja temperatura utilizada, la sonda y la antisonda DDS se modificaron utilizando una sonda larga (24 pb) y una antisonda más corta (15 pb).

GAPDH-T7F1: AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGAGTCAACGGATTTGGTCGT (SEQ ID NO.: 45) a 300nM; GAPDH-R1:

AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGACAAGCTTCCCGTTCTCAG (SEQ ID NO.: 46) a 300nM;

35 Sonda iDDS de GDH: FAM-CCTTCATTGACCTCAACTACATGG-amino (SEQ ID NO.: 47) a 150nM;

Antisonda iDDS de GDH: TGAGGTCAATGAAGG-BHQ1 (SEQ ID NO.: 48) a 300nM

Las plantillas de prueba fueron ARN de GAPDH y ARN de VIH. Tanto las etapas de RT-PCR como de qPCR se realizaron como se describe en el Ejemplo 13, excepto que la ciclización de qPCR fue de 60 ciclos de un minuto a una temperatura de 41 °C, evaluándose la detección fluorescente en cada ciclo. En la figura 19, la curva de amplificación positiva muestra la detección de qPCR de ISAM de los productos de ADN de GAPDH con una sonda y una antisonda de DDS interna. La curva plana era de la plantilla de control de VIH. Con la sonda DDS interna, la detección fue más estricta y, por lo tanto, la curva de amplificación se elevó más gradualmente.

40

Ejemplo 14

Amplificación isotérmica de ISAM sobre chip y detección fluorescente: un arreglo de chips se imprimió a mano en portaobjetos CODELINK.RTM (GE Healthcare) con múltiples manchas que contenían cebadores para el gen GAPDH o el gen Rab9. Esos cebadores comprendidos desde el extremo 5': una modificación de amino, un espaciador, una secuencia de T7 y una secuencia de cebador reverso específico del gen. Siguiendo el protocolo de CODELINK.RTM, los cebadores se unieron covalentemente a los portaobjetos impresos a través de su modificación 5' amino. Luego se trataron para bloquear la unión no específica, se lavaron y secaron. Las manchas se dispusieron en un patrón de

50 tablero semiajedrezado alternando entre manchado de cebador GAPDH y Rab9. La reacción ISAM se realizó en el chip, añadiendo 150 ng cada uno de ARN GAPDH y ARN Rab9, más una sonda GAPDH marcada con Cy3 que comprende una secuencia de cebador de avance, y una sonda Rab9 marcada con FAM que comprende una secuencia T7 y una secuencia de cebador de avance.

La reacción se realizó bajo un cubreobjetos, pero en una cámara sellada, y se mantuvo a 41 °C durante al menos 2 horas en un baño de agua. A continuación, los chips se lavaron con: 2xSSC/0.1% SDS, 1xSSC/0.1% SDS, 1xSSC, luego 0.01xSSC, luego se centrifugaron en seco. La detección se realizó con un escáner de microarreglos Perkin Elmer. Los cebadores y sondas específicos de GDH y Rab9 fueron:

5 GDH-R1s: amino-espaciador18-ATTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGACAAGCTTCCCCTTCTCAG (SEQ ID NO. 49); Rab9-R1s: amino-espaciador18-ATTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGAAATGGTGCCTCAGGCTTC (SEQ ID NO. 50); GDHCy3F1: Cy3-GAGTCAACGGATTTGGTCGT (SEQ ID NO. 51) a 900nM; Rab9-FAM-T7F1: FAM-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCAATGGCAGGAAAATC (SEQ ID NO. 52) a 900nM

10 En la Figura 20, se observó un patrón de manchas verdes y azules en el arreglo que indica que la amplificación y detección específica del gen ISAM sobre chip se podría realizar con un cebador unido al chip. Debido a las bajas diferencias de sombreado entre el fondo negro y las manchas específicas de Rab9 marcadas con FAM azul, esos puntos fluorescentes específicos de gen se representaron como círculos blancos en la figura en blanco y negro que se muestra. Las manchas específicas de GAPDH marcadas con Cy3 verde se pueden ver más fácilmente en la figura
15 en blanco y negro como puntos blancos sólidos o puntos blancos con un centro gris. La amplificación y la detección fueron exclusivas para cada gen.

Ejemplo 15

20 Detección de un mutante de eliminación variable del exón 19 de EGFR utilizando dos composiciones de sonda:antisonda en el mismo amplicón: en cáncer de pulmón y enfermedad relacionada, los mutantes de eliminación variables ocurren comúnmente en el exón 19 del gen EGFR que implica la pérdida de 9 a 24 bases en la región que comprende los codones 746 a 753, y tales supresiones son el biomarcador más común para la capacidad de respuesta a los inhibidores de la tirosina quinasa. Estas supresiones de diagnóstico en el exón 19 (conocido como Del-19) generalmente se han detectado mediante métodos de secuenciación. Dahse et al. 2008 han desarrollado un ensayo de PCR y basado en gel que utiliza un cebador especial para puentear y amplificar el mutante Del-19 de 15 pb más
25 común, sin embargo, este ensayo falla con otros mutantes de eliminación del exón 19. El ejemplo presentado aquí supera esta limitación usando un par de composiciones de sonda:antisonda en un ensayo de qPCR para detectar dos aspectos de un amplicón de exón 19 de EGFR. Un cebador-sonda con un marcador se usa para amplificar y detectar el extremo terminal de todos los amplicones del segmento diana con o sin un mutante Del-19, y una segunda sonda de IDSD con un marcador diferente detectará un segmento interno que comprende codones 746 para 753 solo si las
30 secuencias de tipo silvestre están presentes. Por sustracción, este sistema de dos sondas discierne la proporción relativa de mutantes Del-19 a tipo silvestre. El cebador-sonda empleado es un cebador-sonda de ZIPR que también sirve como cebador de avance:

CalRed610-TCTGGATCCCAGAAGGTGAG (SEQ ID NO: 56) a 200 nM;

CTCACCTTCTGGTTCCAGA-BHQ2 (SEQ ID NO: 57) a 400 nM

35 La sonda:antisonda interna de iDDS comprende: Fam-CAAGGAATTAAGAGAAGCAACATC-Phos (SEQ ID NO: 81) a 200 nM; GATGTTGCCTCTCTTAATTCCTTG-BHQ1 (SEQ ID NO: 82) a 400 nM

El cebador reverso flanqueante comprende: CGTAGGCTTCATCGAGGATT (SEQ ID NO: 53) a 200 nM.

A veces también se proporciona una pequeña cantidad (~100 nM) de un cebador de avance no marcado (TCTGGATCCCAGAAGGTGAG, SEQ ID NO: 78) para reducir una fuerte señal de ZIPR y ponerla en equilibrio con la
40 señal de iDDS para facilitar la interpretación diagnóstica de la frecuencia del mutante de Del-19.

La PCR en tiempo real se realizó como se describe en el Ejemplo 1 usando dianas genéticas artificiales con y sin eliminación de 9 pb o 15 pb o usando muestras de pacientes con o sin un mutante Del-19 conocido. Si todas las plantillas son silvestres, la señal de iDDS debería ser relativamente equivalente a la señal de la sonda ZIPR, pero si
45 están presentes mutantes Del-19, la señal de iDDS, en comparación con la señal de la sonda ZIPR, debería disminuir significativamente en relación con la frecuencia del mutante. Este resultado esperado se observó en las plantillas y muestras probadas.

La Figura 21 muestra las curvas de un tubo utilizando las dos sondas anteriores y con una plantilla 100% silvestre. La sonda ZIPR muestra una curva positiva que detecta el amplicón direccionado, y la sonda iDDS muestra una curva positiva equivalente ya que todas las plantillas son silvestres. La Figura 22 muestra una curva iDDS disminuida con
50 respecto a la curva de la sonda ZIPR ya que la plantilla es 50% mutante. La Figura 23 muestra una curva de sonda ZIPR positiva y una curva iDDS plana ya que la secuencia silvestre está ausente en el sitio diana Del-19. Este ensayo proporciona así un índice de la frecuencia del mutante Del-19 sin detectar una secuencia mutante específica. La señal ZIPR es consistentemente alta con plantillas silvestres o mutantes, mientras que la altura de la señal de la sonda iDDS varía en proporción a la frecuencia de la plantilla silvestre versus mutante, independientemente del tamaño o la
55 secuencia del presente mutante.

Ejemplo 16

Un ensayo de sonda:antisonda de iDDS para detectar un mutante de base única del exón 20 de EGFR en el codón 790 asociado con la resistencia adquirida a los inhibidores de la tirosina quinasa utilizados para la terapia del cáncer:

Los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas que responden a los inhibidores de la tirosina quinasa suelen recaer después de un año debido a una mutación de EGFR T790M en el exón 20. Esta mutación se debe a un cambio de pares de bases C a T en la segunda letra del codón 790, causando una sustitución sin sentido de treonina por metionina (ACG> ATG). La detección de tales mutantes de bases únicas proporciona así un indicador de diagnóstico para un cambio en la terapia. En este ejemplo, un ensayo de qPCR emplea una sonda:antisonda de iDDS para detectar la presencia de la secuencia mutante de 790M en unas plantillas de EGFR amplificada. Los cebadores y las sondas comprenden:

5 Cebador F: GCATCTGCCTCACCTCCAC (SEQ ID NO: 83) a 200nM; Cebador R-: GTCTTTGTGTTCCCGGACAT (SEQ ID NO: 84) a 200nM

Sonda: FAM-TGAGCTCCATGATGAGTTGCACG-Phos (SEQ ID NO: 85) a 200nM

Antisonda: CGTGCAACTCTTCATGCAGCTCA-BHQ1 (SEQ ID NO: 86) a 400nM

15 Condiciones de ciclización: La PCR en tiempo real se realizó como se describe en el Ejemplo 1. Una curva positiva indica que la secuencia 790M está presente.

Ejemplo 17

Ensayo multiplex para detectar influenza A o B basado en dos composiciones de sonda:antisonda de ZIPR:

Este ensayo emplea dos sondas ZIPR con diferentes marcadores fluorescentes para detectar influenza A o influenza B en una muestra que comprende:

20 Cebador de F: CTTCTAACCGAGGTGCGAAACGTA (SEQ ID NO: 87) a 200nM

Sonda de A: Fam-GCTTTGAGGGGGCCTGA (SEQ ID NO: 88) a 200nM

Antisonda de A: TCAGCCCCCTCAAAGC-BHQ-1 (SEQ ID NO: 89) a 400nM

Cebador de R: CTAATTGTCTCCCTCTTCTGGTGA (SEQ ID NO: 90) a 200nM

Sonda de B: CalRed610-CCCAATTTGGTCAAGAGCAC (SEQ ID NO: 91) a 200nM

25 Antisonda de B: GTGCTGATGACCAAATTGGG-BHQ-2 (SEQ ID NO: 92) a 400nM

Condiciones de ciclización: se llevó a cabo PCR en tiempo real como se describe en el Ejemplo 1. Una curva FAM-positiva indica que está presente la gripe A y una curva positiva de CalRed610 indica que está presente la gripe B.

Ejemplo 18

30 Ensayo múltiple para detectar mutaciones variables en el exón 1 de KRAS, codones 12 y 13, asociado con una respuesta reducida a terapias dirigidas a EGFR en pacientes con cáncer de pulmón y colon.

Este ensayo es similar al esquema de detección de Del-19 y emplea un sistema de sonda ZIPR no específico con marcaje fluorescente HEX y un sistema de sonda iDDS de tipo silvestre con marcaje FAM.

La sonda iDDS comprende:

FAM-CCTACGCCACCAGCTC-Phos (SEQ ID NO. 93) a 200 nM

35 GAGGTGGTGGCGTAGG-BHQ1 (SEQ ID NO. 94) a 400 nM

La sonda ZIPR comprende:

HEX-TGGATCATATTCGTCCACAAAA (SEQ ID NO. 95) a 200 nM

TTTTGAGGACGAATATGATCCA-BHQ1(SEQ ID NO. 96) a 400 nM

El cebador flanqueante es: CCTGCTGAAAATGACTGAATATAAA (SEQ ID NO. 97) a 200 nM

40 Listado de secuencias

<110> Shafer, David

<120> COMPOSICIONES DE SONDA:ANTISONDA PARA DETECCIÓN DE ADN O ARN DE ALTA ESPECIFICIDAD

<130> 410701-2010
 <150> US 61/534,925
 <151> 2011-09-14
 <160> 97
 5 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Sonda VK-1639G
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 15 <223> marcador 5'-FAM
 <400> 1
 cgcaccgccc caatg 15
 <210> 2
 <211> 15
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Antisonda VK-1639G
 <220>
 25 <221> características_misc
 <222> (15)..(15)
 <223> marcador 3'-BHQ1 unido
 <400> 2
 cattcgcccgtg cg 15
 30 <210> 3
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda VK-1639A
 <220>
 <221> características_misc

<222> (1)..(1)
 <223> marcador 5'-FAM unido
 <400> 3
 attggccagg tgcg 14
 5 <210> 4
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Antisonda VK-1639A
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (14)..(14)
 <223> marcador 3'-BHQ1 unido
 15 <400> 4
 cgcacctggc ctat 14
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador de avance VK
 <400> 5
 cctctgggaa gtcaagcaag 20
 25 <210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Cebador reverso VK
 <400> 6
 aaatgctagg attataggcg tga 23
 <210> 7
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

- <223> sonda 858R variante de EGFR
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
- 5 <223> marcador 5'-FAM unido
 <400> 7
 cagattttgg ccgggccaaa ctg 23
 <210> 8
 <211> 23
- 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> antisonda 858R variante de EGFR
 <220>
- 15 <221> características_misc
 <222> (23)..(23)
 <223> marcador 3'-BHQ1 unido
 <400> 8
 cagtttgcc cgccaatat ctg 23
- 20 <210> 9
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 25 <223> Sonda 858L silvestre de EGFR
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> marcador %'-CalRed610 unido
- 30 <400> 9
 cagattttgg gctgaccaaaa ctg 23
 <210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
- 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> antisonda 858L silvestre de EGFR

<220>
 <221> características_misc
 <222> (23)..(23)
 <223> marcador 3'-BHQ2 unido
 5 <400> 10
 cagtttgcc agcccataat ctg 23
 <210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> F2 de cebador de PCR de avance de EGFR
 <400> 11
 gaaaacaccg cagcatgct 19
 15 <210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> R2 de cebador PCR reverso de EGFR
 <400> 12
 ctgcatggta ttcttctct tcc 23
 <210> 13
 <211> 19
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda uidA 0157 mutante
 <220>
 30 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> marcador 5'-FAM unido
 <400> 13
 caccaacgct gctcaattc 19
 35 <210> 14
 <211> 19
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Antisonda mutante
 <220>
 5 <221> características_misc
 <222> (19)..(19)
 <223> marcador 3'-BHQ1 unido
 <400> 14
 gaattgagct gcgttggtg 19
 10 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> cebador PCR de avance de uidA
 <400> 15
 cagtctggat cgcgaaaact g 21
 <210> 16
 <211> 22
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR reverso de uidA
 <400> 16
 25 accagacgtt gccacataa tt 22
 <210> 17
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Sonda específica para Gram positiva
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 35 <223> marcador 5'-FAM unido
 <400> 17
 aaggggcttg atgattgac gt 22

<210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> antisonda especifica para Gram positiva
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (22)..(22)
 10 <223> marcador 3'-BHQ1 unido
 <400> 18
 acgtcaaatttcatgcccc tt 22
 <210> 19
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda especifica para Gram negativa
 <220>
 20 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> marcador 5'-CalRed610 unido
 <400> 19
 aaggccatg atgactga 19
 25 <210> 20
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Antisonda especifica para Gram negativa
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (19)..(19)
 <223> marcador 3'-BHQ2 unido
 35 <400> 20
 tcaagtcttc atggccctt 19
 <210> 21

<211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> cebador PCR de avance
 <400> 21
 tcccgaacg agcgcaac 18
 <210> 22
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR reverso
 <400> 22
 15 cagccattgt agcacgtgtg t 21
 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Sonda ZIPR H3
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 25 <223> marcador 5'-FAM unido
 <400> 23
 ctggtcaga gttcctcaac a 21
 <210> 24
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> antisonda H3 de ZIPR
 <220>
 35 <221> características_misc
 <222> (21)..(21)
 <223> marcador 3'-BHQ1 unido

<400> 24
 tgttgatgaa ctctgaacca g 21
 <210> 25
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador H3
 <400> 25
 10 ccatcaagga tctgatgagg a 21
 <210> 26
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sonda DDS de FLIP
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (23)..(23)
 20 <223> marcador 3'-FAM unido
 <400> 26
 taggaccacg ggatgcatgt ctt 23
 <210> 27
 <211> 40
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> antisonda FLIP/cebador de avance
 <220>
 30 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> marcador 5'-dT-BHQ1 unido
 <220>
 <221> características_misc
 35 <222> (20)..(22)
 <223> n = espaciador 9, nucleótido o no nucleótido
 <400> 27

aagacatgca tcccgtggtg gggataagcc tgggaaactg 40
 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda Taqman
 <220>
 <221> características_misc
 10 <222> (1)..(1)
 <223> marcador 5'-FAM unido
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (20)..(20)
 15 <223> marcador 3'-BHQ1 unido
 <400> 28
 catgtcttgt ggtggaaagc 20
 <210> 29
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador PCR de avance
 <400> 29
 25 gggataagcc tgggaaactg 20
 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Cebador PCR reverso
 <400> 30
 accccaccaa caagctgata 20
 <210> 31
 35 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador/sonda de GF
 <220>
 <221> características_misc
 5 <222> (1)..(1)
 <223> marcador 5'-FAM unido
 <400> 31
 ccctccasa craggagggg gccgctgctg ggggtgac 38
 <210> 32
 10 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador reverso
 15 <400> 32
 cacgctcatg tgacagacc 19
 <210> 33
 <211> 19
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> sonda iDDS
 <220>
 <221> características_misc
 25 <222> (1)..(1)
 <223> marcador 5'-CalFluorRed610 unido
 <400> 33
 cggggtgac ccactagcg 19
 <210> 34
 30 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Antisonda
 35 <220>
 <221> características_misc
 <222> (19)..(19)

<223> marcador 3'-BHQ2 unido
 <400> 34
 cgcttggtggg tctaccccg 19
 <210> 35
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador de avance
 10 <400> 35
 gctcgtggac ataccgattt 20
 <210> 36
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> sonda iDDS de inhA
 <220>
 <221> características_misc
 20 <222> (1)..(1)
 <223> marcador 5'-CalRed610 unido
 <400> 36
 ccgacaacct atcgtctcgc c 21
 <210> 37
 25 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> antisona inhA
 30 <220>
 <221> características_misc
 <222> (19)..(19)
 <223> marcador 3'-BHQ2 unido
 <400> 37
 35 cgagacgata ggtgtcgg 19
 <210> 38
 <211> 38

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador sonda G-Force de InhA
 5 <220>
 <221> características_misc
 <222> (8)..(8)
 <223> spacer 18 inserted
 <220>
 10 <221> características_misc
 <222> (9)..(9)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 38
 ccctccana ggagggggtc cgtaaccag gactgaac 38
 15 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> FI de cebador de avance exterior de EGFR
 <400> 39
 agccaggaac gtactggtga 20
 <210> 40
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> R1 de cebador reverso exterior de EGFR
 <400> 40
 30 tgcctcctc tgcattgtat 20
 <210> 41
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de bloqueo Terminadora
 <220>

<221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-biotina unido
 <400> 41
 5 cttcccacc aacgcagatc aattcca 27
 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> GAPDH-Cy3F1
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 15 <223> marcador 5'-cy3 unido
 <400> 42
 gagtcaacgg atttggctgt 20
 <210> 43
 <211> 12
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> GAPDH-BHQ2
 <220>
 25 <221> características_misc
 <222> (12)..(12)
 <223> marcador 3'-BHQ2 unido
 <400> 43
 atccgttgac tc 12
 30 <210> 44
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> GAPDH-T7R1
 <400> 44
 aattctaata cgactcacta tagggagaag ggacaagctt cccgttctca g 51

<210> 45
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> GAPDH-T7F1
 <400> 45
 aattctaata cgactcacta tagggagaag ggagtaacg gatttggtcg t 51
 <210> 46
 10 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> GAPDH-R1
 15 <400> 46
 aattctaata cgactcacta tagggagaag ggacaagctt cccgttctca g 51
 <210> 47
 <211> 27
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> sonda iDDS de GDH
 <220>
 <221> características_misc
 25 <222> (1)..(1)
 <223> marcador 5'-FAM unido
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (27)..(27)
 30 <223> 3'-amino terminal
 <400> 47
 ccttcattga cctcaactac atggamn 27
 <210> 48
 <211> 15
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> antisonda iDDS de GDH
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (15)..(15)
 5 <223> marcador 3'-BHQ1 unido
 <400> 48
 tgaggccaat gaagg 15
 <210> 49
 <211> 51
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> GDH-R1s
 <220>
 15 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino espaciador18 unido
 <400> 49
 atttctaata cgactcacta tagggagaag ggacaagctt cccgttctca g 51
 20 <210> 50
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Rab9-R1s
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-amino-espaciador18 unido
 30 <400> 50
 atttctaata cgactcacta tagggagaag gaaatggtgt cctcaggctt c 51
 <210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> GDHCy3F1

<220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-Cy3 unido
 5 <400> 51
 gagtcaacgg atttggtcgt 20
 <210> 52
 <211> 47
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Rab9-FAM-T7F1
 <220>
 <221> características_misc
 15 <222> (1)..(1)
 <223> marcador 5'-FAM unido
 <400> 52
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gcaatggcag gaaaatc 47
 <210> 53
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador reverso no específico
 25 <400> 53
 cgtaggcttc atcgaggatt 20
 <210> 54
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda solo silvestre ZIPR reverso
 <220>
 <221> características_misc
 35 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-Quasar670
 <400> 54

tcggagatgt tgcttctctt aa 22
 <210> 55
 <211> 22
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Antisonda solo silvestre ZIPR reverso
 <220>
 <221> características_misc
 10 <222> (22)..(22)
 <223> marcador 3'-BHQ2 unido
 <400> 55
 ttaagagatg caacatctcc ga 22
 <210> 56
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda ZIPR de avance
 20 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> marcador 5'-CalRed610 unido
 <400> 56
 25 tctggatccc agaaggtgag 20
 <210> 57
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Antisonda ZIPR de avance
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (20)..(20)
 35 <223> marcador 3'-BHQ2 unido
 <400> 57
 ctcaccttct gggttccaga 20

ES 2 684 525 T3

<210> 58
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Segmento diana silvestre de VKORC1
 <400> 58
 actcgggtggc gtggccggt taccaacaa 29
 <210> 59
 10 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Segmento diana variante de VKORC1
 15 <400> 59
 actcgggtggc gtggaccggt taccaacaa 29
 <210> 60
 <211> 83
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cadena en sentido mutante de bp2535-2616 de EGFR
 <400> 60
 tgaaaacacc gcagcatgtc aagatcacag attttgggcy ggccaaactg ctgggtgcgg 60
 aagagaaaga ataccatgca gaa 83
 25 <210> 61
 <211> 83
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> cadena antisentido mutante bp2535-2616 de EGFR
 <400> 61
 ttctgcatgg tattctttct cttccgcacc cagcagtttg gcccgcccaa aatctgtgat 60
 cttgacatgc tcgcctgttt tca 83
 <210> 62
 <211> 83
 35 <212> ADN

ES 2 684 525 T3

```

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cadena en sentido silvestre de bp2535-2616 858R de EGFR
<400> 62
    tgaaaacacc gcagcatgtc aagatcacag attttgggct ggccaaactg ctgggtgcfg      60
5   aagagaaaga ataccatgca gaa                                             83
<210> 63
<211> 83
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
10  <220>
    <223> cadena antisentido silvestre 858R de bp2535-2616 de EGFR
    <400> 63
    ttctgcatgg tattctttct cttccgcacc cagcagtttg gccagcccaa aatctgtgat      60
    cttgacatgc tcgcctgttt tca                                             83
<210> 64
15  <211> 21
    <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
    <223> sonda CY2-W
20  <400> 64
    cattgaggac cgtgtcaag a          21
    <210> 65
    <211> 21
    <212> ADN
25  <213> Secuencia Artificial
    <220>
    <223> antisonda CY2-w
    <400> 65
    tctgaacac ggtcctctat g          21
30  <210> 66
    <211> 23
    <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
35  <223> sonda CY2-M

```

<400> 66
 ctcttgaaca cagacctcaa tgc 23
 <210> 67
 <211> 23
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> antisonda CY2M
 <400> 67
 10 gcattgagga ctgtttcat gag 23
 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador CY2F
 <400> 68
 aatthtggga tggggaagag 20
 <210> 69
 20 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador CY2R
 25 <400> 69
 gttttctca actcctccac aagg 24
 <210> 70
 <211> 24
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> sonda CY3w
 <400> 70
 gagaaggatca atgaatctct ggac 24
 35 <210> 71
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> antisonda CY3w
 <400> 71
 5 gtcctgagat acattgacct tctc 24
 <210> 72
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> sonda CY3M
 <400> 72
 agaaggtcaa ggaatctctg gac 23
 <210> 73
 15 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> antisonda CY3M
 20 <400> 73
 gtcctgagat accttgacct tct 23
 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador CY3F
 <400> 74
 ccacatgccc tacacagatg 20
 30 <210> 75
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> cebador CY3R
 <400> 75
 ccttggaat gagatagttt ctgaa 25

<210> 76
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> PANTILLA 858 MUTANTE PARCIAL
 <400> 76
 gcaccagca gttggcccg cccaaaatct gtgatctga catgctgcc tgtttca 58
 <210> 77
 10 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> PLANTILLA 858 SILVESTRE PARCIAL
 15 <400> 77
 gcaccagca gttggccag cccaaaatct gtgatctga catgctgcc tgtttca 58
 <210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador de avance de EGFR Del-19 del
 <400> 78
 tctggatccc agaagtgag 20
 25 <210> 79
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> cebador-sonda exon 21 de EGFR
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> marcador 5'-CalRed610 unido
 35 <400> 79
 tgaaaacacc gcagcatgt 19
 <210> 80

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> antisonda exon 21 de EGFR
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (19)..(19)
 <223> marcador 3'-BHQ2 unido
 10 <400> 80
 acatgctgtg gtgtttca 19
 <210> 81
 <211> 24
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> sonda iDDS de EGFR Del-19 del
 <220>
 <221> características_misc
 20 <222> (1)..(1)
 <223> sonda 5'-FAM unida
 <400> 81
 caaggaatta agagaagcaa catc 24
 <210> 82
 25 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> antisonda iDDS de EGFR Del-19 del
 30 <220>
 <221> características_misc
 <222> (24)..(24)
 <223> marcador 3'-BHQ1 unido
 <400> 82
 35 gatgtgcct ctcttaattc cttg 24
 <210> 83
 <211> 19

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador TM790 F de EGFR
 5 <400> 83
 gcatctgcct cacctcac 19
 <210> 84
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador TM790 R de EGFR
 <400> 84
 gtctttgtgt tcccgacat 20
 15 <210> 85
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Sonda de IDDS TM790 de EGFR
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> marcador 5'-FAM unido
 25 <400> 85
 tgagctccat gatgagttgc acg 23
 <210> 86
 <211> 23
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Antisonda de IDDS TM790 de EGFR
 <220>
 <221> características_misc
 35 <222> (23)..(23)
 <223> marcador 3'-BHQ1 unido
 <400> 86

cgtgcaactc tcatgcagc tca 23
 <210> 87
 <211> 23
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador A F de gripe Zipr
 <400> 87
 ctctaacgc aggtcgaac gta 23
 10 <210> 88
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Sonda
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> marcador 5'-FAM unido
 20 <400> 88
 gcttgaggg ggcctga 17
 <210> 89
 <211> 17
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Antisonda
 <220>
 <221> características_misc
 30 <222> (17)..(17)
 <223> marcador 3'-BHQ1 unido
 <400> 89
 tcagccccc tcaaagc 17
 <210> 90
 35 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador B R de Gripe Zipr
 <400> 90
 ctaattgtct ccctctctg gtga 24
 5 <210> 91
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Sonda
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Marcador CalRed610 unido
 15 <400> 91
 cccaatttgg tcaagagcac 20
 <210> 92
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Antisonda
 <220>
 <221> características_misc
 25 <222> (20)..(20)
 <223> marcador 3'-BHQ2 unido
 <400> 92
 gtgctgatga ccaaattggg 20
 <210> 93
 30 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> KRAS iDDS P
 35 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)

<223> marcador 5'-FAM unido
 <400> 93
 cctacgccac cagctc 16
 <210> 94
 5 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> KRAS iDDS A
 10 <220>
 <221> características_misc
 <222> (16)..(16)
 <223> marcador 3'-BHQ1 unido
 <400> 94
 15 gaggtggtgg cgtagg 16
 <210> 95
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> KRAS ZIPR P
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 25 <223> 5'-HEX unido
 <400> 95
 tggatcatat tegtccacaa aa 22
 <210> 96
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> KRAS ZIPR P
 <220>
 35 <221> características_misc
 <222> (22)..(22)
 <223> 3'-BHQ1 unido

<400> 96

tttgaggac gaatatgac ca 22

<210> 97

<211> 25

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador flanqueante KRAS

<400> 97

10 cctgctgaaa atgactgaat ataaa 25

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para detectar selectivamente una secuencia de nucleótidos diana, comprendiendo dicho sistema al menos un sistema de sonda:antisonda que comprende;
 - 5 (a) un oligonucleótido de sonda que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una primera secuencia de nucleótidos diana, y una primera unidad estructural de marcador unida a la misma; y
 - (b) un oligonucleótido antisonda que comprende una secuencia de nucleótidos completamente complementaria al oligonucleótido de sonda excepto por al menos una base no coincidente en una posición no terminal, y una segunda unidad estructural de marcador, en donde la segunda unidad estructural de marcador está unida al oligonucleótido antisonda o es una región del oligonucleótido antisonda, en donde:
 - 10 (i) el oligonucleótido de sonda está configurado para una mayor afinidad de hibridación para la primera secuencia de nucleótidos diana en comparación con el oligonucleótido antisonda; y el oligonucleótido antisonda está configurado para una mayor afinidad de hibridación para el oligonucleótido de sonda en comparación con el oligonucleótido de sonda que tenga afinidad de hibridación por una segunda secuencia de nucleótidos diana de interés;
 - 15 (ii) en presencia de la primera secuencia de nucleótidos diana, el oligonucleótido de sonda y la primera secuencia de nucleótidos diana forman un dúplex, con lo que las primera y segunda unidades estructurales de marcador no interactúan, proporcionando de ese modo una primera señal detectable;
 - (iii) en ausencia de la primera secuencia de nucleótidos diana, el oligonucleótido de sonda y el oligonucleótido antisonda forman un dúplex, permitiendo así que las primera y segunda unidades estructurales de marcador interactúen para proporcionar una señal detectable modulada, en donde la primera y las señales detectables moduladas son distinguibles; y
 - (iv) en presencia de la segunda secuencia de nucleótidos diana que difiere de la primera secuencia diana por al menos una no coincidencia de bases, el oligonucleótido de sonda y el oligonucleótido antisonda forman preferentemente un dúplex, inhibiendo así que el oligonucleótido de sonda forme un dúplex con la segunda secuencia de nucleótidos diana.
- 25 2. Sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el dúplex del oligonucleótido de sonda y la primera secuencia de nucleótidos diana, y el dúplex del oligonucleótido de sonda y el oligonucleótido antisonda difieren en al menos aproximadamente 2 kcal/mol en ΔG y al menos aproximadamente 4 °C en T_m ; y donde el dúplex del oligonucleótido de sonda y la segunda secuencia de nucleótidos diana, y el dúplex del oligonucleótido de sonda y la primera secuencia de nucleótidos diana difieren en al menos aproximadamente 4 kcal/mol en ΔG y al menos aproximadamente 8°C en T_m .
 - 30 3. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de oligonucleótidos de sonda está configurada con una posición de base no coincidente aproximadamente a dos bases de distancia de una no coincidencia esperada entre la segunda secuencia de nucleótidos diana y la secuencia de la sonda; por lo que dichas dos bases no coincidentes generan una región interna no hibridada de dos o tres bases del dúplex de oligonucleótido de sonda:
 - 35 segunda secuencia de nucleótidos diana, teniendo dicho dúplex un ΔG y T_m menor que el ΔG y la T_m del dúplex de oligonucleótido de sonda:oligonucleotídico antisonda.
 - 40 4. El sistema de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en donde una unidad estructural de marcador es un emisor de fluorescencia, y la otra unidad estructural de marcador comprende un modulador de fluorescencia; en donde el modulador de fluorescencia se selecciona del grupo que consiste en: un compuesto detenedor, un compuesto fluorescente, una partícula metálica y un conjugado rico en guanina.
 5. El sistema de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en donde el oligonucleótido de sonda comprende un emisor de fluorescencia y bien sea un modulador de fluorescencia o un segundo emisor fluorescente, y en donde el oligonucleótido antisonda comprende un modulador de fluorescencia y opcionalmente comprende un emisor de fluorescencia o un segundo modulador de fluorescencia.
 - 45 6. El sistema de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el oligonucleótido antisonda se combina con un ensayo de sonda Taqman o Molecular Beacon; en donde el oligonucleótido antisonda comprende un modulador de fluorescencia y comprende una secuencia parcialmente complementaria a una sonda Taqman o Molecular Beacon.
 - 50 7. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente un segundo oligonucleótido de sonda, en donde dichos primero y segundo oligonucleótidos de sonda se hibridan selectivamente con diferentes secuencias de nucleótidos diana de una plantilla de ácido nucleico; y en donde los dos oligonucleótidos de sonda proporcionan dos señales detectables diferentes o la misma señal detectable; en donde
 - (i) el primer oligonucleótido de sonda comprende un cebador-sonda que está configurado para cooperar con un oligonucleótido cebador para amplificar un primer amplicón con un primer marcador, proporcionando así una señal con respecto a la frecuencia de amplicón, y

- (ii) el segundo oligonucleótido de sonda es bien sea un segundo cebador-sonda o una sonda interna que comprende un segundo marcador y una secuencia complementaria a una secuencia diana que comprende un segmento de secuencia variable del primer amplicón, o una secuencia variable en otros sitios en una plantilla de ácido nucleico; con lo que la diferencia en la señalización entre el primer cebador-sonda y la segunda sonda proporciona un indicador de la frecuencia de la secuencia de variante con respecto a la frecuencia del primer amplicón; o
- 5 una sonda de terminación de bloqueo no marcada para suprimir selectivamente la amplificación de qPCR y la detección de una primera secuencia diana versus una segunda secuencia diana; en donde la sonda de terminación comprende:
- (i) un oligonucleótido complementario a la primera secuencia de nucleótidos diana,
- 10 (ii) un extremo 5' modificado para resistir la digestión con exonucleasa,
- (iii) un extremo 3' modificado para resistir la extensión de la polimerasa, y
- (iv) donde la sonda de terminación está configurada además con una T_m y un ΔG que excede la T_m y el ΔG de los cebadores y/o sondas del ensayo de qPCR en al menos aproximadamente 5 kcal/mol en ΔG y en al menos aproximadamente 5°C en T_m .
- 15 8. Sistema de acuerdo con la reivindicación 7, en donde al menos uno del oligonucleótido de sonda y el oligonucleótido antisonda comprende al menos uno de: un nucleótido no natural, un aglutinante de surco menor (MGB) y un ácido nucleico de Zip (ZNA).
9. Sistema de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el sistema que comprende una segunda sonda está configurado para detectar una eliminación variable de múltiples bases dentro de los codones 746 a 753 del exón 19 del gen EGFR, comprendiendo dicho sistema al menos un cebador no marcado, y dos sistemas de sonda:antisonda con diferentes marcaciones; en donde el primer sistema de sonda comprende un cebador-sonda complementario a una primera secuencia no específica; en donde el segundo sistema de sonda es complementario a la secuencia silvestre en el sitio de eliminación del exón 19 e inhibe o excluye la detección de plantillas diana que comprenden una eliminación de múltiples bases dentro de los codones 746 a 753 del exón 19 del gen EGFR; con lo que se evalúa la presencia y la frecuencia de una eliminación de exón 19 comparando la señalización relativa de los dos sistemas de sonda; y en donde el conjunto de sonda:antisonda-cebador no específico es SEQ ID NOs.: 56, 57 y 53, o SEQ ID NOs.: 79, 80 y 12; y en donde el conjunto de sonda:antisonda-cebador solo silvestre de eliminación-19 es SEQ ID NOs.: 81, 82 y 53, o SEQ ID NOs.: 54, 55 y 53, y en donde cada conjunto de sonda:antisonda-cebador no específico y el conjunto de sonda-antisonda-cebador solo silvestre de eliminación-19 puede incluir opcionalmente cebador suplementario de SEQ ID NO.: 78.
- 20 10. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho sistema se selecciona del grupo que consiste en:
- a) una sonda iDDS, en donde el extremo 3' del oligonucleótido de sonda, y opcionalmente el oligonucleótido antisonda, se bloquea para prevenir la extensión de la polimerasa; y en donde el sistema comprende además un par de cebadores flanqueantes configurados para amplificar una región de ácido nucleico que comprende la primera secuencia de nucleótidos diana;
- 25 b) una sonda Flip, en donde el oligonucleótido antisonda comprende además, en el extremo 3' del mismo, un primer oligonucleótido cebador; en donde, opcionalmente, el oligonucleótido antisonda y el primer oligonucleótido cebador están enlazados por una región espaciadora abásica; y el sistema comprende además un segundo oligonucleótido cebador, en donde el primero y el segundo oligonucleótidos cebador están configurados para amplificar una región de ácido nucleico que comprende la primera secuencia de nucleótidos diana;
- 30 c) una sonda ZIPR que comprende un sistema de detección de amplicón de cebador-sonda, en donde el oligonucleótido de sonda comprende una secuencia cebadora y está configurado para cooperar con un oligonucleótido cebador para amplificar una secuencia de nucleótidos diana, tras lo cual se genera una señal detectable cuando se incorpora el oligonucleótido de sonda en un amplicón; y
- 35 d) un cebador-sonda G-Force que comprende: (i) un segmento de sonda marcado fluorescente en 5' que comprende una secuencia rica en citosina de aproximadamente 7 a 9 bases, (ii) un espaciador abásico, (iii) una secuencia de antisonda rica en guanina complementaria a la región de secuencia rica en citosina, y (iv) una secuencia de cebador; con lo cual, cuando se incorpora el oligonucleótido cebador-sonda marcado en los amplicones generados, se habilita una señal detectable.
- 40 11. Sistema de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además un sistema de amplificación isotérmica ISAM adecuado para amplificar y detectar una secuencia diana de ARN o ADN, en donde el oligonucleótido cebador-sonda está configurado para cooperar con un cebador flanqueante para amplificar la secuencia diana; en donde el cebador flanqueante o el oligonucleótido cebador-sonda o ambos comprenden además una secuencia promotora de ARN polimerasa 5'; y en donde el sistema de amplificación-detección comprende además una enzima promotora de ARN polimerasa, una enzima transcriptasa reversa y una enzima RNasaH; y en donde un oligonucleótido antisonda
- 45 50 55

- comprende opcionalmente una secuencia complementaria a la secuencia promotora de ARN polimerasa; y en donde dichos oligonucleótidos cebador-sonda están configurados para comprender uno o ambos cebadores; con lo que la señalización y la transcripción del ARN se proporcionan desde uno o ambos extremos del amplicón; y opcionalmente, se fija un cebador a un sustrato sólido; o
- 5 en donde cuando el sistema es una sonda iDDS, el oligonucleótido de la sonda iDDS es complementario a una secuencia diana interna que comprende de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud; el oligonucleótido antisonda comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 nucleótidos de longitud; y uno o dos de los cebadores flanqueantes comprenden además una secuencia promotora de ARN polimerasa 5'; y un sistema de amplificación-detección que comprende una enzima promotora de ARN polimerasa, una enzima transcriptasa reversa y una enzima RNasaH; y, opcionalmente, se fija un cebador a un sustrato sólido.
- 10 12. El sistema de acuerdo con la reivindicación 10 para mejorar la detección de la primera secuencia diana, en donde la sonda iDDS a) es complementaria a la primera secuencia de nucleótidos diana, comprendiendo dicho sistema además una sonda de terminación de bloqueo no marcada que comprende:
- 15 (i) un oligonucleótido complementario a la segunda secuencia de nucleótidos diana que es sustancialmente similar pero no idéntica a la primera secuencia de nucleótidos diana;
- (ii) un extremo 5' modificado resistente a la digestión con exonucleasa;
- (iii) un extremo 3' modificado resistente a la extensión de la polimerasa; o
- (iv) uno o más nucleótidos no naturales opcionales o un aglutinante de surco menor opcional (MGB) o una combinación de los mismos;
- 20 en donde la sonda de terminación de bloqueo está configurada para comprender una T_m y un ΔG que difiere de la T_m y el ΔG de la sonda iDDS a) en al menos 4 kcal/mol en ΔG y en al menos 6°C en T_m .
13. El sistema de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el sistema es la sonda iDDS configurada para detectar una posición de base nucleotídica variable del exón 21 del gen EGFR, comprendiendo dicho sistema los oligonucleótidos SEQ ID NOs.: 7-12 y 39-41.
- 25 14. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el sistema de sonda:antisonda está configurado para detectar una variante de nucleótidos del exón 19, 20 o 21 del gen EGFR, un gen VKORC1, un gen CYP2C9, un gen uidA de E. coli, un gen de bacterias gram positivas 16s, un gen de bacterias gram negativas 16s, un gen mycobacterium inhA, un gen mycobacterium rpoB, un gen mycobacterium 16S, un gen de hemaglutinina (HA) del virus de la influenza, un gen de matriz (M) del virus de la influenza A, un gen no estructural (NS) del virus de la
- 30 influenza B y un gen KRAS.
15. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el sistema de sonda:antisonda comprende las secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NOs.: 1 y 2, SEQ ID NOs.: 3 y 4, SEQ ID NOs.: 7 y 8, SEQ ID NOs.: 9 y 10, SEQ ID NOs.: 13 y 14, SEQ ID NOs.: 17 y 18, SEQ ID NOs.: 19 y 20, SEQ ID NOs.: 23 y 24, SEQ ID NOs.: 36 y 37, SEQ ID NOs.: 54 y 55, SEQ ID NOs.: 56 y 57, SEQ ID NOs.: 64 y 65, SEQ ID NOs.: 66 y 67, SEQ ID NOs.: 70 y 71, SEQ ID NOs.: 72 y 73, SEQ ID NOs.: 79 y 80, SEQ ID NOs.: 81 y 82, SEQ ID NOs.: 85 y 86, SEQ ID NOs.: 88 y 89, y SEQ ID NOs.: 91 y 92.
- 35

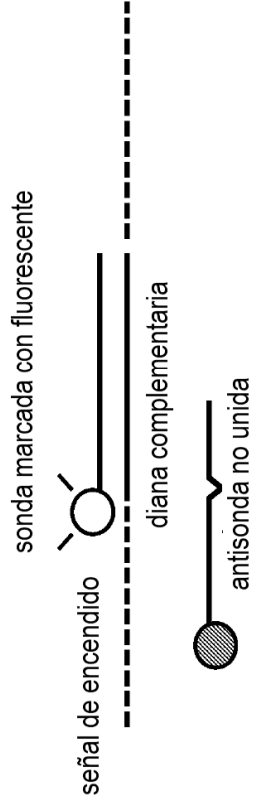
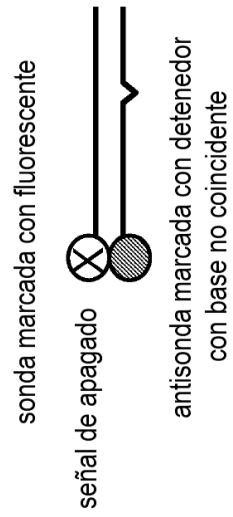


Fig. 1A

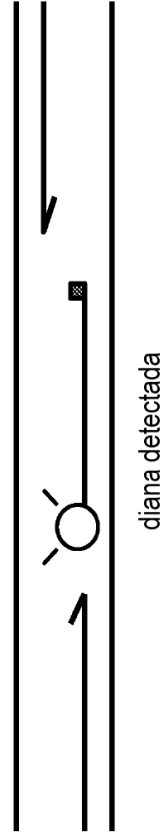
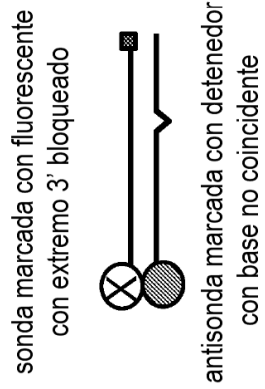


Fig. 1B

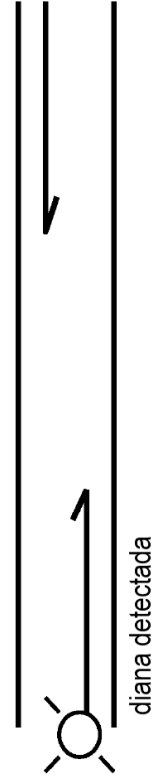
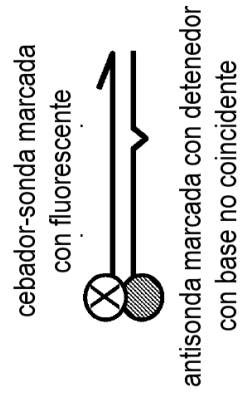


Fig. 1C

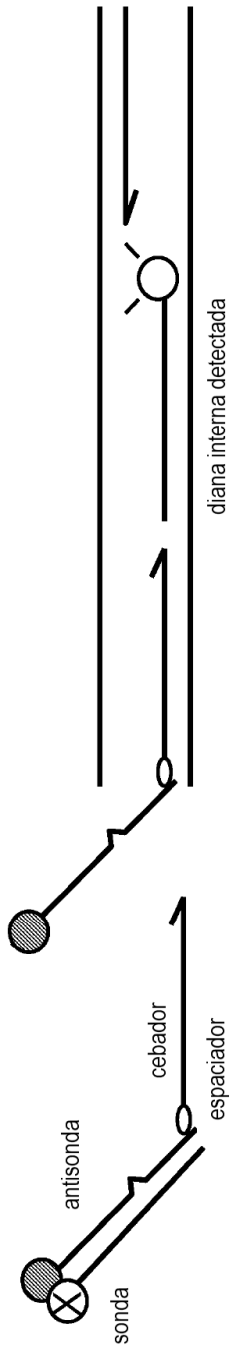


Fig. 2A

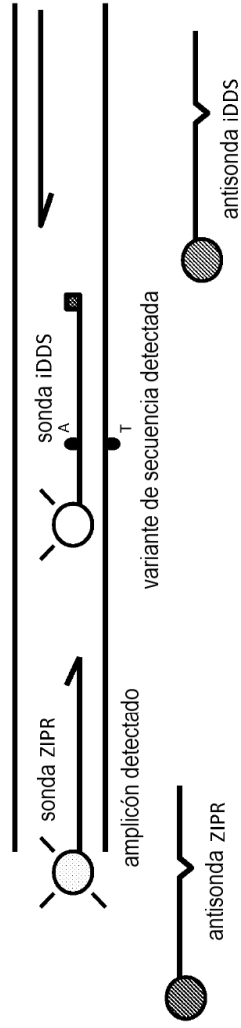


Fig. 2B

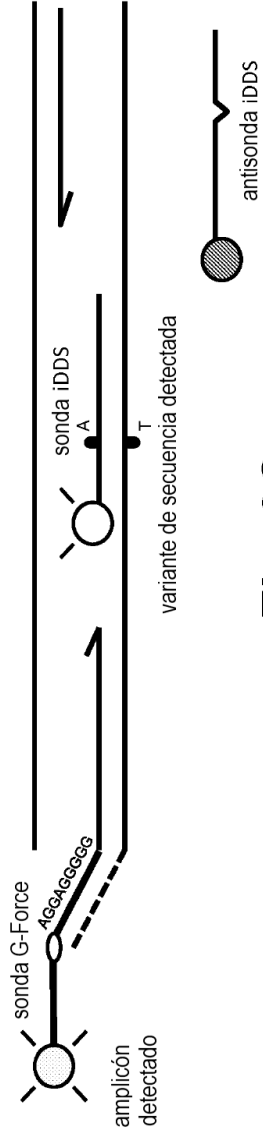
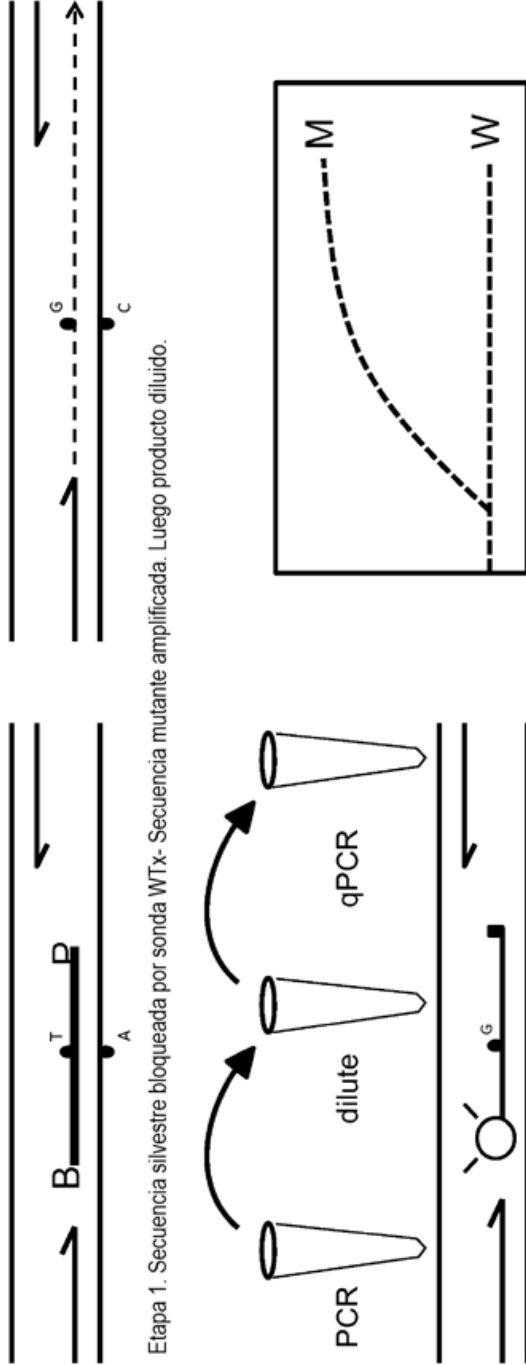


Fig. 2C



Etapa 2: qPCR: amplificación y detección temprana de variante de mutante, mientras el tipo silvestre está bloqueado

Fig. 3A



Una etapa: Secuencia silvestre parcialmente bloqueada. Secuencia mutante amplificada preferencialmente.

Fig. 3B

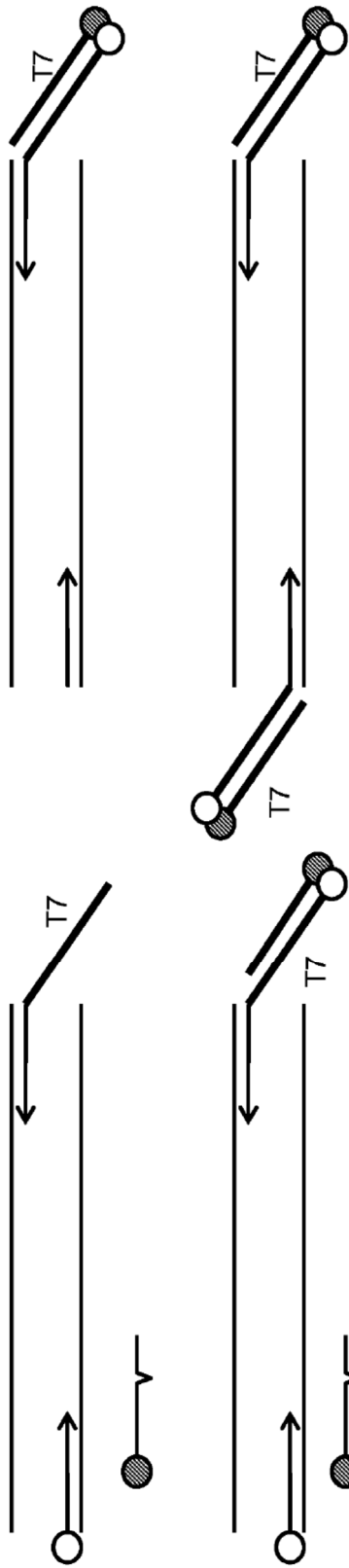


Fig. 4A

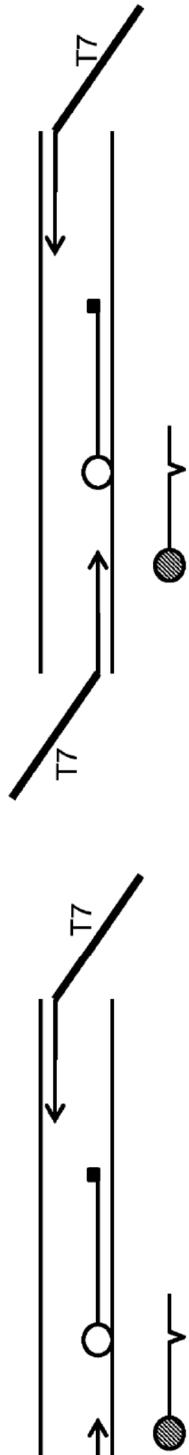


Fig. 4B

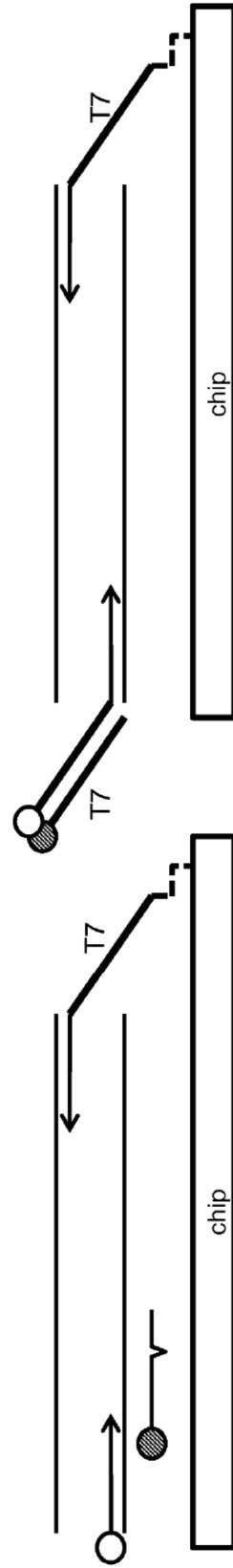


Fig. 4C

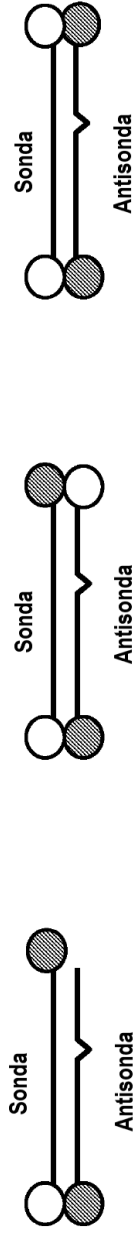


Fig. 5

Sitio de SNP VKORC1
 Dúplex de Sonda:Diana silvestre
 Tm & ΔG Máximo

5'-Marcador- CGCACCC**CGGGCC**AAATG-Phos-3' (SEQ ID NO.: 1)
 ACTCGGTGGCGTGG**CCCGGTTACCA**CAA (SEQ ID NO.: 58)

Dúplex de sonda:antisonda
 Tm & ΔG reducidos
 Tm: -6.2 °C
 ΔG: -2.4 kcal/mol

5'-Marcador- CGCACCC**CGGGCC**AAATG-Phos-3' (SEQ ID NO.: 1)
 3'-Detenedor- GCGTGG**CCCG** TTAC-5' (SEQ ID NO.: 2)
 C

Dúplex de Sonda:Diana variante
 Tm & ΔG reducidos adicionalmente
 Tm: -5.7 °C
 ΔG: -2.1 kcal/mol

5'-marcador- CGCACCC **CGGGCC**AAATG-Phos-3' (SEQ ID NO.: 1)
 ACTCGGTGGCGTGG**A**CCCGGTTACCACAA (SEQ ID NO.: 59)
 C

Fig. 6

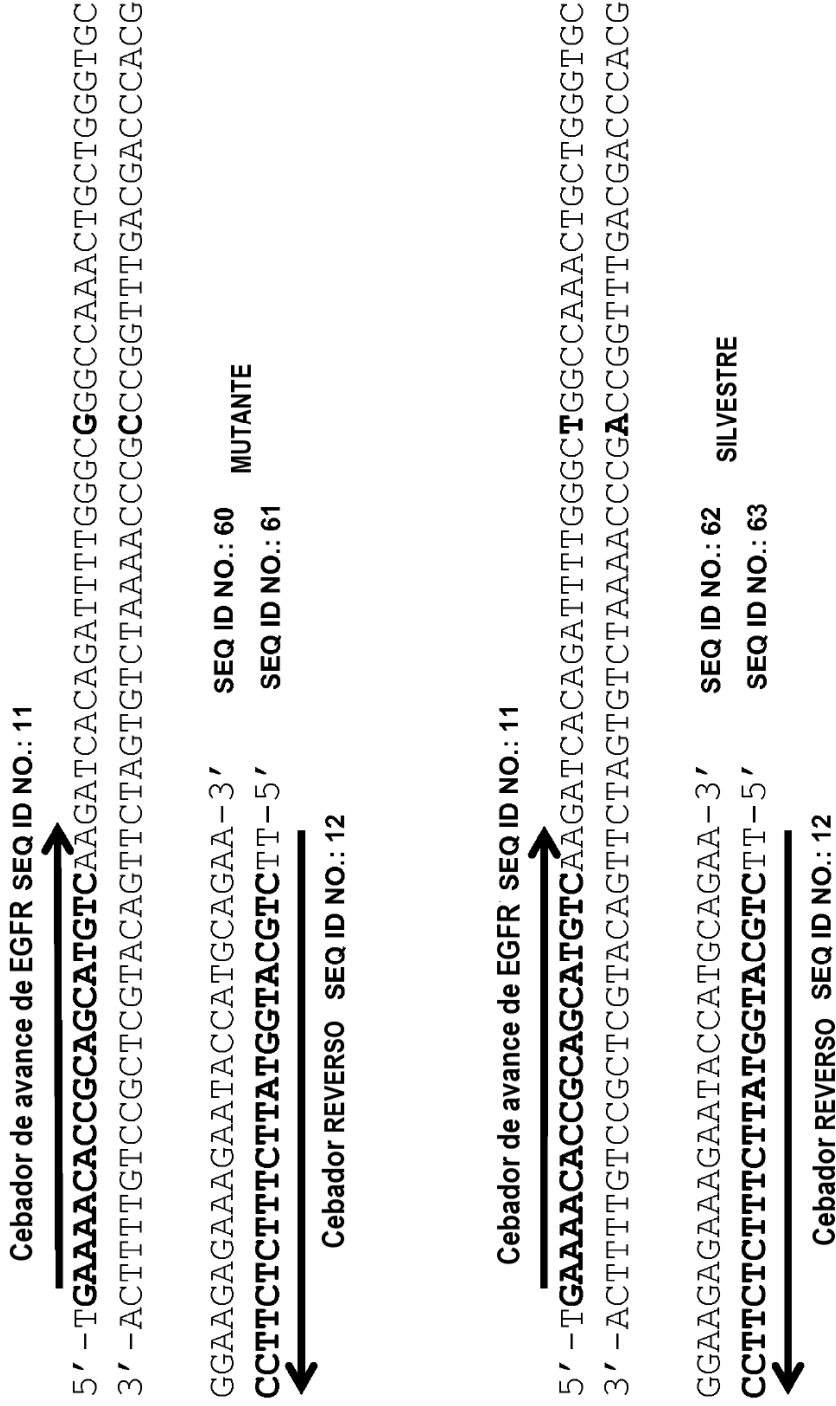


Fig. 7A

Fluorescencia
 \swarrow
 (SEQ ID NO.: 7) sonda 858R FAM-CAGATTTGG ^CCGGCCAAACTG-Phos
 3'-ACTTTTGTCCGCTCGTACAGTTCTAGTGTCTAAAACCCCGCCCGGTTTGACGCCACCCACG
 SEQ ID NO.: 76

SEQ ID NO.: 2 antisonda 858R BHQ1-GTCTATAACCCGCCCGGTTTGAC

ΔG_1 16.3; Tm_1 77.8 (sonda:diana 858R)

Fluorescencia
 \swarrow
 (SEQ ID NO.: 7) sonda 858R FAM-CAGATTTGG ^CCGGCCAAACTG-Phos
 antisonda 858R BHQ1-GTCTA ^TAA~~CCCGCCCGGTTTGAC~~
 Señal reducida

ΔG_2 13.6; Tm_2 72.1 (sonda:antisonda)

$\Delta G_1 > \Delta G_2$ -2.7; $Tm_1 > Tm_2$ -5.7

Fluorescencia
 \swarrow
 (SEQ ID NO.: 7) sonda 858R FAM-CAGATTTGG ^{CCG}GGCCAAACTG-Phos
 3'-ACTTTTGTCCGCTCGTACAGTTCTAGTGTCTAAAACCCCG~~AA~~CCCGGTTTGACGCCACCCACG
 SEQ ID NO.: 77

SEQ ID NO.: 2 antisonda 858R BHQ1-GTCTATAACCCGCCCGGTTTGAC

ΔG_3 11.0; Tm_3 64.4 (sonda:diana 858L)

$\Delta G_1 > \Delta G_3$ -5.3; $Tm_1 > Tm_3$ -13.4

Fig. 7B

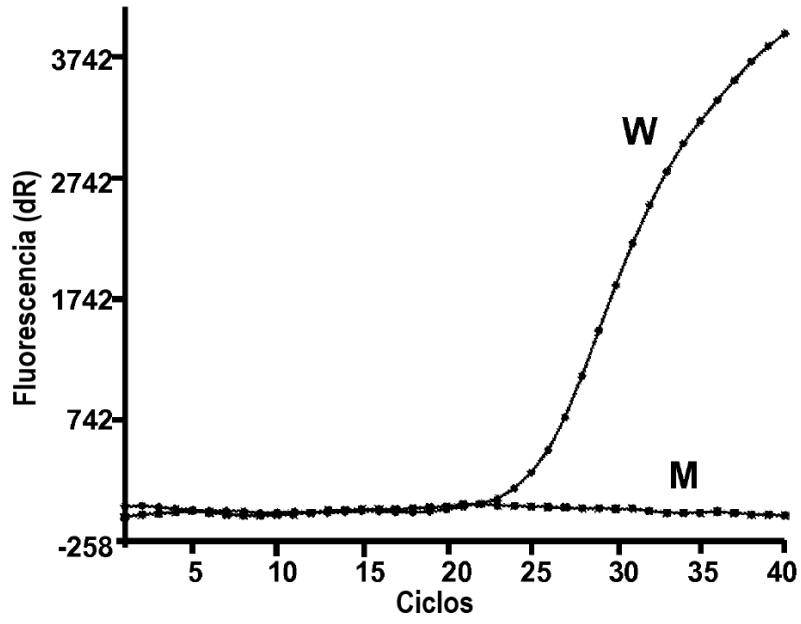


Fig. 8A

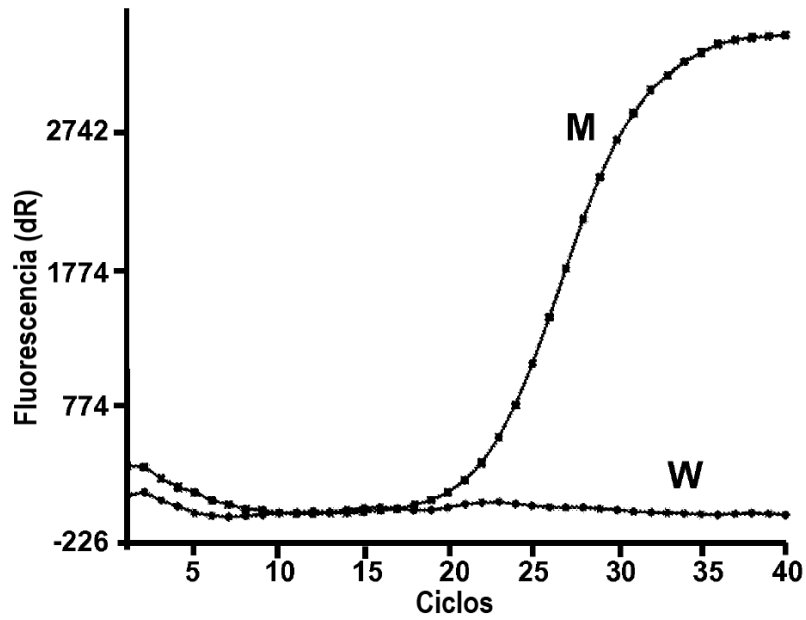


Fig. 8B

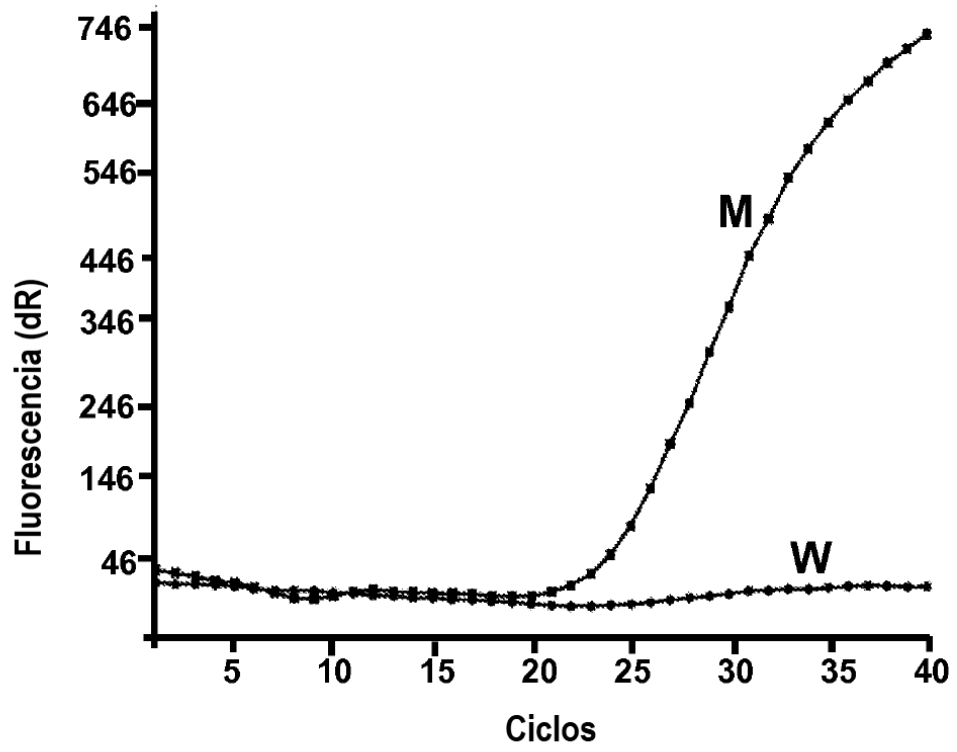


Fig. 9

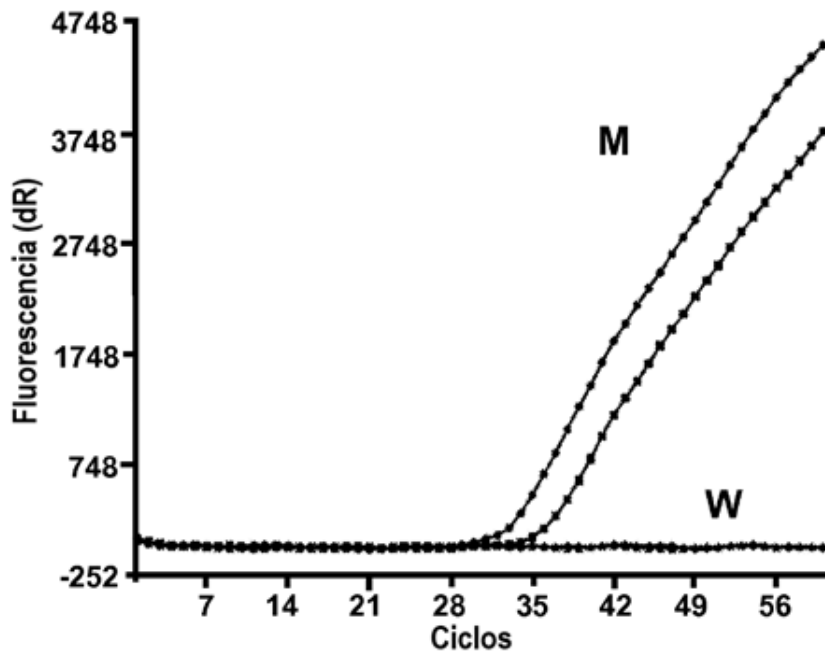


Fig. 10A

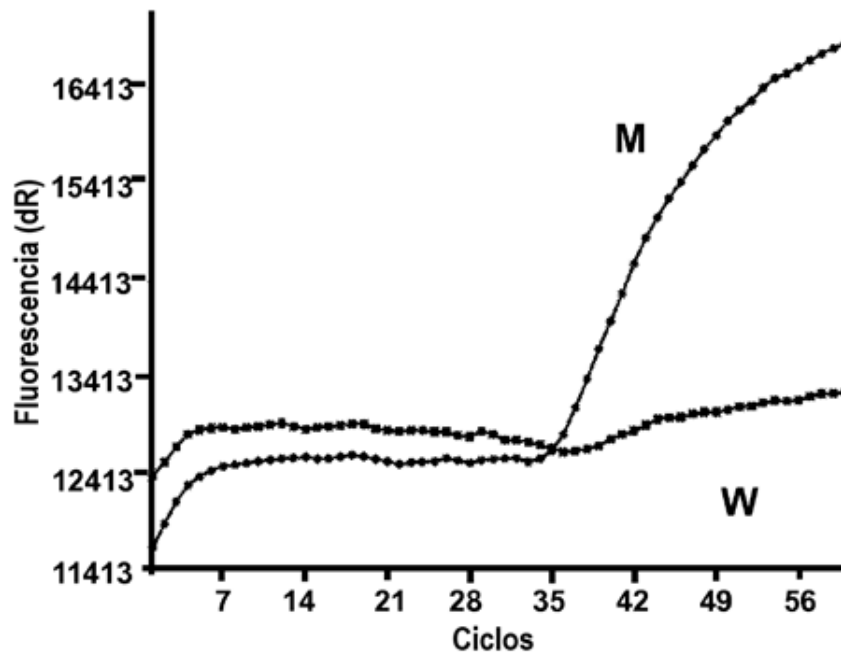


Fig. 10B

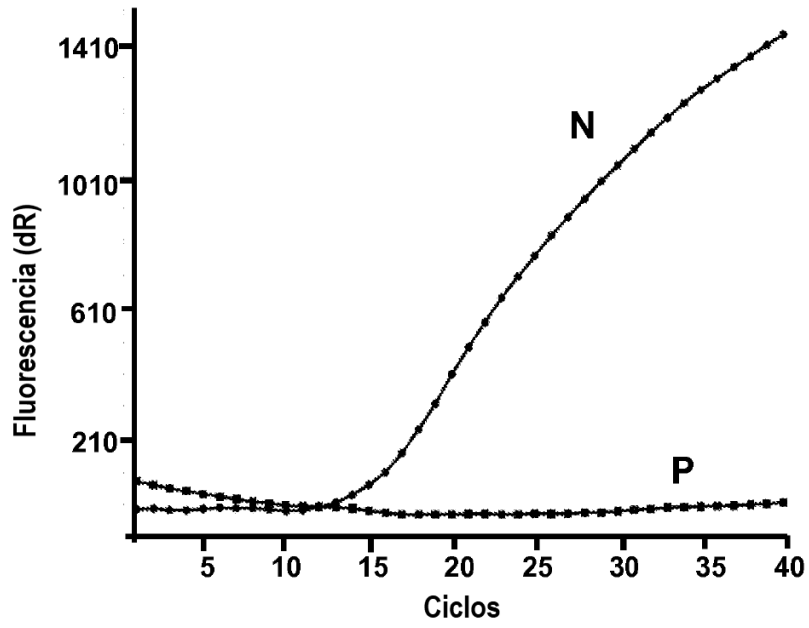


Fig. 11A

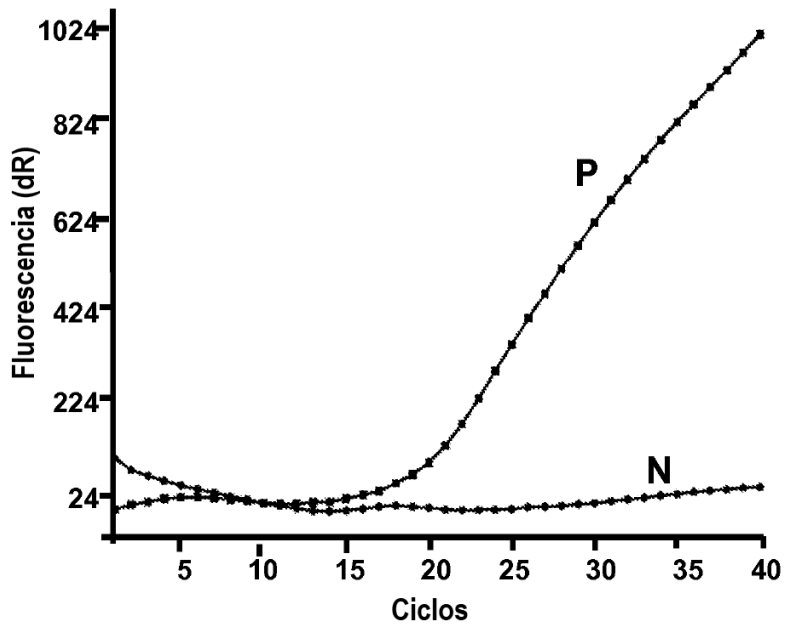


Fig. 11B

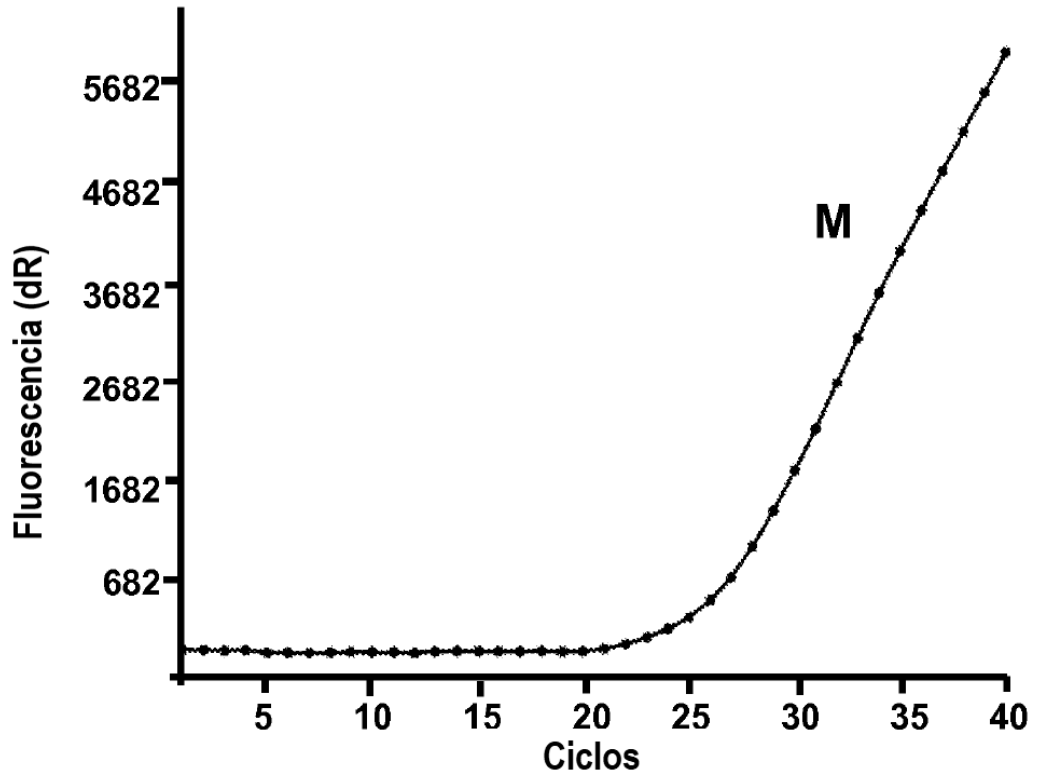


Fig. 12

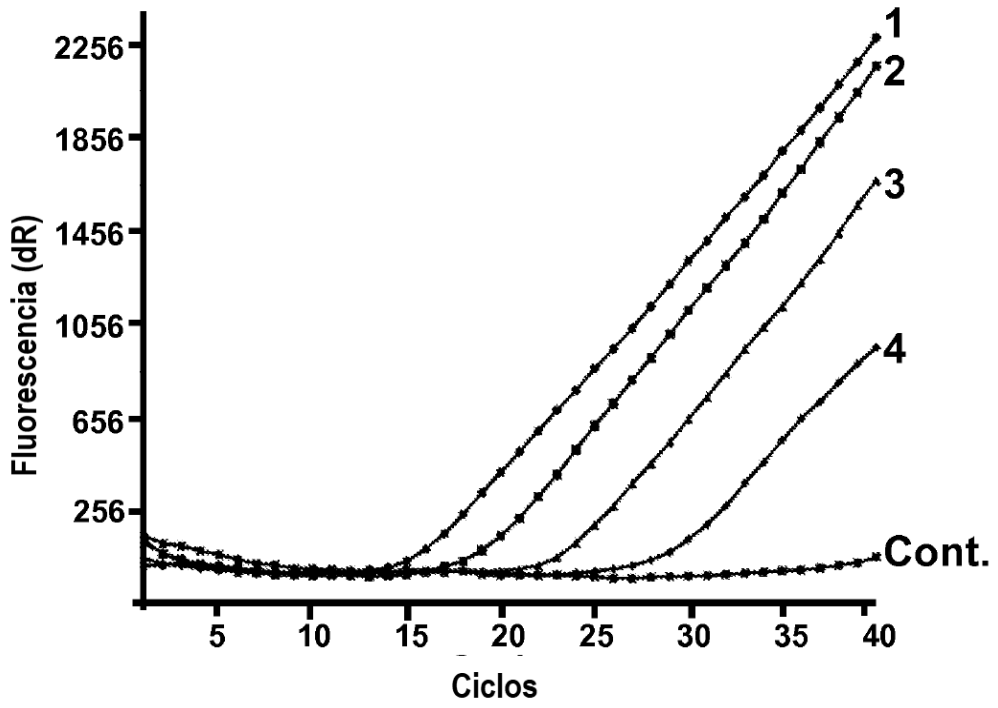


Fig. 13A

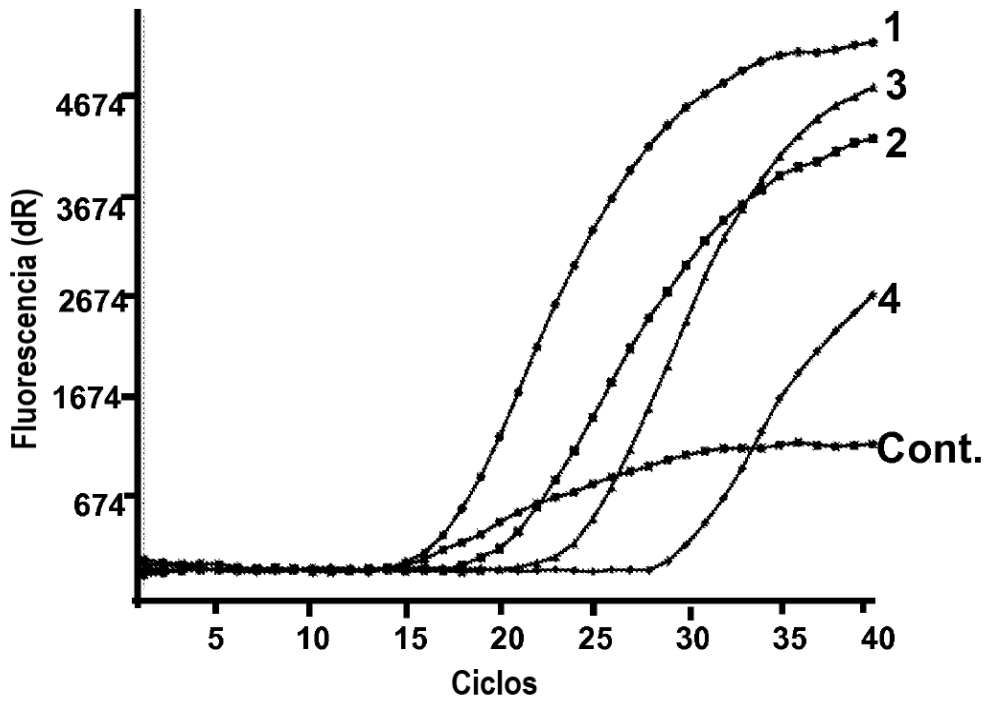


Fig. 13B

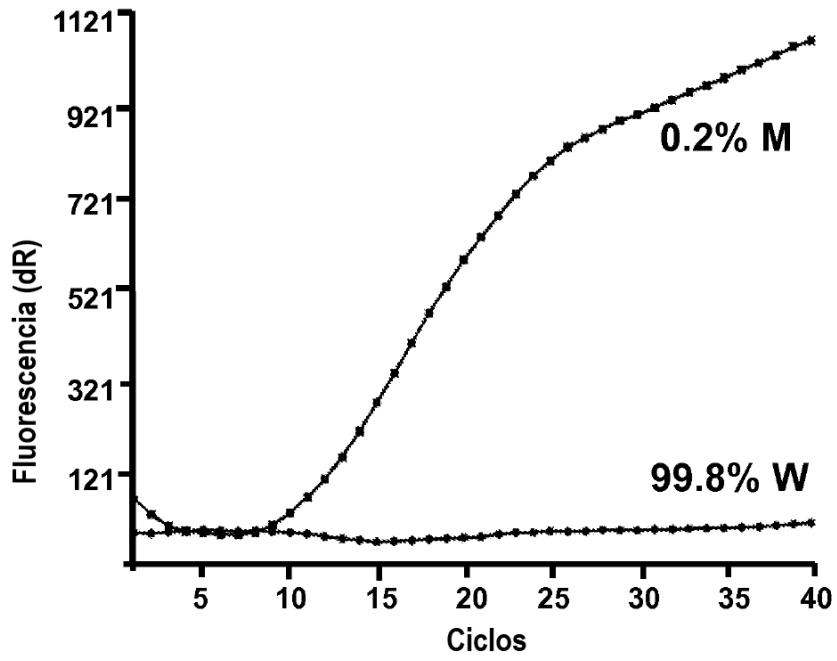


Fig. 14

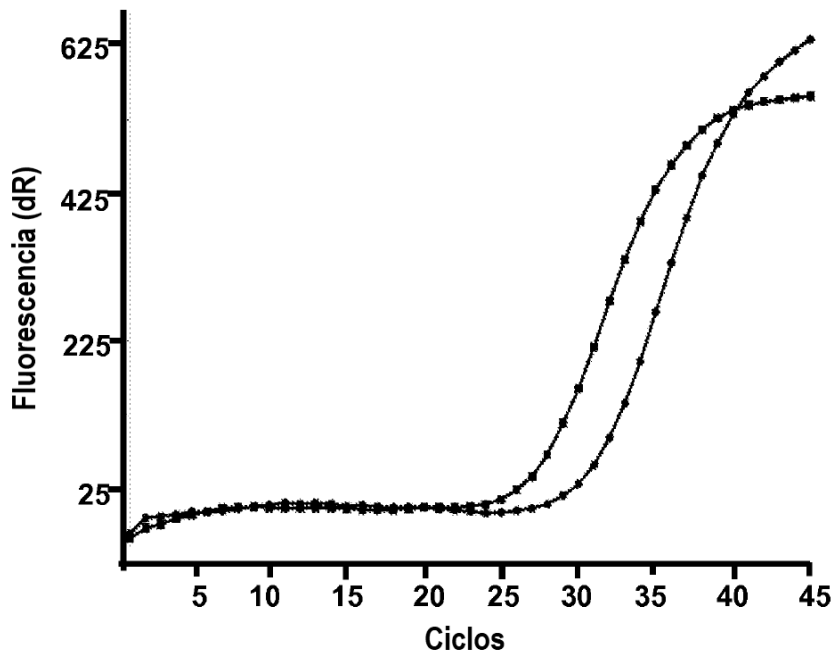


Fig. 15

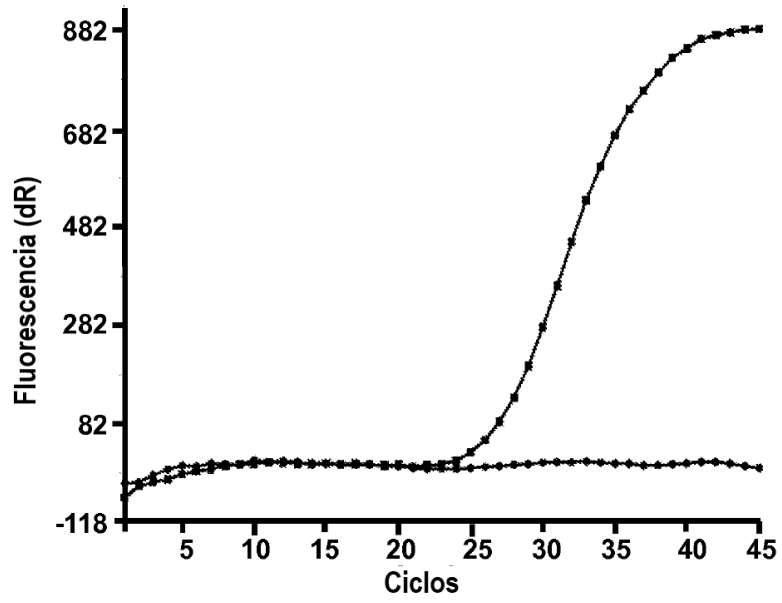


Fig. 16A

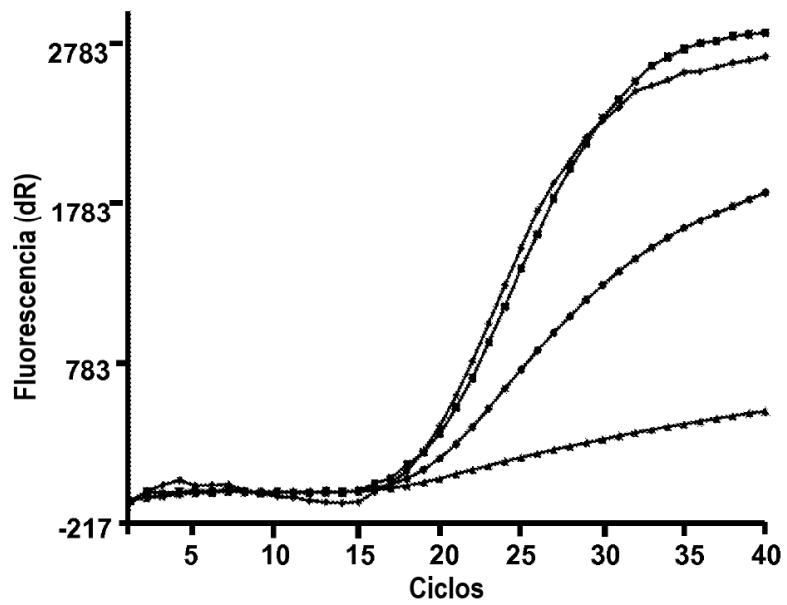


Fig. 16B

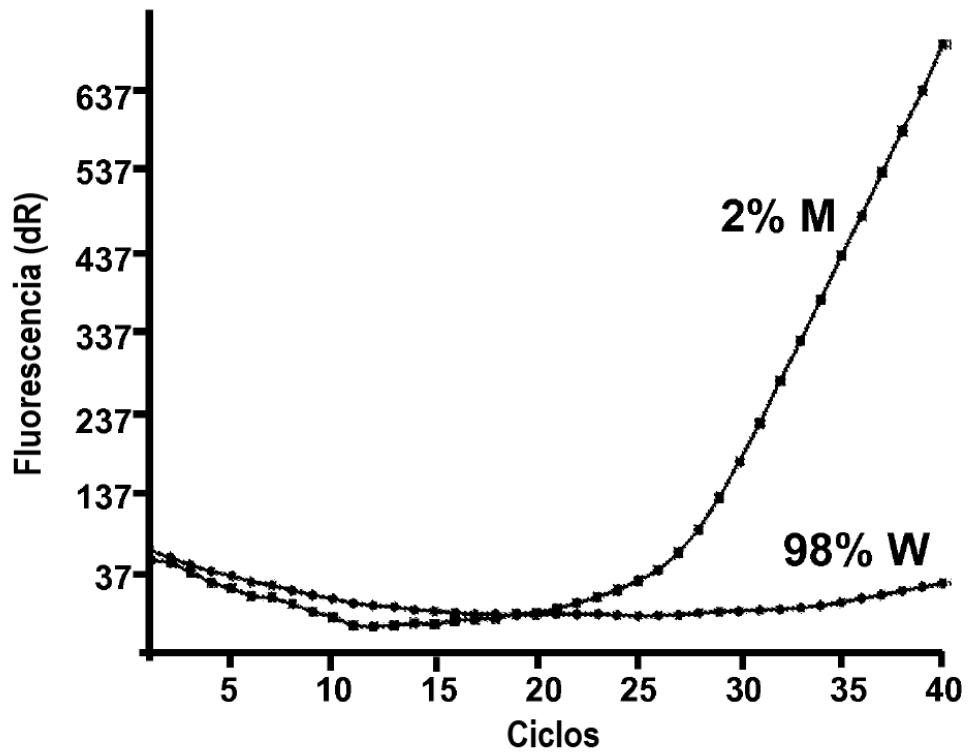


Fig. 17

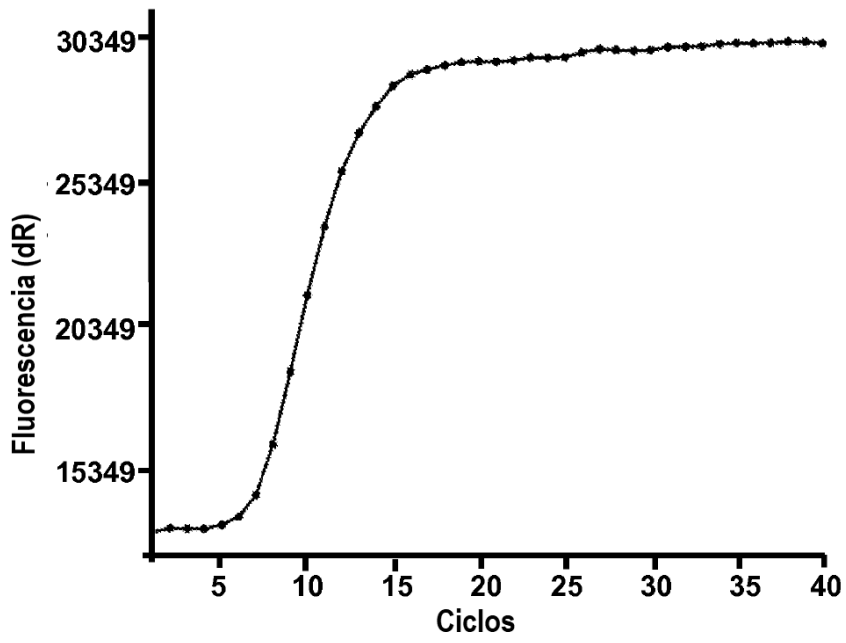


Fig. 18

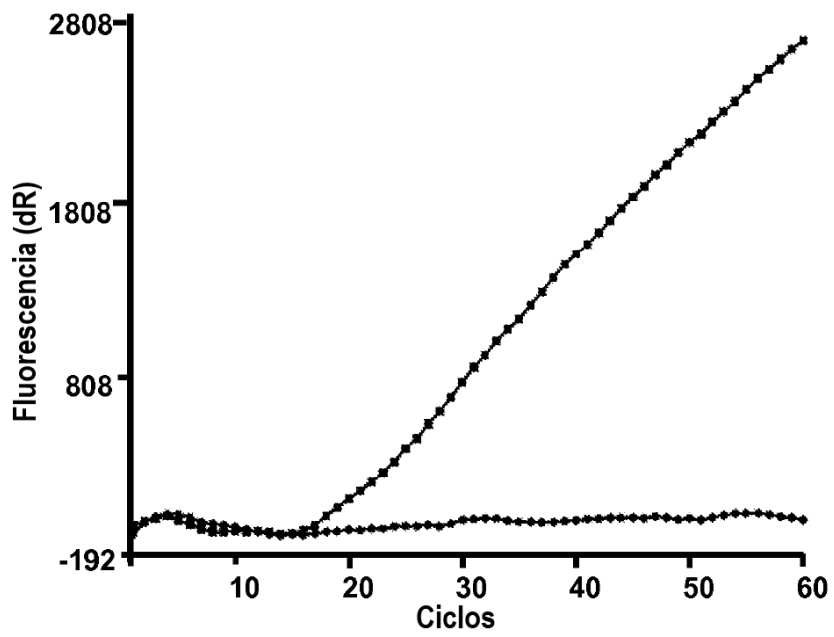


Fig. 19

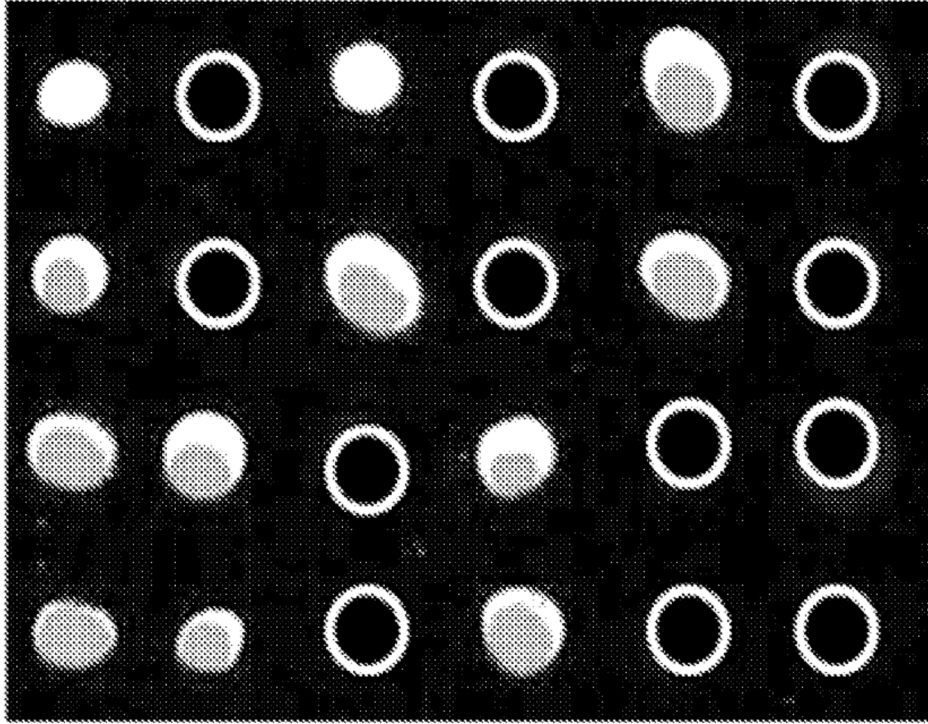


Fig. 20

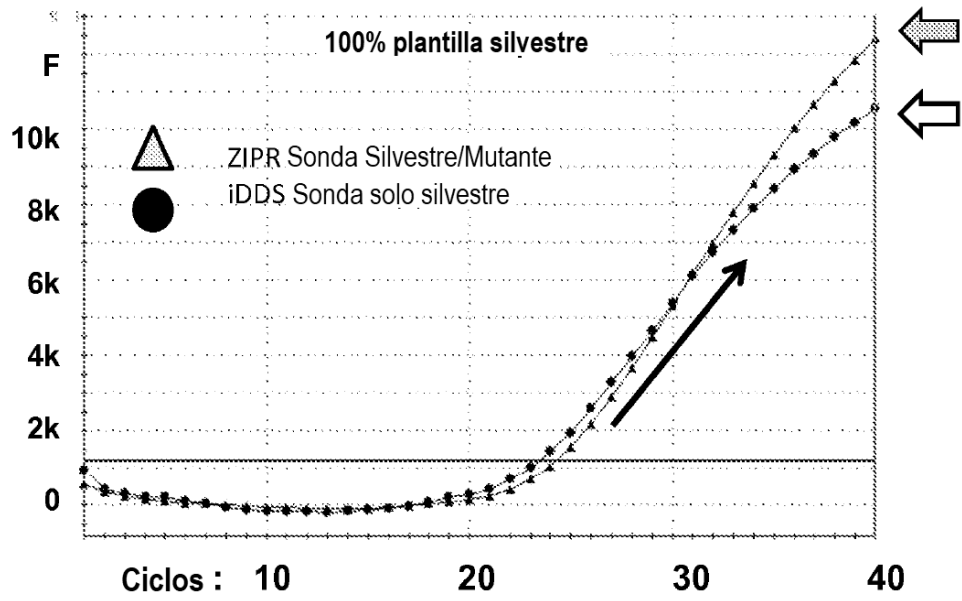


Fig. 21

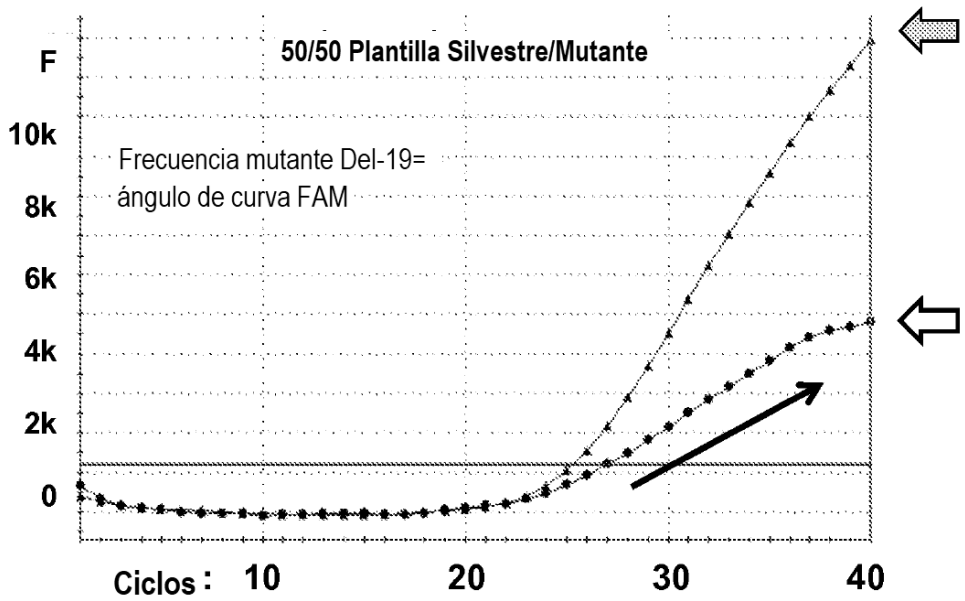


Fig. 22

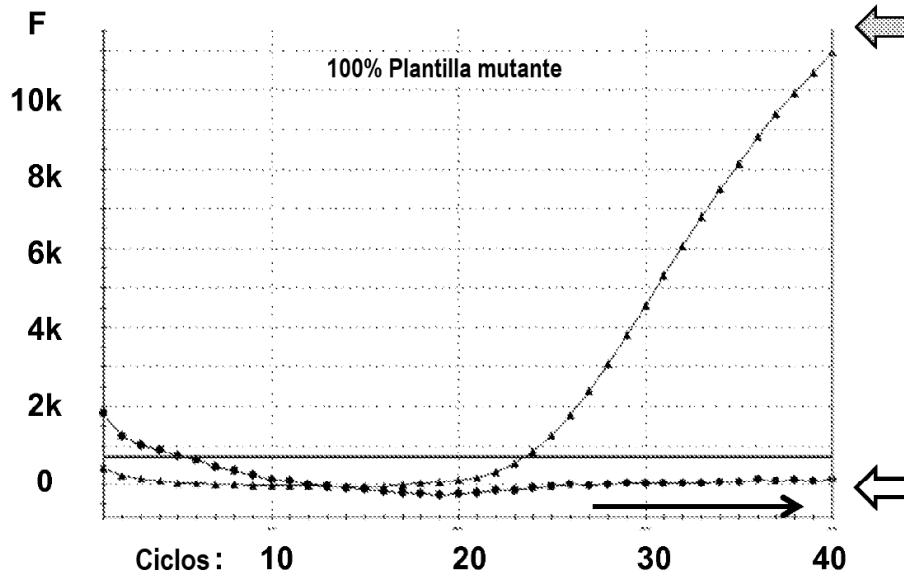


Fig. 23

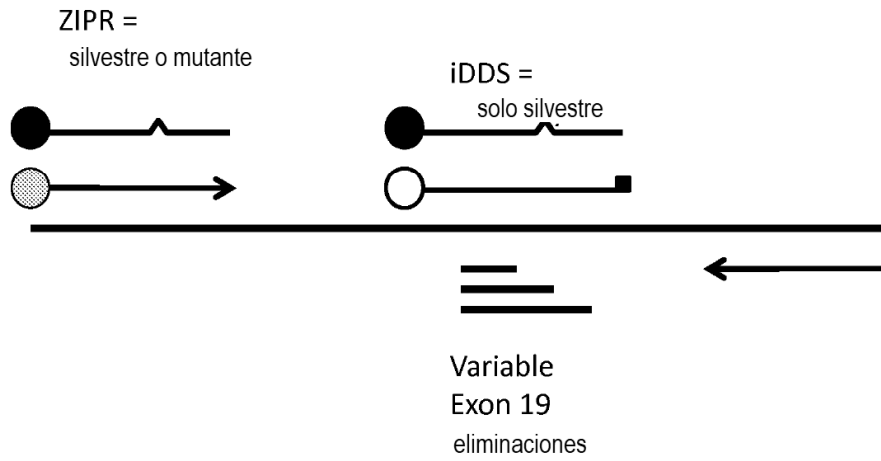


Fig. 24