

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 807**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6827 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2009 PCT/US2009/063634**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2010 WO10054254**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2009 E 09825516 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2356245**

54 Título: **Sesgo de amplificación de alelos**

30 Prioridad:

07.11.2008 US 112495 P
24.11.2008 US 117371 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.06.2019

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION (50.0%)
615 Arapeen Drive, Suite 310
Salt Lake City, UT 84108, US y
BIOFIRE DEFENSE, LLC (50.0%)

72 Inventor/es:

MCKINNEY, JASON, T.;
ZHOU, LUMING;
GUNDRY, CAMERON, N. y
PALAIS, ROBERT, ANDREW

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 716 807 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

Sesgo de amplificación de alelos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El proyecto del genoma humano ha tenido éxito en la secuenciación de la mayoría de las regiones del ADN humano. El trabajo para identificar los genes y las alteraciones de secuencia asociadas con una dolencia continúa a un ritmo rápido. Se utilizan estudios de unión para asociar el fenotipo con marcadores genéticos, tales como repeticiones de secuencias simples o polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) para identificar genes candidatos. Pueden utilizarse entonces alteraciones de secuencia incluyendo los SNP, las inserciones y las deleciones que provocan mutaciones de cambio de sentido, de cambio del marco de lectura o de corte y empalme para identificar el gen y el espectro de mutaciones responsables.

15 Sin embargo, incluso cuando se conocen los detalles genéticos, es difícil utilizar este conocimiento en la práctica médica de rutina, en gran parte debido a que los procedimientos para analizar el ADN son caros y complejos. Cuando los costes se reduzcan significativamente y los procedimientos se simplifiquen drásticamente, se espera que el análisis de ADN sea accesible para su utilización en la práctica clínica diaria para la detección eficaz de dolencias y un mejor tratamiento. El análisis de ADN ideal es rápido, simple y económico.

20 Cuando una dolencia está causada por un número limitado de mutaciones, o cuando unas pocas alteraciones de secuencia constituyen una gran proporción de los casos de dolencia, es viable un genotipado directo. Los procedimientos tradicionales varían entre digestión por restricción clásica de productos de PCR y procedimientos fluorescentes en tubo cerrado. Los procedimientos en tubo cerrado de análisis de ADN pueden ser simples de realizar. Una vez se inicia la PCR, no son necesarias adiciones o separaciones de reactivos adicionales. Sin embargo, cuando está presente un alelo en pequeñas cantidades, puede ser difícil de detectar ese alelo.

La secuenciación es actualmente el patrón de referencia para identificar una variación de secuencia. Aunque los costes están disminuyendo, la secuenciación es todavía un proceso complejo que no es rápido, simple ni económico cuando se aplica a diagnóstico genético específico o farmacogenética. La secuenciación convencional requiere siete etapas: 1) amplificación mediante PCR, 2) limpieza del producto de PCR, 3) adición de reactivos de secuenciación de ciclos, 4) secuenciación de ciclos para la terminación de didesoxil, 5) limpieza de los productos de terminación, 6) separación mediante electroforesis y 7) análisis de datos. Esta complejidad se puede automatizar y se ha hecho en algunos centros de secuenciación, pero la secuenciación sigue siendo mucho más compleja que los procedimientos de la presente invención. Además, cuando se analizan genes grandes o múltiples, a menudo más del 90% de los productos secuenciados regresan a la normalidad. Además, los procedimientos de secuenciación actuales no logran identificar alelos con bajo número de copias, particularmente cuando los alelos están presentes en una fracción de alelo de menos del 20%. Identificar la presencia de estos alelos de bajo número de copias es importante en varios entornos, a modo de ilustración en la identificación de la presencia de determinadas mutaciones oncogénicas o cambios en muestras tumorales o líquidos periféricos tales como sangre. La presencia o ausencia de tales alelos puede ser particularmente importante para la selección de protocolos de tratamiento, a modo de ilustración con detección/confirmación de mutaciones somáticas comunes (p53, EGFR, BRAF) e identificación temprana de infecciones bacterianas mutantes (por ejemplo, malaria) en las que las terapias convencionales están contraindicadas. Otros ejemplos de bajos niveles de alelos mutantes que se pueden encontrar frente a un fondo de tipo natural predominantemente están en ADN mitocondrial y ADN fetal presentes dentro de la circulación materna. Además, se desea la detección de bajos niveles de mutaciones epigenéticas. Por ejemplo, se encontró recientemente que la metilación del promotor BRCA1 entre el 1 y el 10% estaba asociada con fenotipos de cáncer de mama (Snell y otros, 2008, Breast Cancer Research).

50 Se conocen técnicas basadas en PCR para enriquecer la proporción de alelos minoritarios y mutaciones en una muestra. Cuando se desconoce el genotipo de la mutación, se puede utilizar COLD-PCR (Li J, y otros, Nat Med 2008; 14:579-84). Esta técnica puede detectar una proporción 1:100 de alelo mutante con respecto a tipo natural. Sin embargo, debido a que es inespecífico y detecta cualquier variante que se produzca, es necesario un análisis adicional para identificar los productos. Para enriquecer SNP conocidos, algunas de las técnicas más populares son ARMS (Newton CR, y otros, Nucleic Acids Res 1989;17:2503-16), PCR mediada por PNA (Nielsen PE, y otros, Science 1991;254:1497-500; Dabritz J, y otros, Br J Cancer 2005;92:405-12), WTB-PCR mediada por LNA (Dominguez PL, Kolodney MS. Wild-type blocking polimerase chain reaction for detection of single nucleotide minority mutations from clinical specimens. Oncogene 2005; 24:6830-4), MAMA-PCR (Cha RS, y otros, PCR Methods Appl 1992; 2:14-20), TaqMAMA (Li B, y otros, Genomics 2004; 83:311-20; Easterday WR, y otros, Biotechniques 2005; 38:731-5), y cebadores SCORPION® (Whitcombe D, y otros, Nat Biotechnol 1999; 17:804-7). Estos procedimientos detectan mutaciones mediante PCR específica de alelo, observando diferencias en el ciclo de cuantificación (ΔCq) y pueden detectar una proporción 1:1000 de alelo mutante con respecto a tipo natural.

65 Se introdujo fusión de alta resolución como procedimiento homogéneo de exploración de amplicones de PCR para detectar variantes de secuencia heterocigotas. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos. Nos. 7.387.887 y 7.582.429. En base a la utilización de colorantes de saturación de ADNbc, la fusión de alta resolución puede

detectar SNP e inserciones/deleciones en amplicones de hasta 400 pb a una sensibilidad >99%. Desde su introducción en 2003, se han desarrollado aplicaciones adicionales para fusión de alta resolución, incluyendo genotipado de variantes de secuencia conocidas utilizando pequeños amplicones o sondas sin marcar (LUNAPROBES®). Las sondas sin marcar se bloquean en el extremo 3' para evitar su extensión durante la PCR y pueden utilizar un colorante de saturación de ADNbc, a modo ilustrativo LCGREEN® Plus (Idaho Technology, Salt Lake City, UT), para discriminar el genotipo del alelo en base a la temperatura de fusión de la sonda (Tm). La secuencia de sonda puede diseñarse para emparejarse con cualquier alelo y se basa en maximizar el ΔT_m entre la sonda de emparejamiento erróneo y de emparejamiento perfecto. Para más información sobre la utilización de sondas sin marcar, véase la patente Estados Unidos No. 7.387.887.

Se ha encontrado que las propias sondas se pueden utilizar para sesgar la amplificación de alelos de fracción baja. Los ejemplos 1-5 más adelante se presentan utilizando sondas sin marcar. Los ejemplos 6-8 se presentan utilizando cebadores Snapback. Con un cebador Snapback, el cebador comprende un elemento de sonda específico para un locus del ácido nucleico diana y una zona de cebador específico de molde, en el que el elemento de sonda está en 5' de la zona de cebador específico de molde. Tras la amplificación, el elemento de sonda puede hibridarse con el locus para formar una horquilla en una reacción intramolecular o puede hibridarse con su hebra complementaria en una reacción intermolecular. Por tanto, un cebador Snapback incorpora el elemento de sonda en el mismo oligonucleótido que el cebador. Los cebadores Snapback se pueden marcar, pero se utilizan a menudo sin marcar, de manera similar a las sondas sin marcar. Véase el documento WO 2008/109823 (PCT/US08/56217), para una discusión detallada de cebadores Snapback.

Aunque se utilizan sondas sin marcar y cebadores Snapback sin marcar en el presente documento, se entiende que las sondas se pueden marcar también. Cuando se utilizan sondas sin marcar, tienden a ser algo mayores que otras sondas (a menudo 25-30 pb) para generar suficiente señal fluorescente a partir del colorante de unión a ADNbc, y debido a esta longitud son muy adecuadas para sesgar preferentemente la amplificación de alelo de emparejamiento erróneo. La sonda (ya sea sonda sin marcar, elemento de sonda Snapback, u otra sonda) se empareja con el alelo de fracción mayor, y se determina empíricamente el "sesgo de amplificación de alelos" ajustando la temperatura de apareamiento (o temperatura de extensión, si se utiliza) de la PCR entre la Tm de la sonda emparejada perfectamente y algo por debajo de la Tm de la sonda de emparejamiento erróneo, a modo ilustrativo a la Tm del alelo inferior o aproximadamente a mitad de camino entre las Tm, según cuánto se solapan los picos de fusión para los dos alelos. A esta temperatura de apareamiento Tm media, la sonda emparejada perfectamente se une a su diana (a menudo el alelo de tipo natural) y es lo suficientemente estable para retrasar la amplificación. En una realización, se utilizó PCR de ciclo rápido realizada en el instrumento LIGHTSCANNER® 32 ("LS32", Idaho Technology, Inc.) para ayudar a la rigurosidad de la temperatura de apareamiento objetivo y obstaculizar la amplificación del alelo de tipo natural, aunque se entiende que otros instrumentos pueden ser adecuados. También puede utilizarse una polimerasa exo⁻ para evitar la digestión de la sonda y ayudar a sesgar la amplificación del alelo de Tm inferior.

El documento EP1580269 da a conocer procedimientos para la amplificación y detección de ADN natural y mutante con la utilización de diferentes sondas marcadas específicas.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

En el presente documento se describe el sesgo de amplificación de alelos.

En un aspecto de la presente invención, se da a conocer un procedimiento para amplificación y detección de alelos de una muestra biológica según la reivindicación 1, en el que la muestra biológica comprende un primer alelo y un segundo alelo de un ácido nucleico diana, estando presente el primer alelo en una mayor concentración que el segundo alelo, que comprende las etapas de añadir una polimerasa termoestable, una sonda y un par de cebadores configurados para la amplificación del ácido nucleico diana en la mezcla biológica, en el que la sonda está configurada para hibridarse con el ácido nucleico diana sin extenderse mediante la utilización de un bloqueante o emparejamiento erróneo y la sonda tiene una primera Tm cuando se hibrida con el primer alelo y una segunda Tm cuando se hibrida con el segundo alelo, en el que la primera Tm es mayor que la segunda Tm, amplificar el ácido nucleico diana en la mezcla biológica mediante ciclado térmico entre una temperatura de desnaturalización y una temperatura de apareamiento, en el que la temperatura de apareamiento está por debajo de la primera Tm y por encima de la segunda Tm de modo que la sonda se hibrida con el primer alelo a la temperatura de apareamiento e inhibe la amplificación del primer alelo y el segundo alelo se amplifica preferentemente, y detectar el segundo alelo.

En realizaciones ilustrativas, el ciclado se realiza con una velocidad en rampa de como mínimo 4°C, y de manera más ilustrativa, como mínimo 6°C. En otras realizaciones ilustrativas, el primer alelo y el segundo alelo se detectan utilizando análisis de curvas de fusión. En un ejemplo ilustrativo, el análisis de curvas de fusión incluye fusión de alta resolución que utiliza un colorante de saturación y una sonda sin marcar.

En un segundo aspecto, se da a conocer la utilización de un kit para la amplificación y detección de alelos de una muestra biológica según la reivindicación 14.

Características adicionales de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras la consideración de la siguiente descripción detallada de realizaciones preferentes que ejemplifican el mejor modo de llevar a cabo la invención tal como se percibe actualmente.

5 DESCRIPCIÓN BREVE

La figura 1 muestra resultados que son de un ensayo de genotipado de sonda sin marcar (por triplicado) del gen CTR de *P. falciparum* de malaria. La muestra (----) es tipo natural (3D7), la muestra (-----) es mutante (7G8) y (-••••) muestra tres muestras mutantes diferentes (FCR3).

10 La figura 2 muestra picos derivados normalizados utilizando una sonda sin marcar. El alelo de tipo natural tiene una T_m de 62°C y el alelo mutante tiene una T_m de 54°C. Se utilizó una temperatura de apareamiento de 58°C para sesgar la amplificación del alelo mutante en las muestras mezcladas 50-50. Las muestras fueron tal como sigue: (-••••) = mutante al 100%, (-----) = mutante al 50%, (-) = mutante al 25%, (-----) = mutante al 12,5%, (-••••) = mutante al 6,25%, (----) = mutante al 3,13%, (----) = mutante al 1,5%, (-••••) = mutante al 0,75%. Este sesgo de amplificación permite una mayor resolución del alelo mutante en un factor de ~10X y sensibilidad de hasta el 0,7-1,5%.

15 La figura 3 muestra resultados en los que el sesgo de amplificación de alelos se intentó de manera no satisfactoria utilizando un termociclador lento (1,5 - 2,0°C/s) y 8 temperaturas de apareamiento diferentes en la misma diana de malaria que la utilizada para la figura 2 (cepa 3D7 de tipo natural (- - - -), cepa 7G8 mutante (-••••) y un heterocigoto con una proporción de alelos igual (-----)).

20 Las figuras 4a-b muestran resultados no satisfactorios y satisfactorios de sesgo de amplificación de alelos utilizando 8 temperaturas de apareamiento diferentes y una polimerasa exo^+ (figura 4a) o una polimerasa exo^- (figura 4b), respectivamente (tipo natural (- - - -), mutante (-••••), y un heterocigoto con una proporción de alelos igual (-----) a temperaturas de apareamiento variables y (-••••) a 69°C de temperatura de apareamiento)).

25 Las figuras 5a-c muestran el resultado del procedimiento de sesgo de amplificación de alelos del exón 11 del gen PAH utilizando un termociclador lento (1,5 - 2,0°C/s) y un gradiente de temperaturas de apareamiento (homocigotos de T_m alta (-••••), heterocigotos (mezcla 50:50) (-----), homocigotos de T_m baja (- - - -)): la figura 5a muestra toda la curva de fusión derivada, la figura 5b muestra picos de fusión de sonda normalizados y la figura 5c muestra curvas de amplificación que presentan variación basada en temperatura de apareamiento sólo, y no en estabilidad de sonda:diana diferencial.

30 Las figuras 6a-c muestran la amplificación del exón 11 del gen PAH en un instrumento de ciclado rápido con una temperatura de apareamiento de 60°C (homocigotos de T_m alta (-••••), heterocigotos (mezcla 50:50) (-----), homocigotos de T_m baja (- - - -)): la figura 6a muestra toda la curva de fusión derivada, la figura 6b muestra picos de fusión normalizados de sonda y la figura 6c muestra curvas de amplificación.

35 Las figuras 7a-c son similares a las figuras 6a-c, excepto porque se utilizó una temperatura de apareamiento de 62°C.

Las figuras 8a-c son similares a las figuras 6a-c, excepto porque se utilizó una temperatura de apareamiento de 64°C.

Las figuras 9a-c son similares a las figuras 6a-c, excepto porque se utilizó una temperatura de apareamiento de 65°C.

40 Las figuras 10a-c son similares a las figuras 6a-c, excepto porque se utilizó una temperatura de apareamiento de 67°C.

Las figuras 11a-c son similares a las figuras 6a-c, excepto porque se utilizó una temperatura de apareamiento de 68°C.

45 Las figuras 12a-c son similares a las figuras 6a-c, excepto porque se utilizó una temperatura de apareamiento de 69°C.

Las figuras 13a-c son similares a las figuras 6a-c, excepto porque se utilizó una temperatura de apareamiento de 70°C.

50 Las figuras 14a-d muestran la fusión de amplicón rs 1490413 A/G de SNP forense, utilizando diferentes temperaturas de desnaturalización ((-) = 1A:10G; (-----) = 1A: 100G; (- - - -) = 1A:1000G; (-••••) = A:G; (••••••) = G; (- - - -) = A).

Las figuras 15a-d son similares a las figuras 14a-d, excepto porque utilizan temperaturas de apareamiento diferentes ((-) = 1A:10G; (-----) = 1A:100G; (----) = 1A:1000G; (-••••) = A:G; (••••••) = G; (- - - -) = A).

Las figuras 16a-d son similares a las figuras 14a-d, porque utilizan temperaturas de extensión diferentes ((-) = 1A:10G; (-----) = 1A:100G; (----) = 1A:1000G; (-••••) = A:G; (••••••) = G; (----) = A).

55 Las figuras 17a-b son similares a las figuras 14a-d, excepto porque utilizan tiempos de extensión diferentes ((-) = 1A:10G; (-----) = 1A:100G; (---) = 1A:1000G; (-••••) = A:G; (••••••) = G; (----) = A).

Las figuras 18a-c son similares a las figuras 14a-d, excepto porque utilizan concentraciones de magnesio diferentes ((-) = 1A:10G; (-----) = 1A:100G; (----) = 1A:1000G; (-••••) = A:G; (••••••) = G; (----) = A).

60 Las figuras 19a-d son similares a las figuras 14a-d, excepto porque muestran elementos de sonda que tienen longitudes diferentes ((-) = A; (-----) = G; (----) = A:G).

Las figuras 20a-b muestran ejecuciones por triplicado similares a la figura 20a ((----) = 1:1000; (••••••) = 1:100; (-••••) = 1:100; (----) = 1:10; (-----) = A:G; (-) = G; (••••••••) = A). La figura 20a muestra la fusión del elemento de sonda, mientras que la figura 20b muestra la fusión de todo el amplicón.

65 Las figuras 21a-b muestran la fusión del amplicón de mutación de B-raf V600E posterior a la amplificación utilizando un cebador Snapback ((- - - -) = tipo natural; (-••••) = mutación de B-raf; (-) = 1:1000; (-----) = 1:100; (••••••) = 1:10; (- - - -) = 1:1). La figura 21a muestra la fusión del elemento de sonda, mientras que la figura 21b muestra la fusión de

todo el amplicón.

La figura 22 muestra los resultados de fusión de un estudio ciego de la mutación de B-raf.

La figura 23 muestra el análisis de curvas de fusión de la delección del exón19 de EGFR, posterior a la amplificación utilizando un cebador Snapback ((-) = tipo natural; (-·-·-·-) = del; (- - - -) = 1:1; (----) = 1:10; (·····) = 1:50; (- - - -) = 1:100; (·····) = 1:1000; (-·-·-·-) = 1:5000; (- - - -) = 1:10000).

La figura 24 muestra la derivada negativa de las curvas de fusión normalizadas de tres muestras: tipo natural, $D_w(T)$, mutante homocigoto, $D_m(T)$ y una muestra mixta fraccionaria, $D_f(T)$. Se indican las temperaturas inferiores y superiores de los picos de alelo, T_L y T_H . Las diferencias de magnitud a-e se utilizan para calcular la fracción de alelo mutante F_m como un promedio ponderado de dos estimaciones de fracción de alelo, $f(T_L)=a/d$ y $f(T_H)=c/e$, con factores de ponderación, $w_L = a/(a+b)$ y $w_H = b/(a+b)$. La fracción de alelo mutante se calcula entonces como $F_m = w_L f(T_L) + w_H f(T_H) = (a^2e+bcd)/(de(a+b))$.

La figura 25 representa en forma de diagrama el elemento de sonda Snapback con tanto un emparejamiento erróneo con el alelo mutante (o secundario) como con el alelo de tipo natural (o principal). Si las condiciones de extensión de PCR se escogen cuidadosamente, la polimerasa es libre de extender la horquilla mutante desestabilizada, pero se obstaculiza la expresión de tipo natural, dando como resultado un enriquecimiento del alelo mutante.

Las figuras 26a-b muestran el efecto del tiempo de extensión (figura 26a) y concentración de Mg^{++} (figura 26b) sobre el enriquecimiento del alelo utilizando una polimerasa negativa para 5'-exonucleasa y PCR de cebador Snapback. Las proporciones de alelo secundario fueron 1:100 (círculos) o 1:1000 (triángulos). En la figura 26a, la T_m de sonda de tipo natural es de 75°C y, por tanto, se escogió una temperatura de extensión de 70°C, con tiempos de extensión que variaban entre 0 y 20 segundos a una concentración de Mg^{++} libre de 1,2 mM. En la figura 26b, las concentraciones de Mg^{++} libre utilizadas fueron 0,8 mM, 1 mM, 1,2 mM, 1,7 mM y 2,2 mM con T_m de sonda de tipo natural de 73°C, 74°C, 75°C, 76°C y 77°C, respectivamente con una temperatura de extensión de 70°C durante 0 s. Cuanto más corto sea el tiempo de extensión y menor la concentración de Mg^{++} , mayores serán las fracciones de alelo mutante obtenidas. Se realizaron experimentos por triplicado y se indican las desviaciones estándar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La sensibilidad de detección de un alelo mutante sin sesgo de amplificación de alelos se determinó previamente que era de aproximadamente el 5% (Wall, M, y otros, American Society of Human Genetics, 2007). Este trabajo implicaba la utilización de una sonda sin marcar y fusión de alta resolución en el instrumento basado en placas LIGHTSCANNER (Idaho Technology, Salt Lake City, UT). Se escogieron varios polimorfismos comunes como dianas y ensayos de sonda sin marcar desarrollados para determinar el genotipo de varias muestras de ADN al azar. Para cada locus, se escogieron 3 muestras que representaban cada uno de los posibles genotipos. Las dos muestras que representaban las formas homocigóticas del genotipo se cuantificaron y se mezclaron a las siguientes proporciones: 95:5, 90:10, 75:25, 50:50, 25:75, 10:90 y 5:95. Los perfiles de fusión de las sondas sin marcar se convirtieron en picos derivados y se calcularon las alturas de pico a cada temperatura de fusión de la sonda. En este trabajo, fue posible la discriminación de la fracción de alelo hasta el 5% para ambos alelos. Sin embargo, ha sido difícil discriminar alelos en fracciones por debajo del 5%.

El instrumento LIGHTSCANNER 32 (LS32) es un nuevo instrumento híbrido que integra PCR rápida, monitorización en tiempo real y fusión de alta resolución. Se realiza sin problemas PCR y análisis mediante obtención del perfil de fusión en el mismo instrumento. La obtención del perfil de fusión con un colorante de unión a ADNbc de saturación, a modo ilustrativo LCGREEN Plus, identifica variaciones de secuencia en fragmentos, a modo ilustrativo desde 40 - 1000 pb. Además, puede realizarse también genotipado específico de sitio, utilizando a modo ilustrativo colorante LCGREEN y cebadores Snapback o sondas de oligonucleótidos sin modificar (véase el documento WO 2008/109823). Se pueden utilizar también otros sistemas de sonda, tales como SIMPLEPROBE, TAQMAN, HYBPROBE, y otros sistemas de sonda tal como se conoce en la técnica. Otros sistemas de sonda ilustrativos incluyen PNA, LNA o cualquier sonda que contenga análogos de base sintética, marcada con biotina o cualquier proteína / ácido nucleico o macromolécula o estructura de hibridación que depende de la secuencia y es específico en su afinidad a la hembra molde de modo que existe una diferencia de T_m entre los alelos. Además, aunque se han utilizado sondas sin marcar más largas en los ejemplos de sonda sin marcar en el presente documento, puede utilizarse sondas de longitud variable para proporcionar una diferencia adecuada en la T_m entre los dos alelos. Puede realizarse obtención del perfil de fusión de amplicones y análisis basado en sonda de manera simultánea en la misma ejecución. El LS32 automatiza la PCR y obtención del perfil de fusión de alta resolución en un sistema completo unificado.

Se desarrolló análisis de fusión de ADN de alta resolución en 2003 (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 7.387.887 y 7.583.429). Como el nombre sugiere, es un proceso que calienta ADN y registra la señal a medida que se disocia (o "se funde") la doble hélice de ADN para dos hebras individuales. Exactamente cómo se funde el ADN depende de la secuencia de ADN de la muestra. Con la ayuda de un colorante de saturación, puede distinguirse la diferencia entre muestras que difieren en una única posición en la secuencia de ADN, incluso en fragmentos de más 800 bases de longitud.

La fusión de alta resolución es una potente técnica de análisis genético. Las ventajas de la fusión de alta resolución incluyen lo siguiente:

- todo se realiza en disolución (el proceso no requiere separación física),
- el sistema es un tubo cerrado (sin riesgo de contaminación),
- muy poco coste añadido más allá del coste de la propia PCR (pueden utilizarse sondas marcadas, pero se suman sustancialmente al coste), y
- el procedimiento es simple (sin necesidad de automatización, adiciones de reactivos o purificación intermedia).

El LS32 integra fusión de alta resolución con PCR rápida de hasta 32 muestras, permitiendo la amplificación en menos de 15 min, seguido por fusión de alta resolución automática. Aunque están disponibles otros sistemas para realizar un ciclado rápido seguido por fusión de alta resolución y la presente memoria descriptiva los contempla, el LS32 es muy adecuado para los presentes procedimientos y se utiliza como el instrumento ilustrativo en muchos de los ejemplos en el presente documento.

Ejemplo 1. Genotipado utilizando fusión de alta resolución.

Se amplificó el gen CRT de *P. falciparum* de malaria utilizando los siguientes cebadores y sonda:

pfCRT directo - 5' TTCTTGCTTTGGTAAATGTGCTCA (SEQ ID NO. 1)
 pfCRT inverso - 5' CGGATGTTACAAAACCTATAGTTACCAAT (SEQ ID NO. 2)
 sonda de pfCRT - 5' GTGTA^uIGTGTAAAT^uGAAT^uAAAATTTT^uG-bloqueante C3 (SEQ ID NO. 3).

Para la sonda, las bases subrayadas son los sitios de SNP, con las bases mostradas emparejadas con el tipo natural. Aunque se muestran cinco sitios de SNP, sólo cuatro se utilizaron en este estudio.

Se realizó amplificación con una pausa inicial de 30 segundos a 95°C, seguido por 55 ciclos de 95°C durante 2 segundos, 58°C durante 15 segundos, con una velocidad en rampa medida a de aproximadamente 4 a 6°C/s, en dos cepas mutantes 3D7 (tipo natural) (7G8 y Dd2) del gen CRT de *P. falciparum* de malaria. Posterior al ciclado térmico, las muestras se mantuvieron a 95°C durante 2 segundos y, a continuación, se enfriaron hasta 40°C durante 30 segundos, con una velocidad en rampa de enfriamiento de 10°C/s. La fusión era desde 45°C hasta 88°C, con una velocidad en rampa de 0,3°C/s y adquisición continua. Se muestran resultados de la fusión de sonda en la figura 1 (no se muestra la fusión de amplicón). La sonda está diseñada como un emparejamiento perfecto con el alelo de tipo natural en cada locus (codones 72, 75 y 76). Por tanto, la muestra 3D7 (- - -) presenta el pico de fusión más alto (T_m) posible con esta sonda. La muestra 7G8 (-----) presenta emparejamiento erróneo bajo la sonda a 72 (emparejamiento erróneo TT) y 76 (emparejamiento erróneo CT). Las muestras Dd2, V1/S y FCR3 (- - - -) son todas el mismo genotipo (ver los resultados de secuenciación a continuación), y presentan emparejamiento erróneo con la sonda a 75 (emparejamiento erróneo GT y AA, bases de codón 75 1^a y 3^a) y 76 (emparejamiento erróneo CT). Si una muestra presentara emparejamiento erróneo con la sonda en sólo un sitio de base, el pico de fusión estaría entre el pico (-----) y (- - -). Si una muestra presentara emparejamiento erróneo en los 4 de estos sitios, se esperaría que el pico de fusión fuera menor que el pico (- - - -).

Ejemplo 2. Detección de la fracción de alelo baja.

Se amplificó el gen CRT de *P. falciparum* de malaria utilizando los cebadores y sonda descritos anteriormente. Se prepararon mezclas que contenían diversas proporciones del tipo natural y el mutante 7G8 de antes.

En base a las T_m observadas de la sonda sin marcar (62°C y 54°C para los alelos de tipo natural y mutante, respectivamente), se utilizó una temperatura de apareamiento de 58°C (T_m baja + ½ ΔT_m) para inducir sesgo de amplificación de alelos del alelo mutante en una serie de dilución de muestras mixtas. Se realizó ciclado rápido (velocidad en rampa 6-10°C) en un LS32, y se muestran los resultados en la figura 2. Este protocolo dio como resultado un factor de sesgo de amplificación de alelos de aproximadamente 10X, que permitió la discriminación del alelo mutante hasta el 0,75-1,5%. Experimentos adicionales han confirmado este hallazgo, lo que permite la discriminación hasta aproximadamente el 0,1%. Aunque se utilizó una temperatura de apareamiento aproximadamente a mitad de camino entre las dos T_m, se entiende que se puede utilizar cualquier T_m que desestabilice de manera desproporcionada la sonda: diana con emparejamiento erróneo, en comparación con el híbrido sonda:diana emparejado. Esto se puede producir en varias situaciones según los valores de T_m relativos de cada sonda, temperaturas de apareamiento programadas, velocidades de las transiciones especialmente en el intervalo de grados de 50°C a 80°C, y actividad dependiente de la temperatura de la polimerasa. A modo ilustrativo, la temperatura de apareamiento está como mínimo 1,0°C y a modo más ilustrativo como mínimo 2,0°C por encima de la T_m inferior del híbrido sonda: diana con emparejamiento erróneo. También se ha encontrado que una temperatura de apareamiento a la sonda o ligeramente por debajo de la misma con el alelo con emparejamiento erróneo puede reducir la unión sonda: diana con emparejamiento erróneo lo suficientemente como para proporcionar sesgo de amplificación de alelos. Sin limitarse a ninguna teoría particular, se espera que la actividad de una polimerasa se vea alterada por la sonda unida (tipo natural en este ejemplo ilustrativo), mientras que la amplificación del alelo que tiene la T_m menor (mutante en este ejemplo ilustrativo) puede avanzar sin obstáculos. Tal como se muestra en el ejemplo 4, se prefiere utilizar polimerasas exo⁻ tales como KLENTAQ, que son polimerasas que carecen de actividad exonucleasa 5' a 3'. Sin embargo, se entiende que puede utilizarse cualquier polimerasa que esté obstaculizada por la presencia de una sonda unida. Además, por obstaculizada, quiere decirse que se puede

producir amplificación, pero a una eficacia reducida, reducida a modo ilustrativo en un 10% o más, reducida a modo más ilustrativo en un 50% o más de la eficacia de amplificación del alelo emparejado.

5 No se observó sesgo de amplificación de alelos en esta secuencia diana cuando se realizó el mismo enfoque para
ajustar la temperatura de apareamiento de PCR en un termociclador de bloque convencional (velocidad en rampa de
1,5 a 2,0°C). Esto se debe presumiblemente a velocidades de transición más lentas entre temperaturas de
10 apareamiento y de desnaturalización, lo que proporcionaría tiempo adicional para la extensión a temperaturas
ligeramente por encima de la T_m de tipo natural. Por tanto, se desea una combinación de temperatura de
apareamiento que sesga preferentemente la hibridación de la sonda al alelo dominante, una polimerasa que está
impedida por la presencia de la sonda unida y una velocidad en rampa que calienta lo suficientemente rápido, a
modo ilustrativo sin una pausa de la extensión dedicada (que es a menudo de 72°C), de modo que la combinación
amplifica preferentemente el alelo secundario.

Ejemplo 3. Efectos de la velocidad en rampa del ciclado térmico.

15 Se utilizó un termociclador de bloque tradicional para este ejemplo, que tenía una velocidad en rampa de 1,5 a
2,0°C. La figura 3 muestra la amplificación del gen CRT de malaria: cepa 3D7 de tipo natural (----), cepa 7G8
mutante (-·-·-·-), y un heterocigoto con una proporción de alelos igual (-----), en presencia de una polimerasa exo⁺,
20 con una desnaturalización inicial de una pausa de 2 minutos a 95°C, seguido por 55 ciclos de 94°C durante 30 s, 30
segundos de una etapa de apareamiento en gradiente programada entre 50 y 68°C (50°C, 51,4°C, 53,6°C, 56,8°C,
61,4°C, 64,6°C, 66,8°C y 68°C), es decir, se cicló cada muestra utilizando una temperatura de desnaturalización de
94°C y una de las diversas temperaturas de apareamiento. La figura 3 no muestra evidencias en los heterocigotos
de amplificación preferente del alelo de T_m inferior a pesar de ocho temperaturas de apareamiento diferentes
25 utilizadas. Se muestran cuatro muestras amplificadas utilizando las temperaturas de apareamiento de 56,8°C y
61,4°C (se predice que el sesgo de amplificación de alelos máximo está en este intervalo) como (-·-·-·-), que es
básicamente indistinguible de los otros heterocigotos.

30 Experimentación adicional ha mostrado que una velocidad en rampa de 6°C/s ha producido resultados satisfactorios
para prácticamente todos los ensayos sometidos a prueba hasta la fecha. Aunque los ensayos individuales pueden
variar, se espera que una velocidad en rampa de como mínimo 4°C debería ser una velocidad suficiente para la
mayoría de ensayos, mientras que muchos ensayos no logran mostrar sesgo de amplificación de alelos con una
velocidad en rampa de 2,0°C o menor. Además, se entiende que la velocidad en rampa de enfriamiento entre la
temperatura de desnaturalización y la temperatura de apareamiento puede generar sesgo de amplificación según
35 cuánto tiempo sean los cebadores lo suficientemente estables para empezar la hibridación y la polimerasa activa
para extenderse a las temperaturas mayores antes de alcanzar la temperatura de apareamiento programada.

Ejemplo 4. Detección de fracción de alelo baja.

40 Se estudiaron los efectos de la utilización de una polimerasa exo⁺ (NEB Taq) en comparación con la utilización de
una polimerasa exo⁻ (anticuerpo Klentaq + eEnzyme). Se amplificó un fragmento de 99 pb del exón 8 de p53 con los
siguientes cebadores y sonda:

45 p53x8 directo: C T A C T G G G A C G G A A C A G C T T (SEQ ID NO. 4)
p53x8 inverso: G T G A G G C T C C C C T T T C T T G (SEQ ID NO. 5)
p53x8 prb1: T G A G G T G C G T G T T T G T C C T G T C (SEQ ID NO. 6)

50 La sonda tiene un espaciador de tres carbonos en el extremo 3' para bloquear la extensión, y tiene una T_m
observada de aproximadamente 75°C. Un mutante que tiene un emparejamiento erróneo en la 9ª base, mostrado
como una "g" minúscula anteriormente (G -> T), tiene una T_m observada de aproximadamente 69°C. La figura 4a
muestra amplificación de tipo natural (----), mutante (-·-·-·-) y un heterocigoto con una proporción de alelos igual
(-----), en presencia de una polimerasa exo⁺, con una desnaturalización inicial de una pausa de 2 minutos a 95°C,
seguido por 55 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 30 segundos a un gradiente de temperatura de apareamiento
entre 63 y 73°C (teniendo cada muestra una temperatura de apareamiento ligeramente diferente), y extensión a
77°C. La figura 4a no muestra evidencias en los heterocigotos de amplificación preferente del alelo de T_m inferior a
55 pesar de ocho temperaturas de apareamiento diferentes utilizadas. La muestra (-·-·-·-) tenía una temperatura de
apareamiento de 69°C, que todavía no mostró sesgo de amplificación.

60 La figura 4b muestra reacciones similares a las de la figura 4a, excepto porque utiliza una polimerasa exo⁻. Estos
experimentos se establecieron conjuntamente y se ejecutaron en el mismo protocolo que los observados en la figura
4a. Tal como se puede observar en la figura 4b, se favorece la amplificación del alelo mutante. Por tanto, a modo
ilustrativo, se desea una polimerasa exo⁺, u otra polimerasa que esté afectada por la hibridación de la sonda. La
muestra (-·-·-·-) se corresponde con 69°C, que, en este ejemplo, proporciona el mejor sesgo de amplificación de
alelos.

Ejemplo 5. Análisis de la temperatura de apareamiento.

En este ejemplo, se estudia el efecto de la temperatura de apareamiento. La diana utilizada en este ejemplo es el exón 11 de PAH humano. Se utiliza ADN genómico humano en una concentración de 15 ng/reacción con los siguientes cebadores y sonda sin marcar.

Cebador directo: AAGACAGCCATCCAAAATTACAC (SEQ ID NO. 7)

Cebador inverso: TTTGTCACCCACTCACCTTACTT (SEQ ID NO. 8)

Sonda: GAGTTCCAGCCCCTgTATTACGTG-bloqueante C3 (SEQ ID NO. 9) La amplificación que utiliza los cebadores anteriores da como resultado un amplicón de 105 pb. El G/C SNP rs772897 se indica en minúsculas. En todos estos ejemplos, los homocigotos de Tm alta se muestran como (----), los heterocigotos (mezcla 50:50) se muestran como (-----) y los homocigotos de Tm baja se muestran como (- - -).

Las figuras 5a-c muestran los resultados de amplificación en el instrumento iCycler (Bio-Rad) con las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos, seguido por 55 ciclos de 94°C durante 30 segundos y X°C durante 30 segundos, en donde X es una temperatura de apareamiento entre 60 y 72°C en incrementos de 1°C; es decir, se cicló cada muestra utilizando una temperatura de desnaturalización de 94°C y una de las diversas temperaturas de apareamiento, con una velocidad en rampa de entre 1,5 y 2,0°C/s. Tras la PCR, se generan heterodúplex mediante fusión a 95°C durante 30 s, seguido por 28°C durante 30 segundos. Los amplicones resultantes se fundieron en un instrumento de fusión LIGHTSCANNER desde 45°C hasta 95°C a una velocidad de calentamiento convencional. Tal como se observa en la figura 5b, independientemente de qué temperatura de apareamiento se utilice, los heterocigotos dan como resultado todos en general dos picos de fusión uniformes, lo que indica que no existe sesgo hacia el alelo que tiene la Tm inferior. Tal como se comentó anteriormente, se cree que la velocidad en rampa de 1,5 a 2,0°C/s puede ser demasiado lenta para algunos ensayos, lo que permite que la sonda sin marcar se elimine por fusión del alelo de Tm superior y permita la extensión. Se indica que este ensayo da como resultado a veces algo de amplificación inespecífica, indicada por los controles negativos en la figura 5c (rombos). La amplificación inespecífica da como resultado habitualmente un punto de cruce retrasado y menor fluorescencia en la curva de amplificación, así como una falta de picos de fusión adecuados en las curvas de fusión derivadas.

Las figuras 6a-c muestran los resultados de la amplificación por ciclado rápido a velocidades en rampa de amplificación de aproximadamente 4 - 6°C/s de la misma diana utilizando una temperatura de apareamiento de 60°C. El alelo de Tm inferior tiene una Tm observada de aproximadamente 67°C, mientras que el alelo de Tm superior tiene una Tm observada de aproximadamente 72°C. Por tanto, la temperatura de apareamiento de 60°C está en un extremo muy bajo del pico de fusión del alelo de Tm inferior y está muy por debajo de todo el pico del alelo de Tm superior. Tal como se observa en la figura 6b, los homocigotos de Tm baja y los heterocigotos muestran curvas de fusión casi idénticas, y el homocigoto de Tm alta muestra principalmente amplificación inespecífica, lo que indica que el alelo de Tm inferior está favorecido completamente, por la eliminación de prácticamente toda la amplificación del alelo de Tm alta.

Las figuras 7a-c muestran resultados similares utilizando una temperatura de apareamiento de 62°C. Sin embargo, aunque los homocigotos de Tm baja y los heterocigotos muestran curvas de fusión casi idénticas, se puede observar un pico muy pequeño a 70°C con los heterocigotos, y el homocigoto de Tm alta muestra algo de amplificación. El punto de cruce del alelo de Tm alta se desplaza aproximadamente 6,5 ciclos. El examen del pico de fusión para el alelo de Tm alta muestra una ligera área bajo el pico de fusión a 62°C. Dado que la hibridación es un equilibrio dinámico, se cree que algún porcentaje de sondas se fundirá del alelo de Tm alta, incluso a 62°C, permitiendo, por tanto, alguna amplificación mínima. Aún así, dado que la unión de la sonda al alelo de Tm alta es muy estable, la amplificación del alelo de Tm baja está fuertemente favorecida.

Las figuras 8a-c muestran resultados similares utilizando una temperatura de apareamiento de 64°C. Se retrasa la amplificación del alelo de Tm alta, pero no tanto como con una temperatura de apareamiento de 62°C (aproximadamente 4 ciclos frente a 6,5 ciclos). En los heterocigotos, existe un punto de fusión pequeño pero fácilmente reconocible a 70°C, que muestra algo de amplificación del alelo de Tm superior en los heterocigotos.

Las figuras 9a-c muestran los resultados con una temperatura de apareamiento de 65°C. Se retrasa la amplificación del homocigoto de Tm alta sólo aproximadamente 2,5 ciclos, y el heterocigoto muestra un pico más definido a 70°C. Aún así, el alelo de Tm baja está fuertemente favorecido.

Las figuras 10a-c muestran los resultados con una temperatura de apareamiento de 67°C. Esta temperatura de apareamiento está aproximadamente a mitad de camino entre las dos Tm. Se retrasa la amplificación del homocigoto de Tm alta sólo aproximadamente 1,5 ciclos. Aunque el heterocigoto muestra claramente un pico de fusión a 70°C, se favorece todavía el alelo de Tm baja.

Las figuras 11a-c muestran los resultados con una temperatura de apareamiento de 68°C. Se retrasa la amplificación del homocigoto de Tm alta sólo aproximadamente 0,6 ciclos. El heterocigoto muestra claramente un pico de fusión a 70°C, pero el pico a 65°C es todavía mayor.

Las figuras 12a-c muestran los resultados con una temperatura de apareamiento de 69°C. Esta temperatura de apareamiento está sólo aproximadamente un °C por debajo de la Tm del alelo de Tm alta. Se retrasa la amplificación del homocigoto de Tm alta sólo aproximadamente 0,7 ciclos. Aún así, los picos de fusión muestran que la amplificación del alelo de Tm baja se favorece todavía.

Las figuras 13a-c muestran los resultados con una temperatura de apareamiento de 70°C. Esta temperatura de apareamiento es aproximadamente la misma temperatura que la Tm del alelo de Tm alta. Se retrasa la amplificación del homocigoto de Tm alta sólo aproximadamente 0,4 ciclos. Los picos de fusión muestran que la amplificación del alelo de Tm baja sólo está ligeramente favorecida.

Debido a la Tm de los cebadores en este ejemplo, es difícil obtener amplificación utilizando temperaturas de apareamiento significativamente por encima de 70°C. Aún así, si los cebadores se extienden para elevar su Tm, se espera que temperaturas de apareamiento por encima pero próximas a la Tm alta de alelo interferirían con la amplificación de ese alelo, mientras que no interferirían con la amplificación del alelo de Tm baja, siempre que la temperatura de apareamiento esté por debajo de la curva del pico de fusión de Tm alta.

En algunas realizaciones, se puede desear sólo detectar la presencia del alelo de Tm baja, que puede estar presente en fracciones muy pequeñas de alelo. En ese caso, se puede desear una temperatura de apareamiento baja, tal como se muestra en la figura 6b o 6b. En otras realizaciones, se puede desear seleccionar una temperatura de apareamiento que favorece el alelo de Tm baja pero que todavía permite la amplificación del alelo de Tm superior. En tales realizaciones, se puede desear una temperatura de apareamiento a o ligeramente por encima de la Tm del alelo de Tm baja, tal como se muestra en las figuras 9b o 10b. Se pueden desear otros grados de sesgo de alelo, según el ensayo específico.

En una realización, la temperatura de apareamiento para un ensayo particular se determina ejecutando muestras a una mezcla de tipo natural:mutante 50:50, utilizando la Tm del alelo mutante. Si existe sesgo de amplificación de alelos, se observará una disminución en el pico de tipo natural. Si el pico de tipo natural no ha disminuido significativamente, la temperatura de apareamiento puede caer, a modo ilustrativo en incrementos de 2°C, aunque se pueden utilizar otros incrementos, y se vuelve a ejecutar la mezcla de muestra hasta la extinción completa del alelo de tipo natural. A menudo es deseable utilizar una temperatura de apareamiento algo mayor que la temperatura de extinción. Por tanto, la temperatura de apareamiento optimizada puede estar a modo ilustrativo 2°C por encima de la temperatura de extinción. Se puede confirmar la idoneidad de la temperatura de apareamiento utilizando diluciones en serie del alelo mutante en presencia del alelo de tipo natural hasta los niveles de sensibilidad deseados.

Ejemplo 6. Sesgo de amplificación de alelos utilizando cebadores Snapback.

En este ejemplo, se utiliza un SNP de rs149041370 con una variación A/G para estudiar el enriquecimiento del alelo con cebadores Snapback.

Se extrajo ADN de sangre humana utilizando un kit de aislamiento de ADN de Puregen (Gentra Systems). Se cuantificaron las concentraciones de ADN mediante NanoDrop (Thermo Scientific) y el punto de cruce de PCR. Se entiende que el mismo punto de cruce de PCR indica la misma concentración de moldes de ADN. Se utilizaron los siguientes cebadores:

Cebador directo: AGCTCAGAACTGCCTGGTGT (SEQ ID NO. 10)

Cebador inverso: acGTTCTTTGCAGAACTGGCTGGTctctggctgtccacacctgaa (SEQ ID NO. 11). El elemento de sonda se muestra en mayúsculas en el cebador inverso, con el sitio de SNP mostrado subrayado en el mismo. El cebador es la sección de 23 pb en el extremo 3' del cebador inverso. Las dos bases mostradas en minúsculas en el extremo 5' del cebador inverso tienen emparejamiento erróneo para evitar la extensión cuando el elemento de sonda se une en el amplicón complementario. La cola de cebador inverso es un complemento perfecto para el alelo G. El tamaño de amplicón es de 133 pb.

Se realizó PCR en volúmenes de reacción de 10 µl que contenían MgCl₂ 1,5, 2 ó 3 mmol/l, Tris 50 mmol/l (pH 8,3), albúmina sérica bovina 500 mg/l, 200 µmol/l de cada dNTP, 0,4 unidades de polimerasa KLENTAQ (AB Peptides), anticuerpo monoclonal anti-Taq 64 ng/µl (eENZYME), LCGREEN Plus 0,5x, 0,05 µm de cebador directo, 0,5 µm de cebador Snapback (inverso) y 50 ng de ADN genómico humano. Se realizó PCR en un instrumento LIGHTCYCLER (Roche) durante 70 ciclos con desnaturalización a 95°C (pausa de 0 s), apareamiento a 63°C (pausa 0) y extensión a 63°C (pausa de 2 s). Tras la PCR, se retiraron entonces las muestras capilares del instrumento LIGHTCYCLER, se colocaron en el instrumento de fusión de alta resolución HR-1 (Idaho Technology) y se fundieron desde 60°C hasta 92°C con un rampa de 0,5°C/s. Se entiende que este procedimiento de PCR, utilizando un instrumento LIGHTCYCLER, con fusión a continuación en un instrumento HR-1, es equivalente a amplificación y fusión post-PCR en un instrumento LS32. Las velocidades en rampa en el instrumento LIGHTCYCLER son comparables con el ciclado rápido del instrumento LS32.

Se normalizaron las curvas de fusión utilizando sustracción exponencial de fondo (véase la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2009-0222503), y se diferenciaron usando ajuste de Savitzky-Golay (Palais R, Wittwer CT. Methods Enzymol 2009; 454:323-43). En una realización, se calculan fracciones de alelo para un protocolo particular mediante alturas de picos ponderados tal como se ilustra en la figura 24. Específicamente, $D_w(T)$ es la derivada negativa de la curva de fusión normalizada de una muestra de tipo natural, $D_m(T)$ es la derivada negativa de la curva de fusión normalizada de una muestra de homocigoto mutante 50:50 y $D_f(T)$ es la derivada negativa de la curva de fusión normalizada de una mezcla fraccionaria de los dos. Si el elemento de sonda Snapback coincide con el alelo de tipo natural, $D_m(T)$ tendrá un pico a una temperatura T_L baja y $D_w(T)$ tendrá un pico a una temperatura T_H alta con $T_L < T_H$. $D_f(T)$ presenta normalmente dos picos correspondientes a la fusión del alelo con emparejamiento erróneo a T_L y el alelo emparejado a T_H . La fracción de alelo mutante se calcula como el promedio ponderado de dos estimaciones como $F_m = W_L f(T_L) + W_H f(T_H)$ en la que W_L y W_H son las ponderaciones y $f(T_L)$ y $f(T_H)$ son las estimaciones individuales a cada pico de temperatura. Las ponderaciones se determinan mediante las magnitudes relativas de la muestra mixta por encima de los niveles iniciales de las muestras no mixtas para favorecer el pico mayor: $w_L = a/(a+b)$ y $w_H = b/(a+b)$ (figura 24). Las estimaciones individuales $f(T_L)$ y $f(T_H)$ se obtienen proporcionalmente a cada temperatura: $f(T_L) = a/d$ y $f(T_H) = c/e$. Por tanto $F_m = (a^2e + bcd)/(de(a+b))$. Se entiende que si el protocolo cambia para afectar a las alturas de pico del heterocigoto (por ejemplo, un cambio en la temperatura de apareamiento, concentración de Mg^{++} , tiempo de extensión, etc.), los valores de a , b , c , d , y e cambiarán, y la ecuación es válida para esa forma de curva de heterocigoto 50:50 específica. Por tanto, la fórmula proporciona un ajuste para volver a calcular la concentración de partida de cada alelo. Se entiende que se pueden calcular fracciones de alelo según cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento utilizando este u otros procedimientos, tales como mediante comparación con una serie de dilución. En la técnica se conocen otros procedimientos. Véase la solicitud de patente U.S.A. n.º 2003-0104438.A continuación, se presenta información adicional sobre los procedimientos para calcular fracciones de alelo a continuación en el ejemplo 9.

25 Efectos del enriquecimiento de alelo raro durante la PCR

1. Temperatura de desnaturalización: se realizó PCR con una temperatura de desnaturalización de 95°C, 90°C, 89°C u 88°C. Tal como se observa en las figuras 14a-d, una temperatura de desnaturalización de 95°C frente a 90°C no tuvo efecto sobre el enriquecimiento del pico de emparejamiento erróneo. 88°C fue una temperatura de desnaturalización demasiado baja, y el molde no se amplificó bien.

2. Temperatura de apareamiento: en las figuras 15a-d, la temperatura de desnaturalización se mantuvo a 95°C y extensión a 76°C, mientras que la temperatura de apareamiento estaba a 55°C, 58°C, 61°C o 63°C. Tal como se encontró con sondas sin marcar, la temperatura de apareamiento no tuvo ningún efecto sobre la proporción de amplificación de alelos cuando la temperatura de extensión se mantiene cerca de la T_m del alelo emparejado.

3. Temperatura de extensión: en las figuras 16a-d, la temperatura de desnaturalización se mantuvo a 95°C y la temperatura de apareamiento a 63°C, mientras que la temperatura de extensión era de 74°C, 72°C, 70°C o 68°C. Tal como se encontró con sondas sin marcar, cuanto menor sea la temperatura de extensión (hasta temperaturas de aproximadamente la de la T_m de sonda emparejada), más enriquece la amplificación el alelo de emparejamiento erróneo.

4. Tiempo de extensión: las figuras 17a-b muestran que con un tiempo de extensión más corto, disminuyendo desde 5 segundos hasta 1 segundo, el alelo de emparejamiento erróneo se enriquece significativamente. Con la temperatura de extensión de 68°C y el tiempo de extensión de 1 segundo, en las mezclas 1:1 y 1:10 el producto de amplificación es ahora en su mayoría el alelo A, y en la mezcla 1:100, el producto de amplificación es ahora aproximadamente el 50% de cada alelo. La mezcla 1:1000 es diferente notablemente del alelo G puro. Por tanto, el grado de enriquecimiento del alelo está fuertemente relacionado con el tiempo de extensión de PCR. Tal como se resume en la figura 26a, cuando el tiempo de extensión era de 20 segundos (típico de PCR convencional), las muestras con una proporción de 1:1000 (mutante a tipo natural) no se enriquecieron suficientemente para la detección. Sin embargo, a medida que el tiempo de extensión se reduce, estos alelos raros se vuelven fáciles de detectar. En el caso extremo con un tiempo de extensión de 0 segundos, la fracción del alelo mutante resultante se aumentó desde el 0,1% (1:1000) hasta el 29%. La sensibilidad mejorada de tiempos de extensión cortos tiene la ventaja añadida de acelerar la finalización de la PCR, a modo ilustrativo a sólo de 20 a 25 minutos (~20 s/ciclo).

5. Concentración de Mg: En las figuras 18a-c, se utilizaron las condiciones de ciclado de la etapa 4 anterior, y las concentraciones de Mg fueron de 1,5 mM, 2 mM y 3 mM. La concentración de magnesio más baja (tampón Mg 1,5 mM) proporcionó buena amplificación del alelo secundario en la mezcla 1:1000. La concentración de magnesio parecía dar como resultado esencialmente amplificación uniforme de los alelos principales y secundarios. La figura 26b resume el trabajo adicional con concentraciones de Mg^{++} libre que oscilan entre 2,2 mM y 0,8 mM, con una proporción 1:1000 de mutación con respecto a molde de tipo natural. La fracción de mutación aparente aumentó desde indetectable hasta el 48% a medida que se redujo la concentración de Mg^{++} . Una explicación puede ser que una concentración de Mg^{++} menor aumenta la amplificación del heterocigoto, aumentando por tanto la razón de heterodúplex. Otra explicación puede ser que el alelo de mutación no forma una horquilla a la concentración de Mg^{++} menor, permitiendo por tanto que el alelo de mutación se amplifique más rápidamente.

6. Longitud de la cola: se variaron las longitudes de cola (elementos de sonda), usando 9 pb (T_m 64°C), 13 pb (T_m 72°C), 17 pb (T_m 74°C) y 21pb (T_m 77°C). Colas más largas tienen T_m superior y, tal como se observa en las figuras 19a-d, la T_m superior enriquece el alelo con emparejamiento erróneo. Cuando se utilizan colas más cortas, es posible obtener enriquecimiento del alelo secundario reduciendo la temperatura de extensión hasta por debajo de la T_m del alelo emparejado, siempre que la temperatura de extensión no se reduzca por debajo de la temperatura

eficaz de la polimerasa.

Los resultados mostrados en las figuras 14-19 son coherentes con los resultados mostrados anteriormente para las sondas sin marcar. En este ejemplo, se utilizaron temperaturas de apareamiento y de extensión diferenciadas, pero cuando se escogieron temperaturas de extensión de modo que la mayoría o todo el elemento de sonda emparejado se une y la mayoría del elemento con emparejamiento erróneo se elimina por fusión, entonces el alelo con emparejamiento erróneo se amplifica preferentemente. La figura 16 muestra que, a medida que se reduce la temperatura de extensión, la amplificación del alelo con emparejamiento erróneo se favorece cada vez más. Además, en este ejemplo, con cebadores Snapback se ha encontrado también que un tiempo de extensión corto y menor concentración de Mg favorece la amplificación de alelo de emparejamiento erróneo, de modo que puede analizarse una proporción de ADN de 1:1000 o incluso mayor, tal como puede observarse en la figura 20. Se espera que estos efectos se observen también con sondas sin marcar y otras sondas según la presente invención.

Sin limitarse a ninguna teoría particular, se cree que la amplificación utilizando cebadores Snapback favorece el alelo de emparejamiento erróneo por los motivos comentados anteriormente con respecto a sondas sin marcar. Sin embargo, dado que los cebadores Snapback forman estructuras de bucle intramoleculares, se cree que no sólo la sección de sonda emparejada interferirá con la extensión en una interacción intermolecular con otra secuencia diana o cuando el bucle está en el sentido de 3' (como con amplificación de un amplicón utilizando el cebador directo comentado anteriormente), sino que interferirá también con el apareamiento del cebador Snapback (inverso) con el producto de amplificación en bucle. El mecanismo probable de enriquecimiento del alelo mediante cebadores Snapback se muestra en la figura 25. El elemento de sonda Snapback tiene emparejamiento erróneo con el alelo de mutación, desestabilizando la horquilla y permitiendo que la polimerasa despliegue la estructura secundaria y complete la extensión del producto de PCR de longitud completa (figura 25, a la izquierda). Sin embargo, el elemento de sonda Snapback se empareja completamente con el alelo de tipo natural, bloqueando la extensión con una horquilla más estable y evitando la formación del producto de PCR de longitud completa (figura 25, a la derecha). Puesto que la amplificación diferencial depende de la estabilidad de la horquilla relativa que resulta de un único emparejamiento erróneo, un enriquecimiento satisfactorio depende probablemente de las condiciones de amplificación, incluyendo actividad de desplazamiento de la polimerasa, la temperatura de apareamiento relativa a la estabilidad de la horquilla y el tiempo de extensión. Se cree que los cebadores Snapback pueden ser capaces de sesgar la amplificación del alelo de emparejamiento erróneo hasta un grado mayor que el de sondas sin marcar. Finalmente, se ha encontrado que una polimerasa exo^+ es más compatible con el enriquecimiento del alelo utilizando cebadores Snapback que con sondas sin marcar. Esto puede deberse al emparejamiento erróneo en 5' en el elemento de sonda.

Ejemplo 7. Identificación de tumor ciego utilizando: cebadores Snapback.

Los nódulos tiroideos son bastante comunes y se encuentran en aproximadamente el 5% de las mujeres y en el 1% de los hombres, por lo que más del 90% son nódulos hiperplásicos benignos o adenomas foliculares. Si es maligno, el diagnóstico suele ser carcinoma tiroideo papilar, PTC. A menudo, uno de los 15 ARNm quiméricos que implican al protooncogén RET, una tirosina-quinasa, se menciona como la causa de PTC. Tanto el cáncer tiroideo medular como el cáncer tiroideo papilar están estrictamente vinculados con mutaciones activantes en el gen RET. Están presentes transposiciones de RET, provocadas por inversiones o traslocaciones cromosómicas, en el 20-40% de los casos de PTC. Sin embargo, recientemente se mencionó una mutación somática del gen BRAF, c.1799 T>A, que provoca una sustitución de valina por glutamato, p.V600E, como el cambio más común en los PTC que da como resultado más del 80% de los cánceres tiroideos. Esta sustitución de aminoácido conduce a la activación constitutiva y la desregulación de la ruta de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). En este ejemplo, se estudia la mutación puntual de la mutación de B-raf V600E (T → A).

Se extrajo ADN de mutación homocigótica de B-raf V600E de la línea celular humana HTB-72 (ATCC) utilizando un kit de aislamiento de ADN de Puregen (Gentra Systems). Se cuantificaron las concentraciones de ADN mediante NanoDrop (Thermo Scientific) y se ajustaron utilizando el punto de cruce de PCR. ARUP (Salt Lake City, UT) proporcionó 47 pares de muestras de tejido tumoral sometido a prueba previamente y de ADN de nódulo tiroideo de aguja para un ensayo ciego (Leslie R Rowe, y otros CytoJournal 2006, 3:10). Se utilizaron los siguientes cebadores, con la misma significación que en el ejemplo 6:

Cebador directo: tgttttctttacttactacacctcg (SEQ ID NO. 12)

Cebador inverso: aaTCTAGCTACAGTGAATCTCGATGtcagtgaaaaatagcctcaattc (SEQ ID NO. 13).

El tamaño de amplicón es de 145 pb.

Se realizó PCR en volúmenes de reacción de 10 μ l que contenían $MgCl_2$ 2 mmol/l, Tris 50 mmol/l (pH 8,3), albúmina sérica bovina 500 mg/l, 200 μ mol/l de cada dNTP, 0,4 unidades de polimerasa KLENTAQ (AB Peptides), anticuerpo monoclonal Ati-Taq 64 ng/ μ l (eENZYME), LCGREEN Plus 0,5x, 0,05 μ m de cebador directo, 0,5 μ m de cebador Snapback (inverso) y 50 ng de ADN genómico humano. Se realizó PCR en un instrumento LIGHTCYCLER (Roche) durante 70 ciclos con desnaturalización a 95°C (pausa de 0 s), apareamiento a 52°C (pausa 0) y extensión a 64°C (pausa de 0 s). Tras las PCR, se retiraron entonces las muestras capilares del instrumento LIGHTCYCLER, se colocaron en el instrumento de fusión de alta resolución HR-1 y se fundieron desde 60°C hasta 88°C con una rampa

de 0,5°C/s.

Para comparación, se utilizó el mismo cebador directo con el elemento de cebador del cebador inverso anterior (tcagtggaaaaatagcctcaattc (SEQ ID NO. 14)) en PCR simétrica convencional para amplificar un amplicón de 183 pb en PCR simétrica convencional. Utilizando esta PCR convencional, se podía detectar una proporción de mutación de B-raf con respecto de ADN de tipo natural de 1:25, mientras que el protocolo de PCR de cebador Snapback explicado resumidamente en el párrafo anterior puede enriquecer PCR para detectar 1:100 (figuras 21a-b). Los resultados se confirmaron utilizando secuenciación.

Tras el análisis ciego, todas las muestras concordaban excepto 2 muestras que eran positivas mediante cebadores Snapback pero negativas mediante sondas de hibridación. Una muestra de aguja contenía V600E en una cantidad menor del 1%. Una frecuencia tan pequeña no se puede detectar mediante PCR convencional, pero tal como se observa cuando la línea (- - -) ((- - -)) es control 1:100) en la figura 22, esto es detectable mediante enriquecimiento de cebador Snapback.

Ejemplo 8. Detección de delección pequeña utilizando cebadores Snapback.

Se han detectado mutaciones somáticas en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y se asocian con sensibilidad al tratamiento con los fármacos Gefitinib o Erlotinib. Dos de los tipos más comunes de mutaciones de EGFR somáticas son delecciones pequeñas del exón 19 y la mutación puntual L858R (que representan aproximadamente el 85%). En este ejemplo, el exón19 de EGFR se utiliza para mostrar que el procedimiento de enriquecimiento del cebador Snapback podía detectar una delección pequeña.

Se extrajo ADN de mutación homocigótica E746-A750 de EGFR de la línea celular humana CRL-5883 (ATCC) utilizando un kit de aislamiento de ADN de Puregen (Gentra Systems). Se cuantificaron las concentraciones de ADN mediante NanoDrop (Thermo Scientific) y se ajustaron utilizando el punto de cruce de PCR. Se utilizaron los siguientes cebadores, con la misma significación que en el ejemplo 6:

Cebador directo: TGGATCCCAGAAGGTGAGAA (SEQ ID NO. 15)
Cebador inverso: ccAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGagcagaaactcacatcgagga (SEQ ID NO. 16). Tal como anteriormente, el elemento de sonda coincide con el tipo natural. El tamaño de amplicón de tipo natural es de 131 pb en el tipo natural. Se estudiaron varias delecciones, ambas de las cuales se solapan parcialmente con el elemento de sonda.

Se realizó PCR en volúmenes de reacción de 10 μ l que contenían MgCl₂ 2 mmol/l, Tris 50 mmol/l (pH 8,3), albúmina sérica bovina 500 mg/l, 200 μ mol/l de cada dNTP, 0,4 unidades de polimerasa KLENTAQ (AB Peptides), anticuerpo monoclonal Ati-Taq 64 ng/ μ l (eENZYME), LCGREEN Plus 0,5x, 0,05 μ m de cebador directo, 0,5 μ m de cebador Snapback (inverso) y 50 ng de ADN genómico humano. Se realizó PCR en un instrumento LIGHTCYCLER (Roche) durante 70 ciclos con desnaturalización a 95°C (pausa de 0 s), apareamiento a 55°C (pausa de 0) y extensión a 64°C (pausa de 0 segundos - detección a esta temperatura durante una pausa de 0,2°C por muestra). Tras la PCR, se retiraron entonces las muestras capilares del instrumento LIGHTCYCLER, se colocaron en el instrumento de fusión de alta resolución HR-1 (Idaho Technology) y se fundieron desde 60°C hasta 88°C con una rampa de 0,5°C/s.

En este ejemplo, debido a la delección, existe separación sustancial de los picos de fusión y las temperaturas de apareamiento y extensión utilizadas están ambas por debajo de prácticamente todo el pico de tipo natural. Tal como se observa en la figura 23, proporciones de delección E476-A750 del exón 19 de EGFR con respecto a ADN de tipo natural de 1:1000 (el mutante es el alelo raro) son fácilmente distinguibles del tipo natural, e incluso una proporción de 1:10000 se puede distinguir del tipo natural mediante PCR de enriquecimiento del cebador Snapback.

Ejemplo 9. Procedimientos para determinar fracciones de alelo

Cuando se funden los productos de PCR en presencia de colorantes de ADN, la dependencia medida de fluorescencia sin procesar R(T) de la temperatura T incluye dos componentes primarios. Para un colorante de saturación e intercalante (de alta resolución), M(T) es estrechamente proporcional a la cantidad total de ADN que está en su estado bicatenario, ADN_{bc}, a temperatura T. El resto de la fluorescencia sin procesar, B(T), se puede modelar a modo ilustrativo mediante un decaimiento exponencial, particularmente en los regímenes de temperatura de interés actual, es decir, aquellos en los que sondas de oligonucleótido cortas (sin marcar o Snapback) se desnaturalizan a su forma de espiral aleatoria. Después de que se elimine B(T), utilizando a modo ilustrativo el procedimiento de sustracción de fondo exponencial (véase la solicitud de patente U.S.A. n.º 2009- 0222503), y M(T) se escala a fluorescencia con fondo eliminado y normalizada F(T), a modo ilustrativo en el intervalo [0,1], la combinación convexa se aproxima bien a la curva resultante (es decir, una suma de coeficientes no negativos cuya suma total es igual a 1) de curvas de fusión termodinámicas de van 'tHoff de dos estados. Estos modelos para B(T) y F(T) se describen ambos en (Palais R y Wittwer CT, Methods in Enzymology 454:323-43, 2009).

En las realizaciones ilustrativas presentadas en el presente documento, el modelo puede simplificarse

considerablemente mediante la reducción en el número de especies implicadas en las reacciones en regímenes de temperatura en los que se funden las sondas. Dado que se utilizan sondas, tales como sondas sin marcar y cebadores Snapback, sólo dos de los cuatro dúplex posibles que se producen normalmente en heterocigoto diploide bialélico natural y fusión de amplicones de mezcla sintética están presentes en la curva de fusión en los intervalos de temperatura de sonda.

Desde esta perspectiva, $F(T)$, es una combinación convexa

$$F(T) = c_M F_M(T) + c_W F_W(T),$$

es decir, en la que los coeficientes de fracción de alelo no negativos, c_M y c_W satisfacen $c_M + c_W = 1$.

Mediante linealidad de diferenciación, las curvas derivadas negativas de las curvas de fusión normalizadas adecuadamente, $D(T)$, es una combinación convexa de las curvas derivadas negativas normalizadas y definidas de manera similar correspondientes a las dos especies de dúplex (a modo ilustrativo, sonda con WT (tipo natural) y sonda con MUT):

$$D(T) = -F'(T) = c_M D_M(T) + c_W D_W(T).$$

Por tanto, tal como se ilustra en la figura 24, la derivada negativa presenta dos picos cuyas magnitudes se miden mediante cualquiera de varios procedimientos descritos a continuación y reflejan la proporción relativa de las dos especies de producto, presumiblemente una que coincide con la sonda (en el sentido de complemento inverso), y otra con una T_m inferior que contiene algo de emparejamiento erróneo. En el presente documento, lo primero se denomina WT (tipo natural) y lo último MUT, aunque se entiende que el emparejamiento perfecto no siempre es el alelo de tipo natural y el alelo con el emparejamiento erróneo no siempre contiene una mutación.

Es una advertencia importante que, para el problema de cuantificar las fracciones de molde iniciales, se necesita información sobre la eficacia relativa de amplificación para evaluar las frecuencias de alelos originales. Tal como se muestra en los múltiples ejemplos anteriores, dos muestras con la misma proporción de alelos inicial podrían amplificarse con niveles variables de enriquecimiento selectivo de un alelo en particular, para dar como resultado productos que se miden con proporciones de alelos finales muy diferentes. A la inversa, muestras con proporciones iniciales distintas pueden producir productos finales con la misma proporción, a modo ilustrativo si se utilizan protocolos de amplificación diferentes adecuadamente. Además de los procedimientos presentados en el presente documento, también pueden utilizarse procedimientos tales como curvas patrón derivadas de series de dilución, así como diversos procedimientos teóricos para convertir las proporciones de producto final para obtener proporciones de molde iniciales en cualquier protocolo de amplificación reproducible particular (por ejemplo, tiempo de extensión, concentración de magnesio).

En un procedimiento ilustrativo de cálculo de las fracciones de alelo, $D_a(T)$ denota la derivada negativa de la curva de fusión normalizada de una muestra, donde el subíndice a representa tipo natural (w), mutante homocigoto (m) o una mezcla fraccionaria de los dos (f). Si un cebador Snapback (o sonda sin marcar u otra sonda) coincide con el alelo de tipo natural, la curva derivada negativa de mutante puro, $D_m(T)$, presentará un pico a una temperatura T_L y la curva derivada negativa de tipo natural puro, $D_w(T)$, presentará un pico a una temperatura T_H , con L para inferior y H para superior como $T_L < T_H$. (Se entiende que si el Snapback coincide con el alelo mutante, entonces pueden invertirse simplemente los roles de T_L y T_H a continuación). La curva derivada negativa de una mezcla fraccionaria, $D_f(T)$, presenta normalmente dos picos correspondientes a la fusión del cebador Snapback, uno del alelo de emparejamiento erróneo a una temperatura inferior T_L , y uno del alelo emparejado a una temperatura superior T_H . Cuando las proporciones de la mezcla de alelos están lejos de ser iguales, el alelo minoritario presenta un pico débil, o no presenta pico, a la temperatura correspondiente. Para tener esto en cuenta, se puede cuantificar el alelo mutante utilizando un promedio ponderado de dos estimaciones,

$$F_m = w_L f(T_L) + w_H f(T_H),$$

cada una obtenida a una de estas temperaturas de fusión. Las ponderaciones para cada pico de temperatura se determinan mediante alturas relativas de las magnitudes de la muestra mixta por encima de la de los niveles iniciales de las muestras no mixtas que se funde a la otra temperatura:

$$w_L = (D_f(T_L) - D_w(T_L)) / (D_f(T_L) + D_f(T_H) - (D_w(T_L) + D_m(T_H))) \quad (=a/(a+b) \text{ en la figura 24})$$

y

$$w_H = (D_f(T_H) - D_m(T_H)) / (D_f(T_L) + D_f(T_H) - (D_w(T_L) + D_m(T_H))) \quad (=b/(a+b) \text{ en la figura 24}).$$

Las ponderaciones son positivas, su suma es 1, y favorecen el pico definido más claramente.

Las estimaciones individuales $f(T_L)$, $f(T_H)$, pueden obtenerse mediante interpolación lineal de $D_f(T)$ entre $D_w(T)$ y $D_m(T)$ a las dos temperaturas:

$$f(T_L) = (D_f(T_L) - D_w(T_L)) / (D_m(T_L) - D_w(T_L)) \quad (=a/d \text{ en la figura 24})$$

5
y

$$f(T_H) = (D_f(T_H) - D_w(T_H)) / (D_m(T_H) - D_w(T_H)) \quad (=c/e \text{ en la figura 24}).$$

10 En el caso extremo de que la mezcla sea de tipo natural puro, de modo que $D_f = D_w$, los presentes inventores encontraron que $f(T_L) = 0$ y $f(T_H) = 0$, y también $w_L = 0$ y $w_H = 1$, de modo que $F_m = 0$. En el caso extremo de que la mezcla sea mutante puro, de modo que $D_f = D_m$, los presentes inventores encontraron que $f(T_L) = 1$ y $f(T_H) = 1$, y también $w_L = 0$ y $w_H = 1$, de modo que $F_m = w_L + w_H = 1$.

15 En conjunto, en cuanto a las cantidades en la figura 24,

$$F_m = a / (a+b) (a/d) + b / (a+b) (c/e) = (aae + bcd) / (de(a+b))$$

tal como se comentó anteriormente en el ejemplo 6.

20 La elección de ponderación se puede utilizar para proporcionar alguna cancelación de efectos no lineales debido a reapareamiento de sondas a partir de moldes con emparejamiento erróneo a moldes con emparejamiento y durante la fusión. Aunque esto y otros ejemplos ilustrativos se presentan utilizando dos alelos, se entiende que son sencillas las generalizaciones de estas fórmulas a mezclas de más de dos alelos.

25 Una implementación alternativa es utilizar sólo los valores asociados con el pico superior, es decir, a/d o c/e . En tal realización, se entiende que a y c están directamente relacionados y, por tanto, sólo se utiliza uno de estos valores. Otra alternativa es incluir una muestra heterocigota natural (HET) en el protocolo experimental y utilizar condiciones de amplificación diseñadas para dar como resultado picos del producto que sean esencialmente iguales según los procedimientos de cuantificación anteriores, interpolar los picos de la muestra y los de WT y MUT para interpolar inversamente la magnitud relativa de la muestra entre 0,5 y 1 tal como se hizo anteriormente entre 0 y 1. Por ejemplo:

$$f(T_L) = 0,5 + 0,5(D_f(T_L) - D_h(T_L)) / (D_m(T_L) - D_h(T_L))$$

35 $f(T_H) = 0,5 + 0,5(D_f(T_L) - D_h(T_L)) / (D_w(T_L) - D_h(T_L))$

40 y estimar la fracción de alelo mutante utilizando el pico de HET y MUT a T_L y la fracción de alelo mutante utilizando los picos de HET y WT a T_H , respectivamente. Como una comprobación, si $D_f = D_h$, ambas fracciones de alelo son 0,5, si $D_f = D_w$, la fracción de alelo mutante es 0,0, y si $D_f = D_m$, la fracción de alelo mutante es 1,0. A modo ilustrativo, estos valores se pueden ponderar entonces exactamente igual que antes.

45 Opcionalmente, estos valores pueden ponderarse según la fórmula anterior, o puede darse ponderación completa al valor correspondiente al pico superior.

Las cantidades a, b, c, d, e pueden determinarse de maneras alternativas. En lugar de encontrar simplemente la temperatura y valor correspondiente del valor máximo puntual, los picos se pueden ajustar utilizando ajuste cuadrático y obtener la temperatura y el valor del punto más alto del ajuste cuadrático del pico más alto, y el valor de los ajustes de las otras curvas a las mismas temperaturas.

50 Además, la altura del pico se puede reemplazar por el área entre las curvas correspondientes a lo largo de un intervalo de temperatura que contiene los picos (utilizando a modo ilustrativo cualquier procedimiento anterior para ubicar los picos) cuyo ancho se determina a modo ilustrativo por donde el pico más alto se ha reducido a $1/e$ (el factor de decaimiento exponencial natural) multiplicado por su valor máximo.

55 Como el procedimiento de cuantificación TMBSP en la solicitud de patente U.S.A. n.º 2003-0104438, los procedimientos descritos a continuación se basan en la termodinámica. Sin embargo, los procedimientos ilustrativos presentados en el presente documento no son iterativos. Más bien, los procedimientos presentados en el presente documento son rápidos y fáciles de implementar, al tiempo que se conserva un alto grado de precisión. También se incluye un procedimiento basado en el mejor ajuste de mínimos cuadrados no lineal de Levenberg-Marquardt simple de $D(T)$ mediante una combinación convexa de curvas derivadas de van 'tHoff cuyos parámetros termodinámicos ΔH y ΔS asociados con cada una de las dos especies de dúplex (sonda con WT y sonda con MUT) se consideran como variables además de las fracciones de alelo. Se pueden establecer también los valores de las secuencias conocidas y los parámetros vecinos más próximos (incluyendo parámetros dedicados derivados utilizando fusión de alta resolución en condiciones de laboratorio convencionales) en cuyo caso el ajuste se reduce a un problema de

mínimos cuadrados lineal de dos parámetros.

Mínimos cuadrados no lineales basados en la termodinámica (TMBNLS): obtener el mejor ajuste de mínimos cuadrados no lineal de D(T) con respecto a seis parámetros desconocidos, c_M , ΔH_M , ΔS_M , c_W , ΔH_W , ΔS_W .

5

$$D(T) = c_M D(\Delta H_M, \Delta S_M) + c_W D(\Delta H_W, \Delta S_W).$$

En este caso, D(ΔH , ΔS) es la derivada negativa de la curva de fusión de van 'tHoff analítica determinada de manera singular mediante los dos parámetros ΔH y ΔS y las condiciones experimentales particulares. El ajuste se realiza utilizando el algoritmo de Levenberg-Marquardt.

10

Mínimos cuadrados basados en la termodinámica (TMBSL): obtener el mejor ajuste de mínimos cuadrados lineal de D(T) con respecto a dos parámetros desconocidos, c_M , c_W .

15

$$D(T) = c_M D(\Delta H_M, \Delta S_M) + c_W D(\Delta H_W, \Delta S_W)$$

En este caso, D(ΔH , ΔS) es la derivada negativa de la curva de fusión de van 'tHoff analítica determinada de manera singular mediante los dos parámetros ΔH y ΔS y las condiciones experimentales particulares. Los parámetros ΔH_M , ΔS_M , ΔH_W , ΔS_W se especifican utilizando suma del vecino más próximo, con parámetros de tétrada conocidos obtenidos utilizando fusión de alta resolución en condiciones de laboratorio convencionales. El ajuste se realiza utilizando las ecuaciones normales para el sistema de matriz de 2x2.

20

LISTADO DE SECUENCIAS

25

<110> McKinney, Jason T
Zhou, Luming
Gundry, Cameron N
Palais, Robert A

30

<120> Sesgo de amplificación de alelos

<130> Documento P01758-WO-00

35

<150> 61/112.495
<151> 07-11-2008

<150> 61/117.371
<151> 24-11-2008

40

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

45

<210> 1
<211> 24
<212> ADN
<213> *Plasmodium falciparum*

50

<400> 1
ttctgtctt ggtaaatgtg ctca 24

<210> 2
<211> 28
<212> ADN
<213> *Plasmodium falciparum*

55

<400> 2
cggatgttac aaaactatag ttaccaat 28

60

<210> 3
<211> 28
<212> ADN
<213> *Plasmodium falciparum*

65

<220>

<221> mutación
 <222> (6)..(6)
 <223> sitio de SNP

5 <220>
 <221> mutación
 <222> (14)..(14)
 <223> sitio de SNP

10 <220>
 <221> mutación
 <222> (15)..(15)
 <223> sitio de SNP

15 <220>
 <221> mutación
 <222> (17)..(17)
 <223> sitio de SNP

20 <220>
 <221> mutación
 <222> (19)..(19)
 <223> sitio de SNP

25 <400> 3
 gtgtatgtgt aatgaataaa attttgc 28

30 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 4
 ctactgggac ggaacagctt 20

40 <210> 5
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 5
 gtgaggctcc cctttctg 19

50 <210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

55 <220>
 <221> mutación
 <222> (9)..(9)
 <223> sitio de SNP

60 <400> 6
 tgagggtcgt gtttgcct gtc 23

65 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

70 <400> 7
 aagacagcca tccaaaatta cac 23

75 <210> 8
 <211> 23

ES 2 716 807 T3

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 8
 tttgtcacca cctcacctta ctt 23

<210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> mutación
 <222> (15)..(15)
 15 <223> sitio de SNP

<400> 9
 gagttccagc ccctgtatta cgtg 24

20 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 10
 agctcagaac tgccctggtg 20

30 <210> 11
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Los elementos de sonda y cebador son ambos de *Homo sapiens*, pero se combinan para producir una nueva secuencia, con un emparejamiento erróneo en 5'.

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> emparejamiento erróneo en 5'

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(23)
 <223> elemento de sonda

50 <220>
 <221> mutación
 <222> (13)..(13)
 <223> sitio de SNP

<400> 11
 acgttcttgg cagaactggc tggctctggt gctgtccaca cctgaa 46

55 <210> 12
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

60 <400> 12
 tgtttcctt tacttactac acctcag 27

65 <210> 13
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 716 807 T3

<220>
<223> Los elementos de sonda y cebador son ambos de *Homo sapiens*, pero se combinan para producir una nueva secuencia, con un emparejamiento erróneo en 5'.

5
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> emparejamiento erróneo en 5'

10
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(26)
<223> Elemento de sonda

15
<220>
<221> mutación
<222> (14)..(14)
<223> sitio de SNP

20
<400> 13
aatctagcta cagtgaaatc tcgatgtcag tggaaaaata gcctcaattc 50

25
<210> 14
<211> 24
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

30
<400> 14
tcagtggaaa aatagcctca attc 24

35
<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

40
<400> 15
tggatcccag aaggtgagaa 20

45
<210> 16
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<223> Los elementos de sonda y cebador son ambos de *Homo sapiens*, pero se combinan para producir una nueva secuencia, con un emparejamiento erróneo en 5'.

50
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> emparejamiento erróneo en 5'

55
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(24)
<223> elemento de sonda

60
<400> 16
ccagagaagc aacatctccg aaagagcaga aactcacatc gagga 45

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la amplificación y detección de alelos de una muestra biológica, en el que la muestra biológica comprende un primer alelo y un segundo alelo de un ácido nucleico diana, estando presente el primer alelo en una mayor concentración que el segundo alelo, que comprende las etapas de
 5 añadir una polimerasa termoestable, una sonda y un par de cebadores configurados para la amplificación del ácido nucleico diana en la muestra biológica, en el que la sonda está configurada para hibridarse con el ácido nucleico diana sin extenderse mediante la utilización de un bloqueante o emparejamiento erróneo y en el que la sonda tiene una primera T_m cuando se hibrida con el primer alelo y una segunda T_m cuando se hibrida con el segundo alelo, en el que la primera T_m es mayor que la segunda T_m ,
 10 amplificar el ácido nucleico diana en la muestra biológica en presencia de la sonda mediante ciclado térmico entre una temperatura de apareamiento y una temperatura de desnaturalización, en el que la temperatura de apareamiento está por debajo de la primera T_m y por encima de la segunda T_m de modo que la sonda se hibrida con el primer alelo a la temperatura de apareamiento e inhibe la amplificación del primer alelo y el segundo alelo se amplifica preferentemente, y
 15 detectar el segundo alelo amplificado.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la temperatura de apareamiento está aproximadamente a mitad de camino entre la segunda T_m y la primera T_m .
3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la temperatura de apareamiento está, como mínimo, $1,0^\circ\text{C}$ por encima de la segunda T_m .
4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el segundo alelo amplificado se detecta generando una curva de fusión y detectando el primer alelo utilizando la curva de fusión.
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, que comprende, además, calcular fracciones de alelo del primer alelo y el segundo alelo.
6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que la etapa de cálculo comprende estimar la fracción del segundo alelo como $F_m = w_L f(T_L) + w_H f(T_H)$, en la que w_L y w_H son ponderaciones y $f(T_L)$ y $f(T_H)$ son estimaciones individuales a cada pico de temperatura calculadas a partir de patrones para homocigotos de cada uno del primer alelo y segundo alelo y una mezcla 50:50 del primer alelo y segundo alelo.
7. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la sonda es un cebador Snapback que tiene un elemento de sonda unido a un extremo 5' de uno del par de cebadores, y un emparejamiento erróneo evita la extensión cuando el elemento de sonda se hibrida con el ácido nucleico diana.
8. Procedimiento para la amplificación y detección de alelos de una muestra biológica según la reivindicación 1, en el que la sonda es un elemento de sonda unido a un extremo 5' de un primer cebador de un primer par y en el que el primer cebador comprende el elemento de sonda específico para un locus del ácido nucleico diana y una zona de cebador específico de molde, en el que el elemento de sonda está en 5' de la zona de cebador específico de molde,
 40 en el que el elemento de sonda está configurado para hibridarse con el ácido nucleico diana y el elemento de sonda tiene una primera T_m cuando se hibrida con el primer alelo y una segunda T_m cuando se hibrida con el segundo alelo, en el que la primera T_m es mayor que la segunda T_m y el procedimiento comprende
 45 amplificar el ácido nucleico diana en la muestra biológica en presencia del elemento de sonda mediante ciclado térmico entre una temperatura de apareamiento y una temperatura de desnaturalización, en el que la temperatura de apareamiento está por debajo de la primera T_m y por encima de la segunda T_m de modo que el elemento de sonda se hibrida con el primer alelo de manera más estable que el segundo alelo e inhibe la amplificación del primer alelo y el segundo alelo se amplifica preferentemente, y detectar el primer alelo y el segundo alelo.
9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que la etapa de amplificación comprende, además, ciclado a través de una temperatura de extensión, siendo la temperatura de extensión mayor que la temperatura de apareamiento y por debajo de la primera T_m .
10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que la etapa de amplificación incluye una pausa a la temperatura de apareamiento que es menor de 5 segundos, preferentemente en el que la pausa es de 1 segundo o en el que existe una pausa de 0 segundos a la temperatura de extensión.
11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que la etapa de adición incluye añadir Mg^{++} hasta una concentración de menos de $2,0 \text{ mM}$, preferentemente en el que la concentración de Mg^{++} es de aproximadamente $1,5 \text{ mM}$.
12. Procedimiento, según la reivindicación 8, que comprende, además, calcular fracciones de alelo del primer alelo y

el segundo alelo.

5 13. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que la etapa de cálculo comprende estimar la fracción del segundo alelo como $F_m = w_L f(T_L) + w_H f(T_H)$, en la que w_L y w_H son ponderaciones y $f(T_L)$ y $f(T_H)$ son estimaciones individuales a cada pico de temperatura.

10 14. Utilización de un kit para la amplificación y detección de alelos de una muestra biológica, en el que la muestra biológica comprende un primer alelo y un segundo alelo de un ácido nucleico diana, estando presente el primer alelo en una mayor concentración que el segundo alelo, que comprende:
una polimerasa termoestable,
una sonda configurada para hibridarse con el ácido nucleico diana, en la que la sonda está configurada para hibridarse con el ácido nucleico diana sin extenderse mediante la utilización de un bloqueante o emparejamiento erróneo y en la que la sonda tiene una primera T_m cuando se hibrida con el primer alelo y una segunda T_m cuando se hibrida con el segundo alelo, en la que la primera T_m es mayor que la segunda T_m ,
15 un par de cebadores configurados para la amplificación del ácido nucleico diana en la muestra biológica,
instrucciones para amplificar el ácido nucleico diana en la muestra biológica mediante ciclado térmico entre una temperatura de apareamiento y una temperatura de desnaturalización, en la que la temperatura de apareamiento está por debajo de la primera T_m de modo que el elemento de sonda se hibrida con el primer alelo de manera más estable que el segundo alelo e inhibe la amplificación del primer alelo y el segundo alelo se amplifica preferentemente.
20

15. Utilización del kit, según la reivindicación 14, en la que la sonda es un cebador Snapback que tiene un elemento de sonda unido a un extremo 5' de uno del par de cebadores.

25 16. Utilización del kit, según la reivindicación 14, que comprende además un tampón para proporcionar una concentración de Mg^{++} de menos de 2,0 mM cuando se añade a la muestra biológica.

30 17. Utilización del kit, según la reivindicación 14, en la que el segundo alelo está presente en una fracción de alelo del 10% o menos, preferentemente en la que el segundo alelo está presente en una fracción de alelo del 5% o menos.

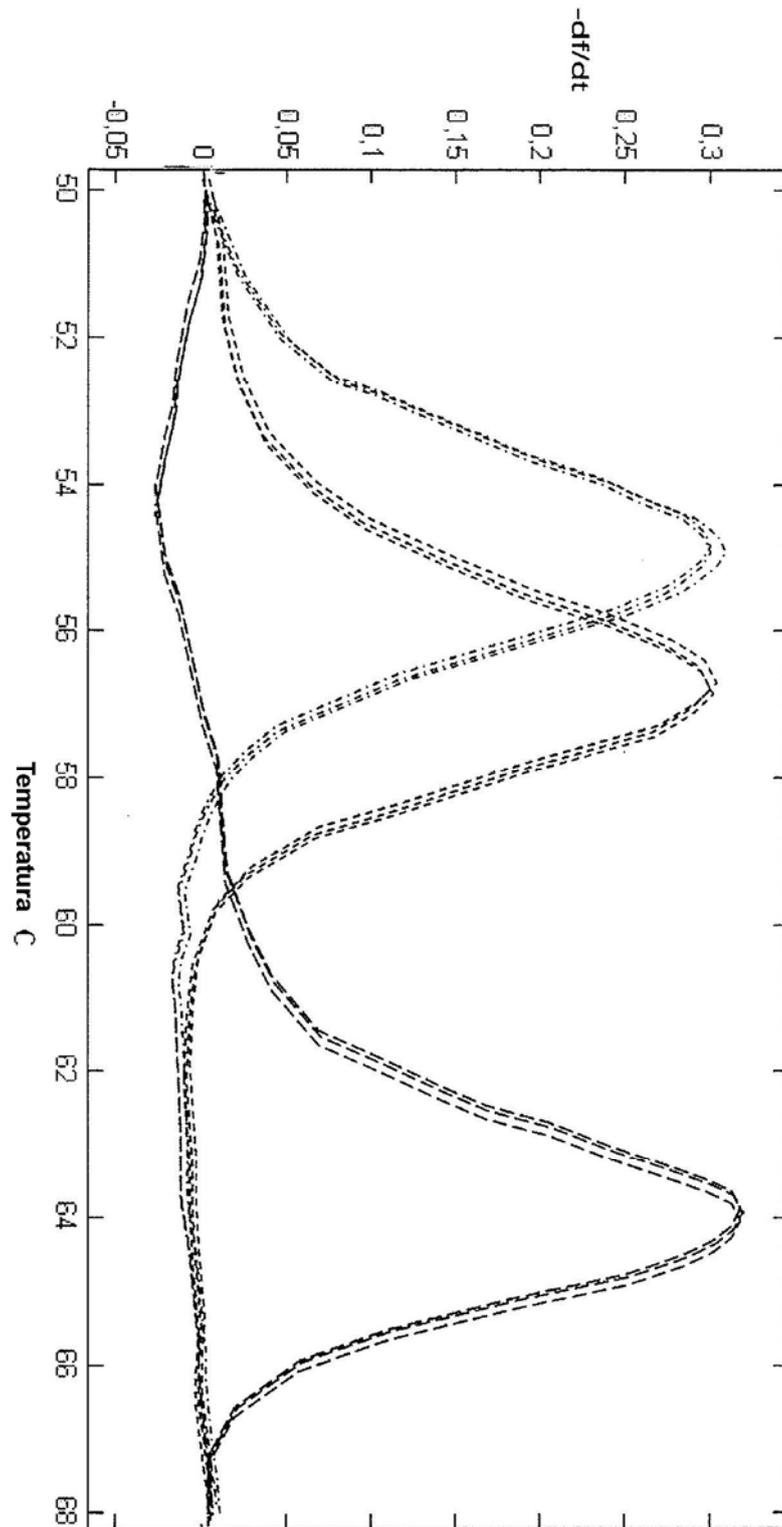


Fig. 1

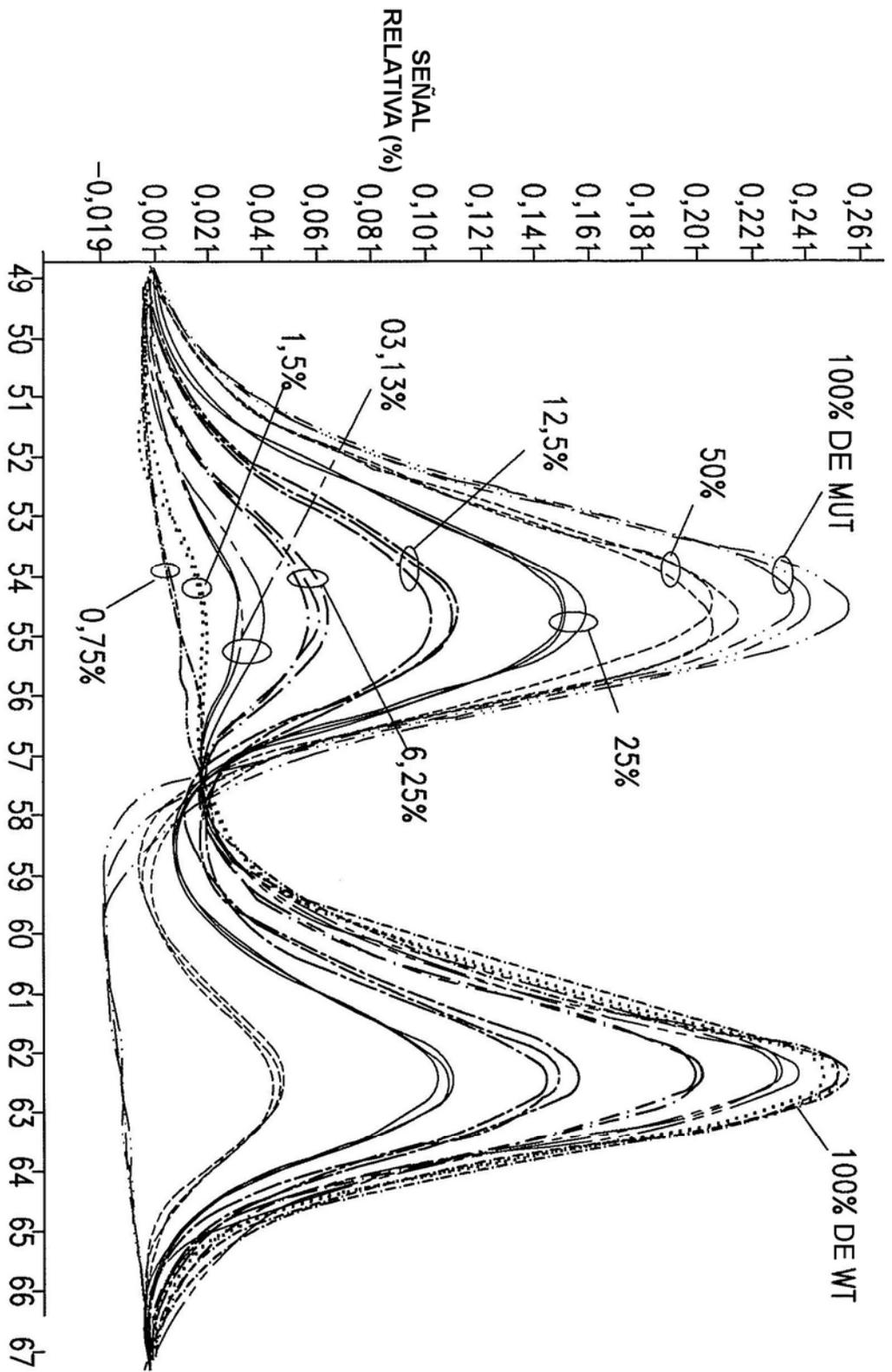


Fig. 2

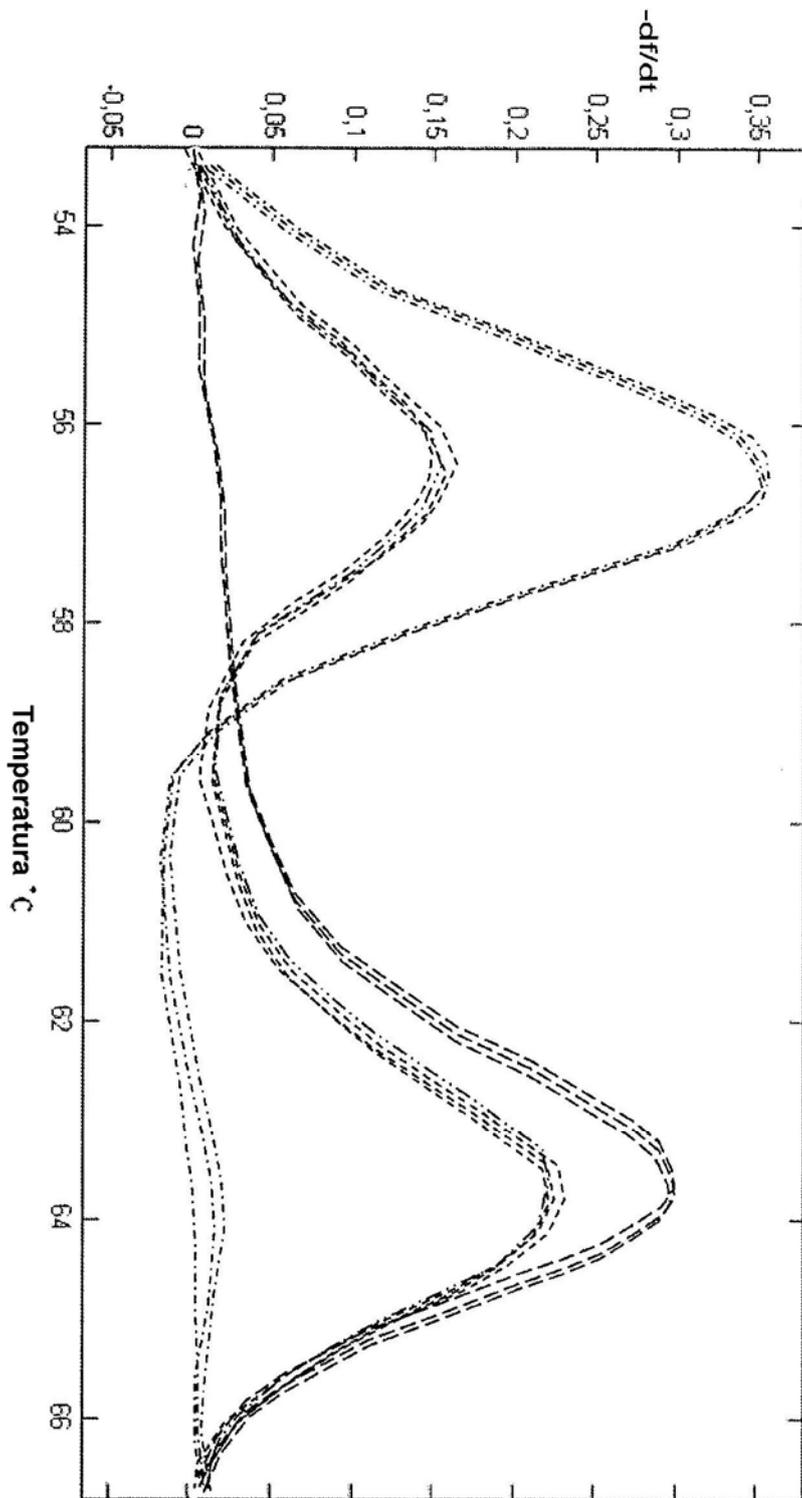


Fig. 3

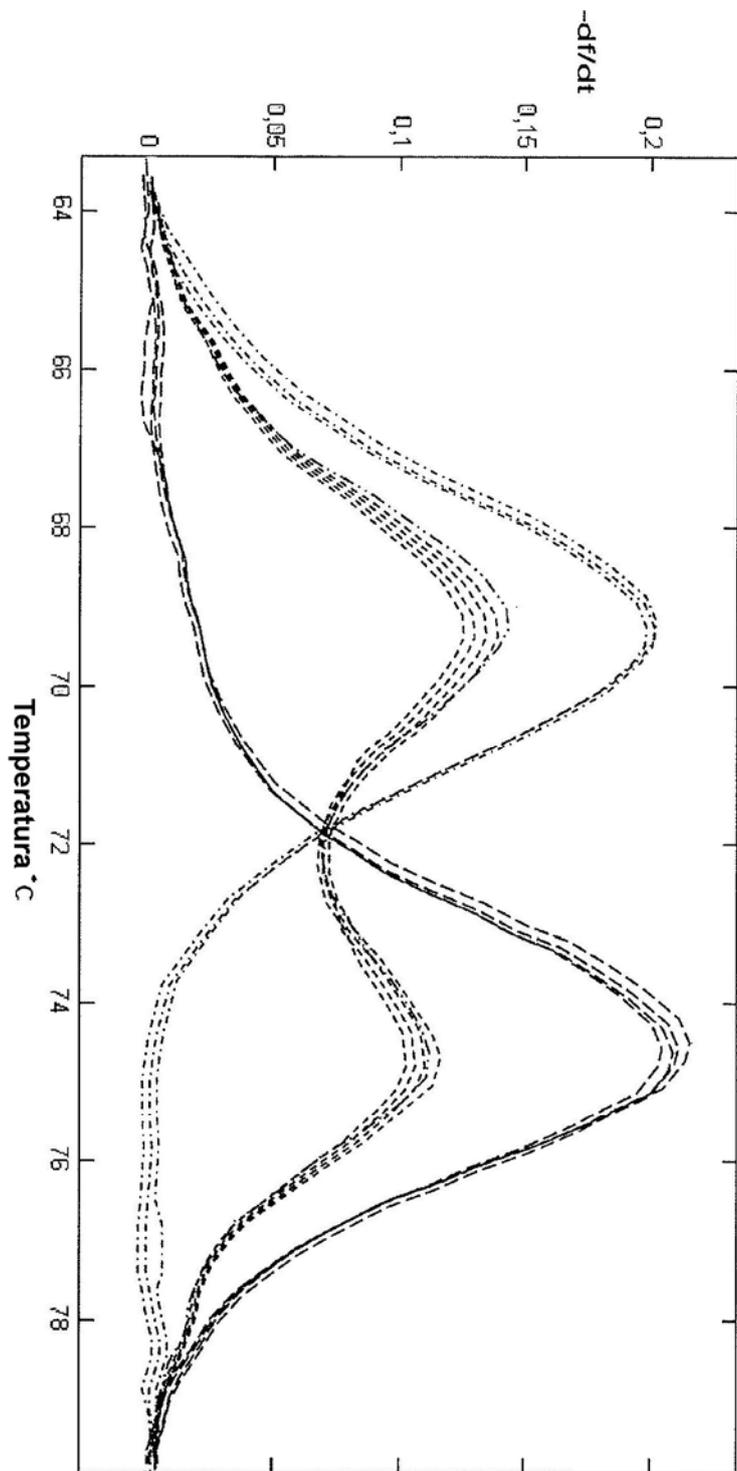


Fig. 4a

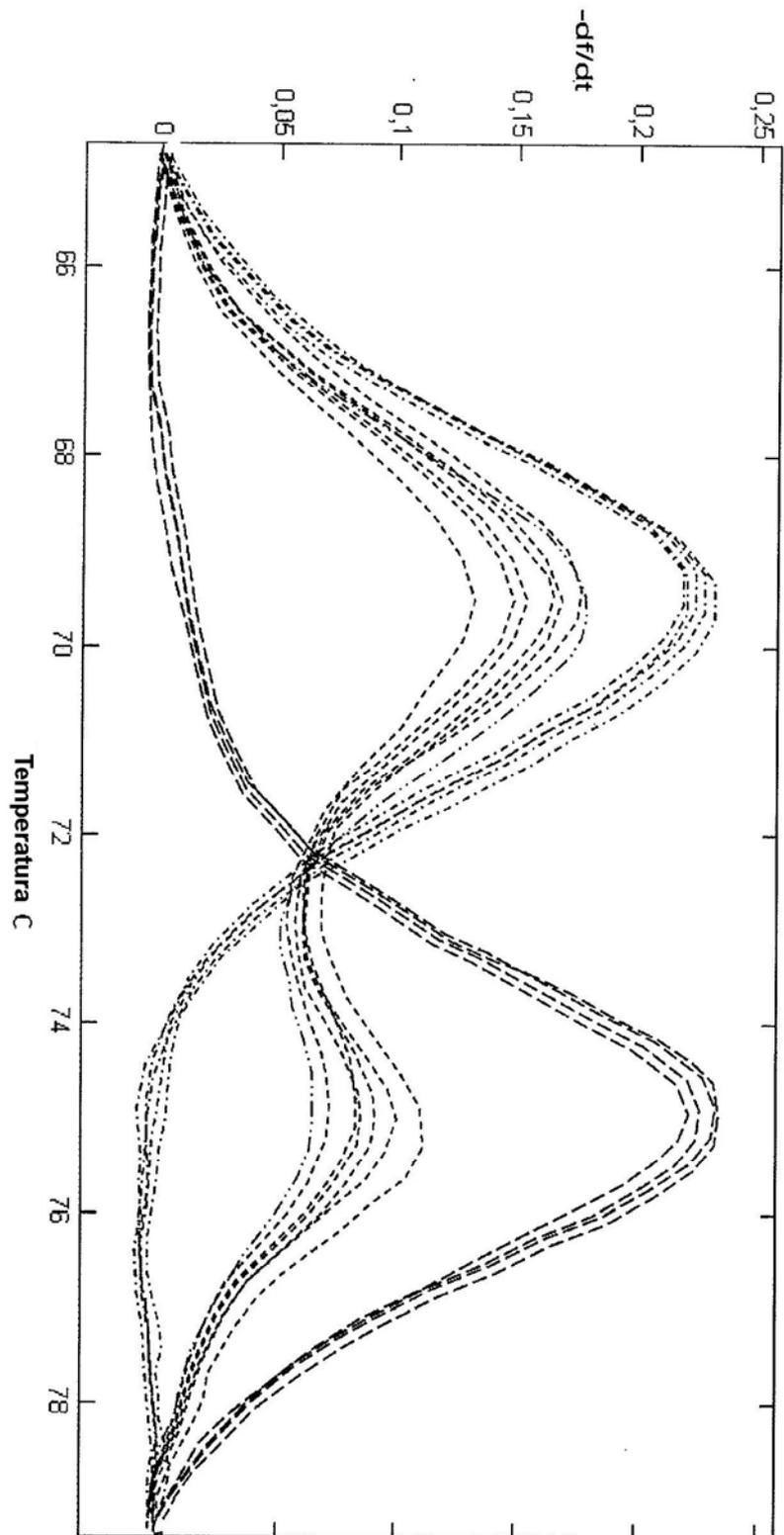


Fig. 4b

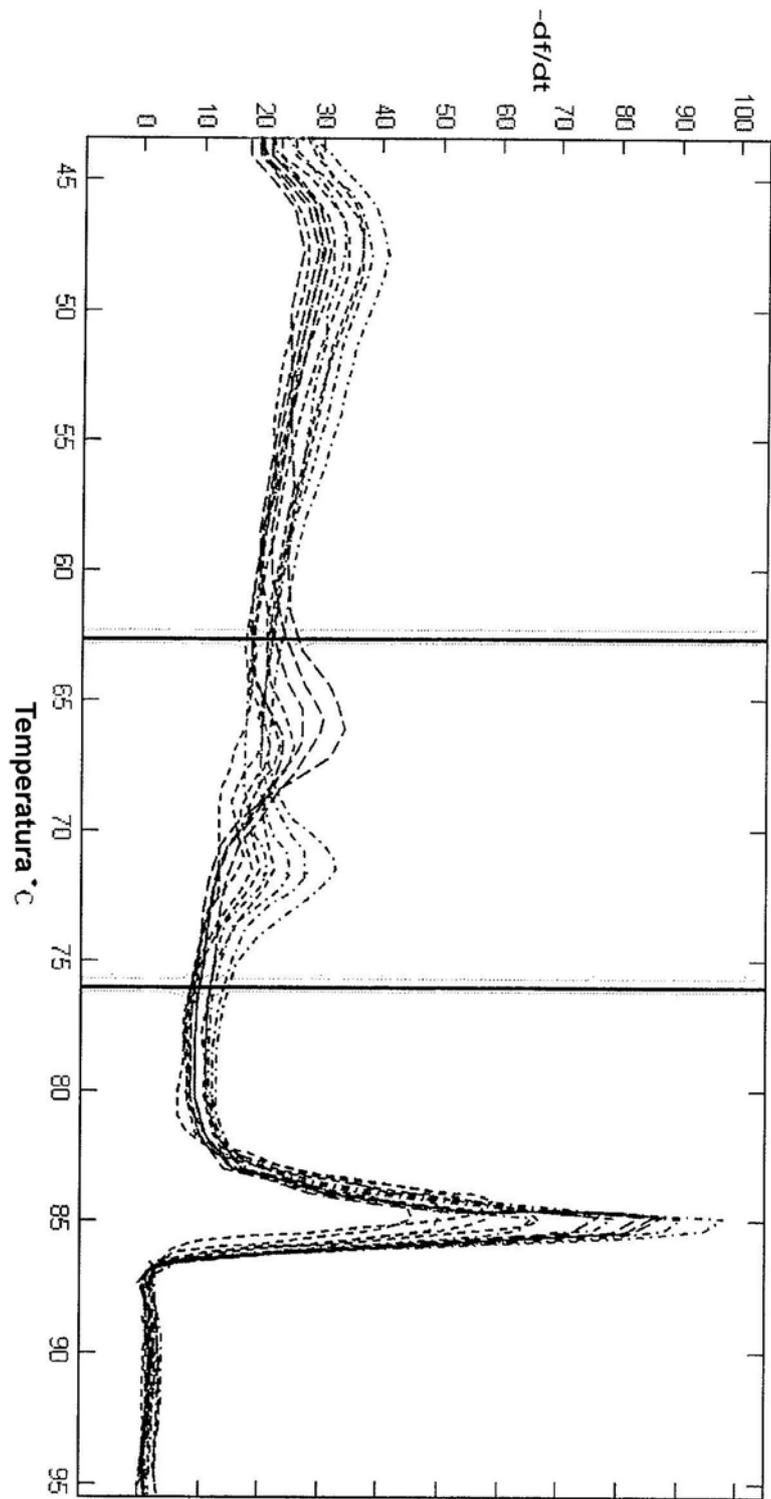


Fig. 5a

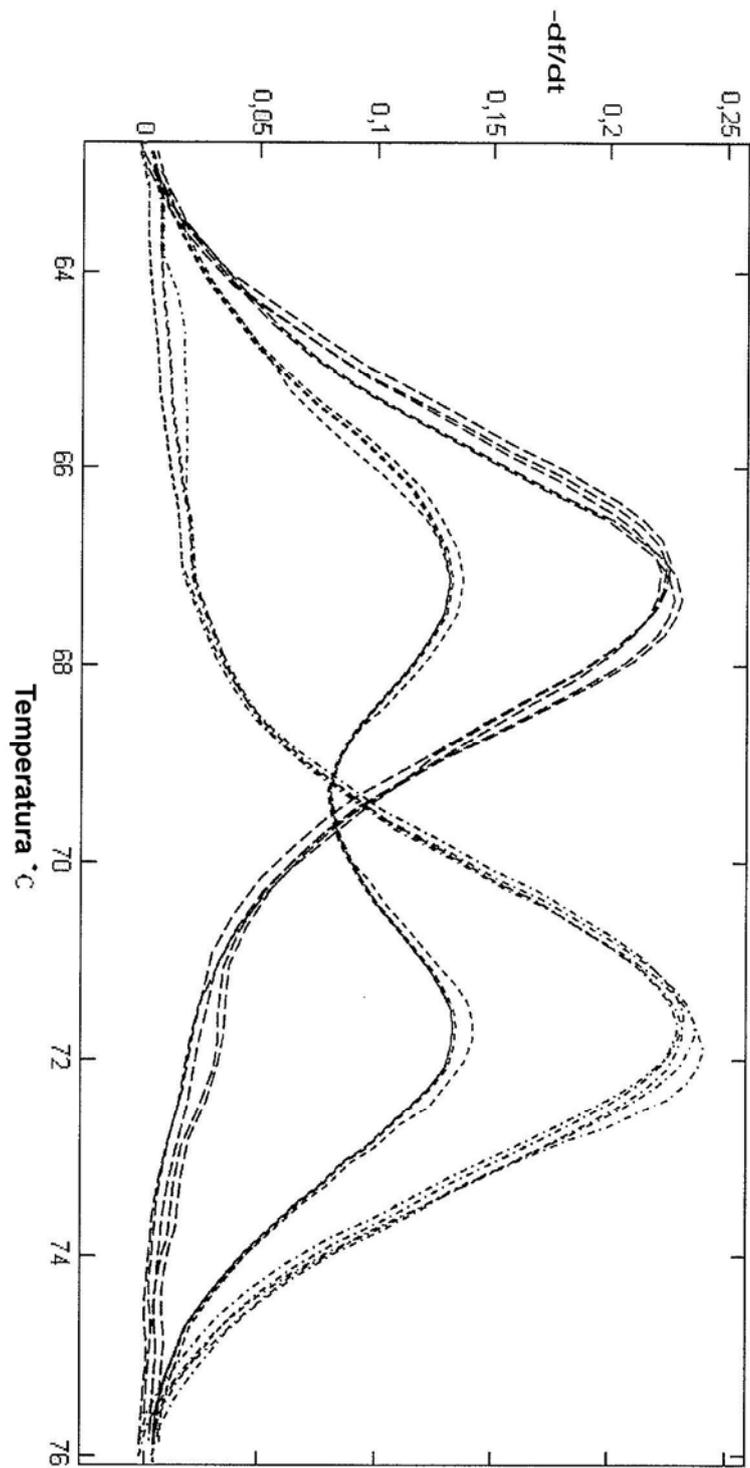


Fig. 5b

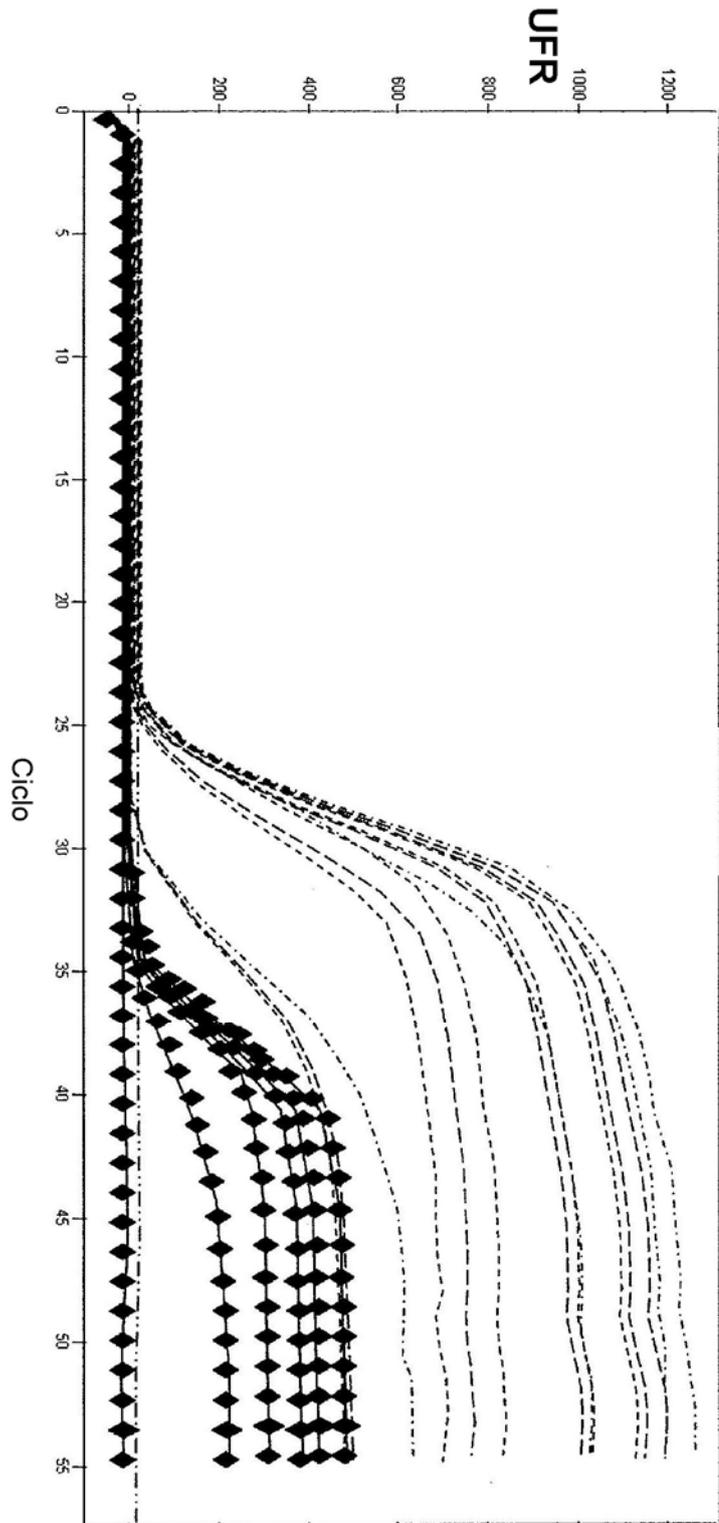


Fig. 5c

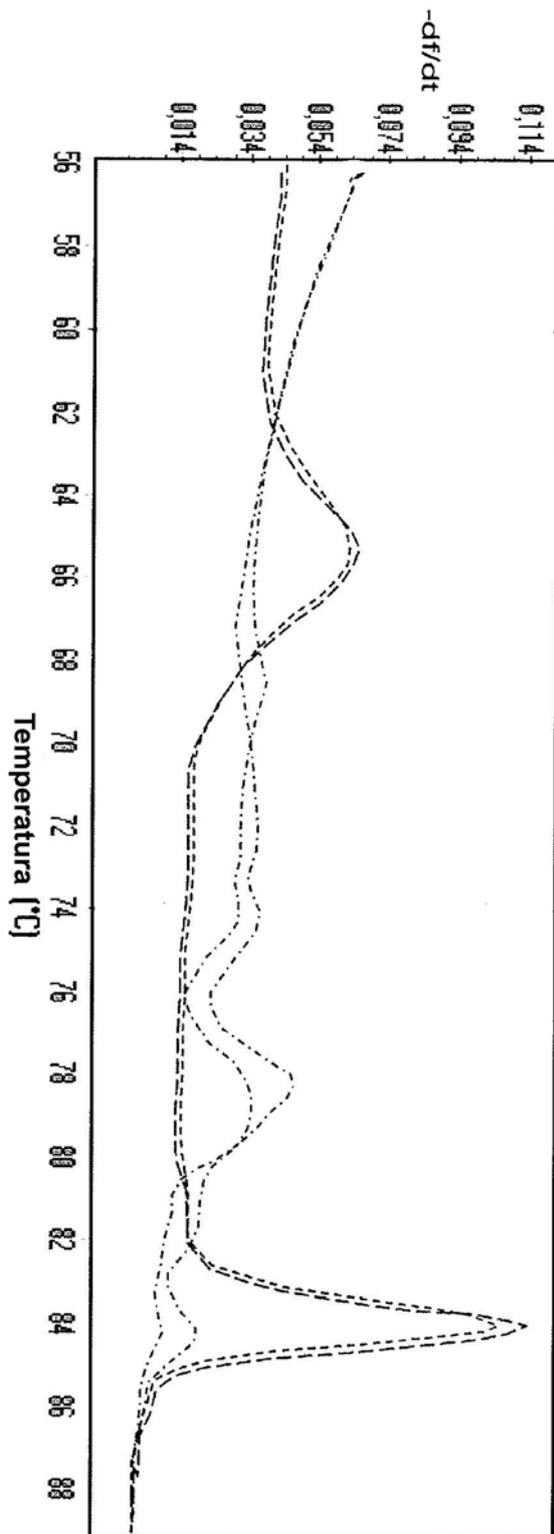


Fig. 6a

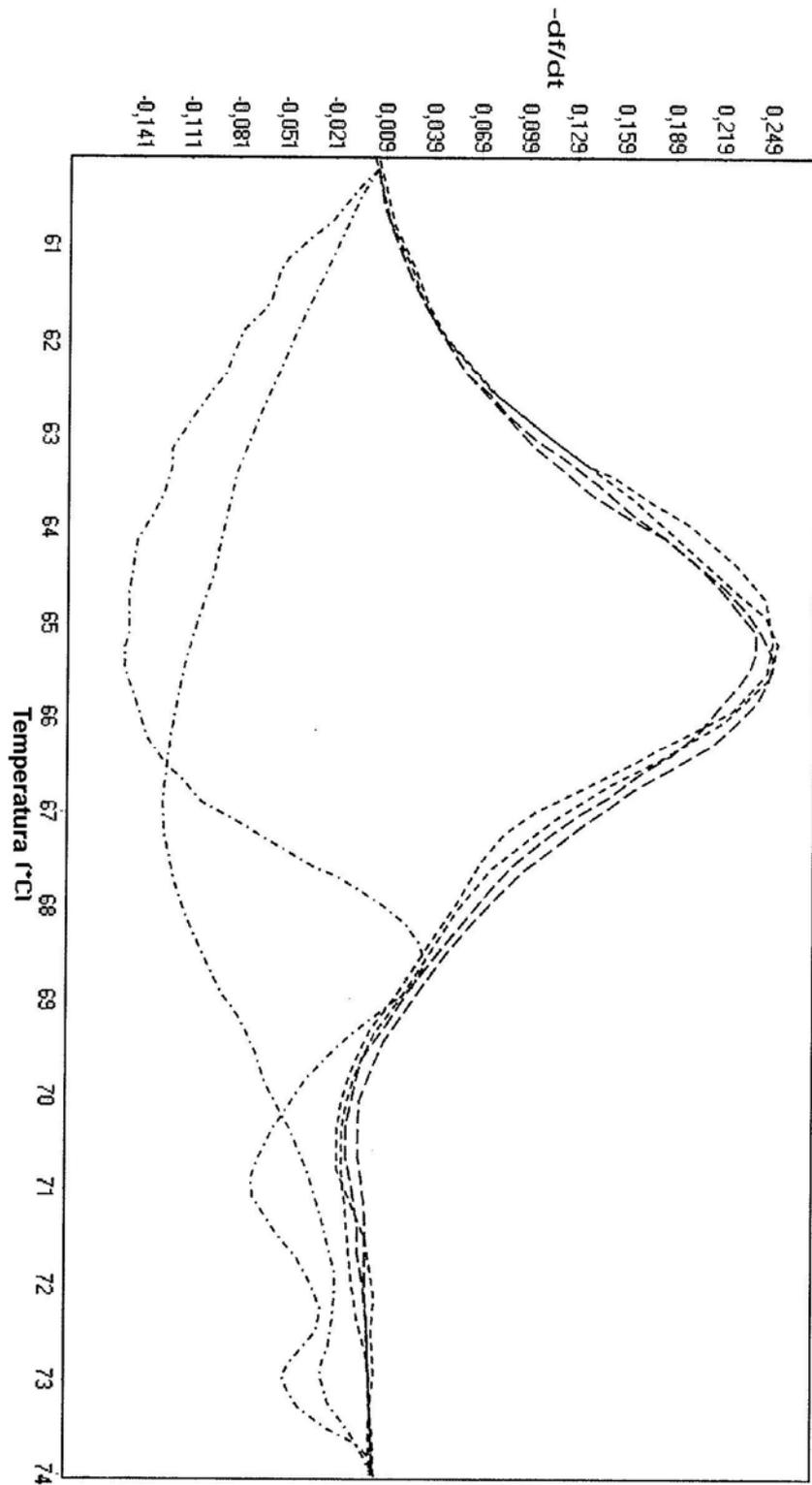


Fig. 6b

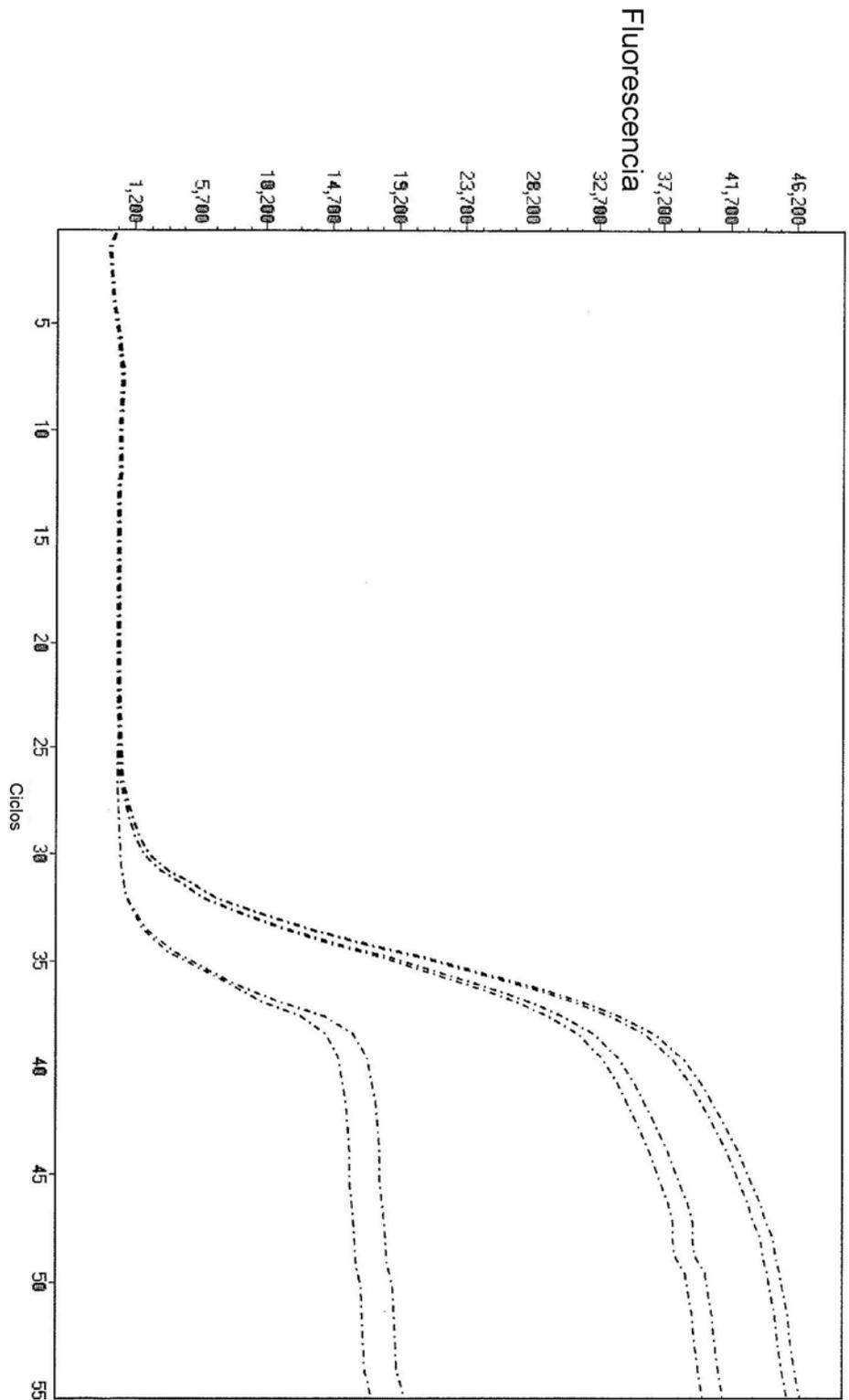


Fig. 6c

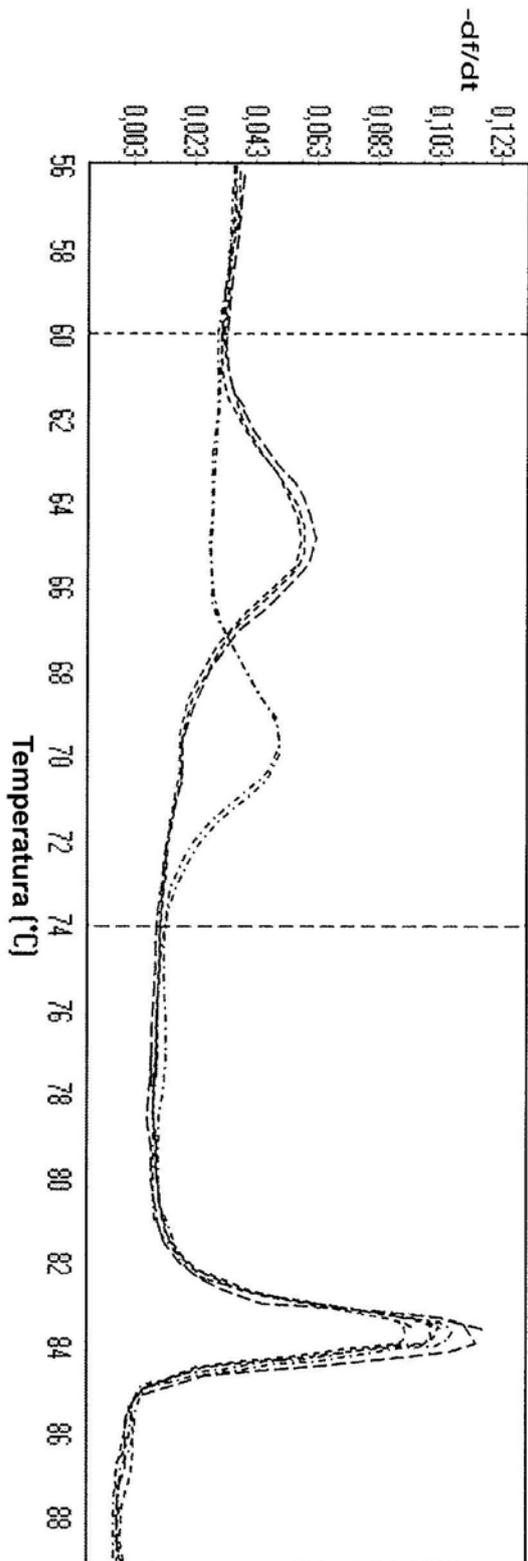


Fig. 7a

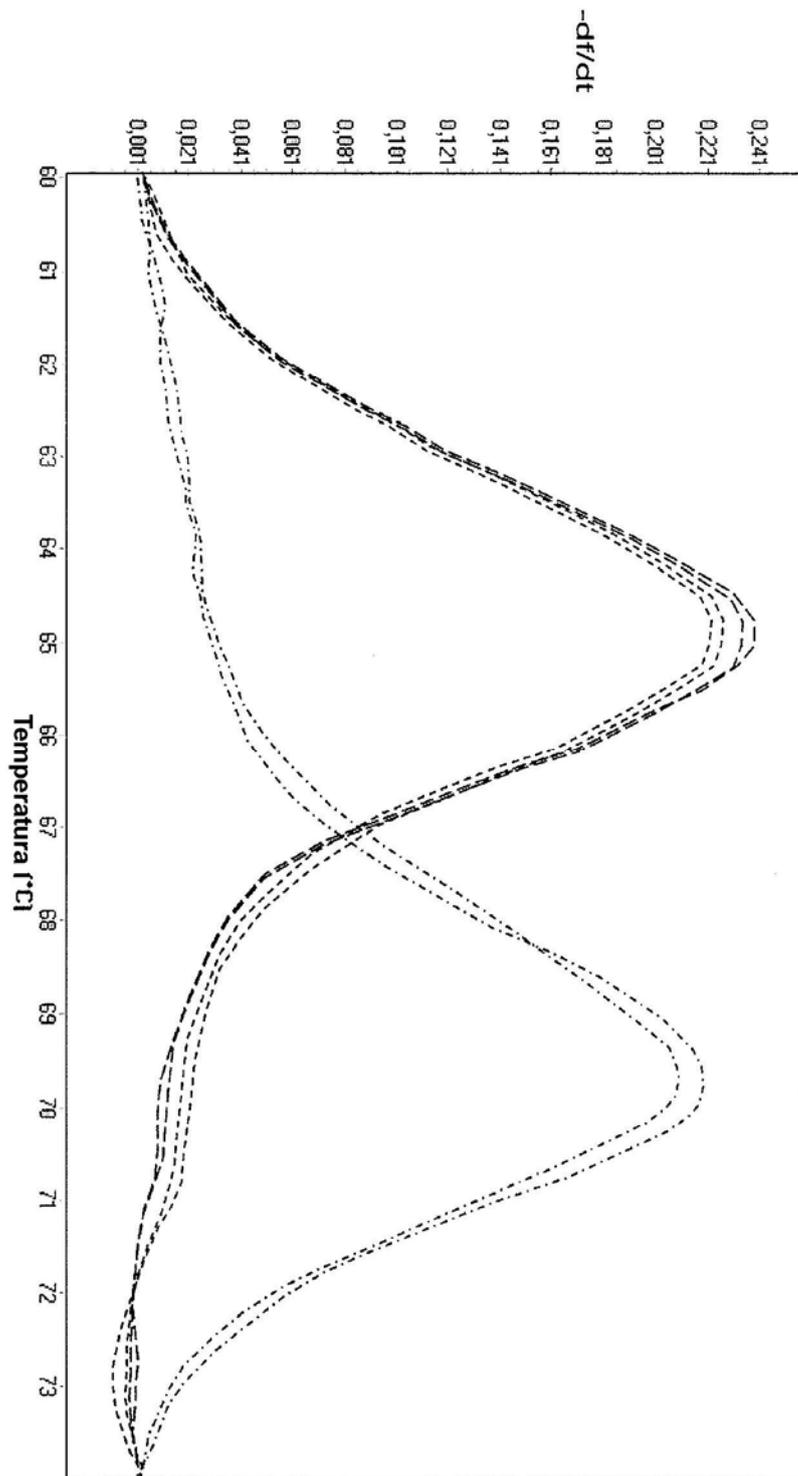


Fig. 7b

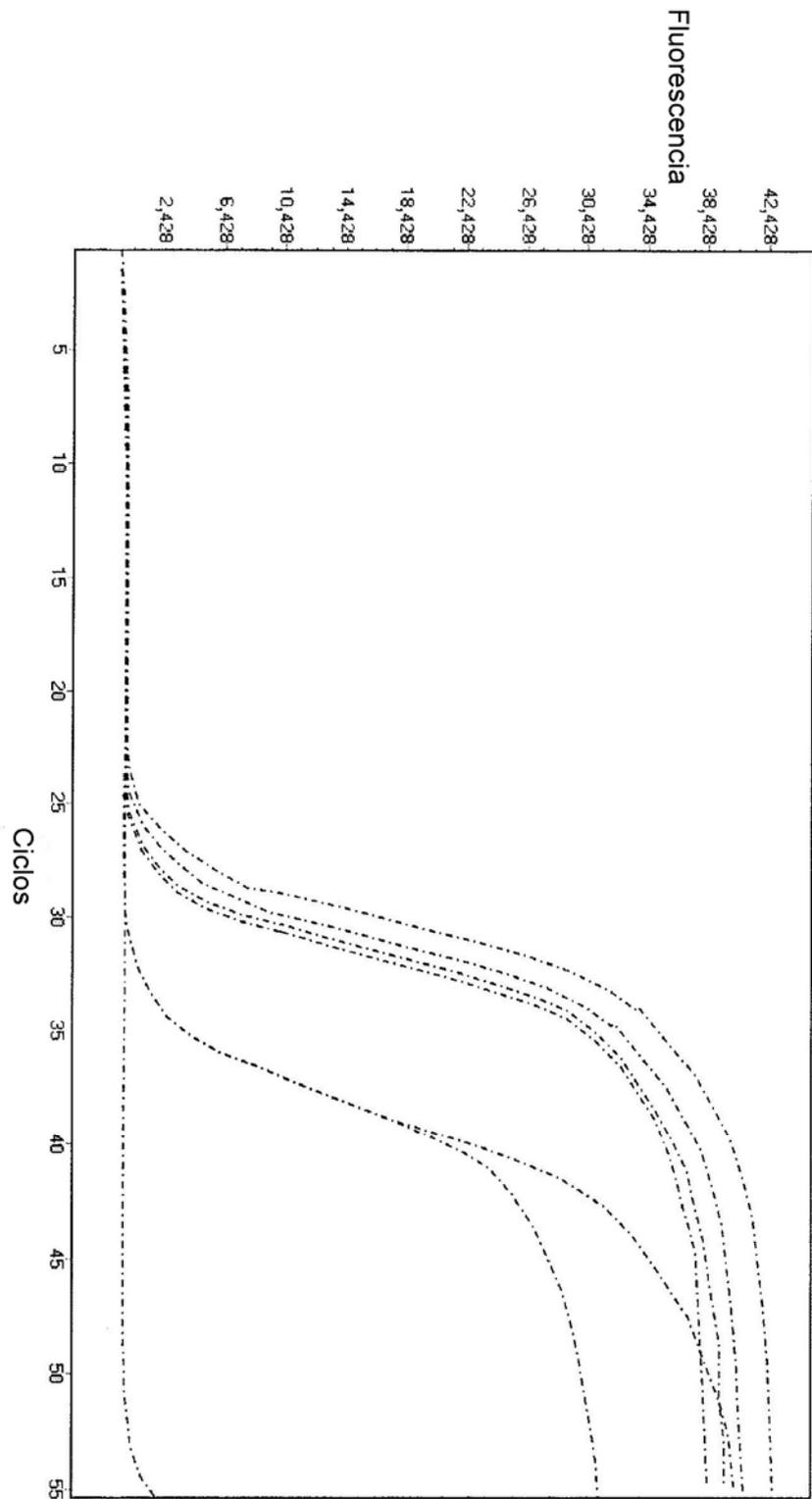


Fig. 7c

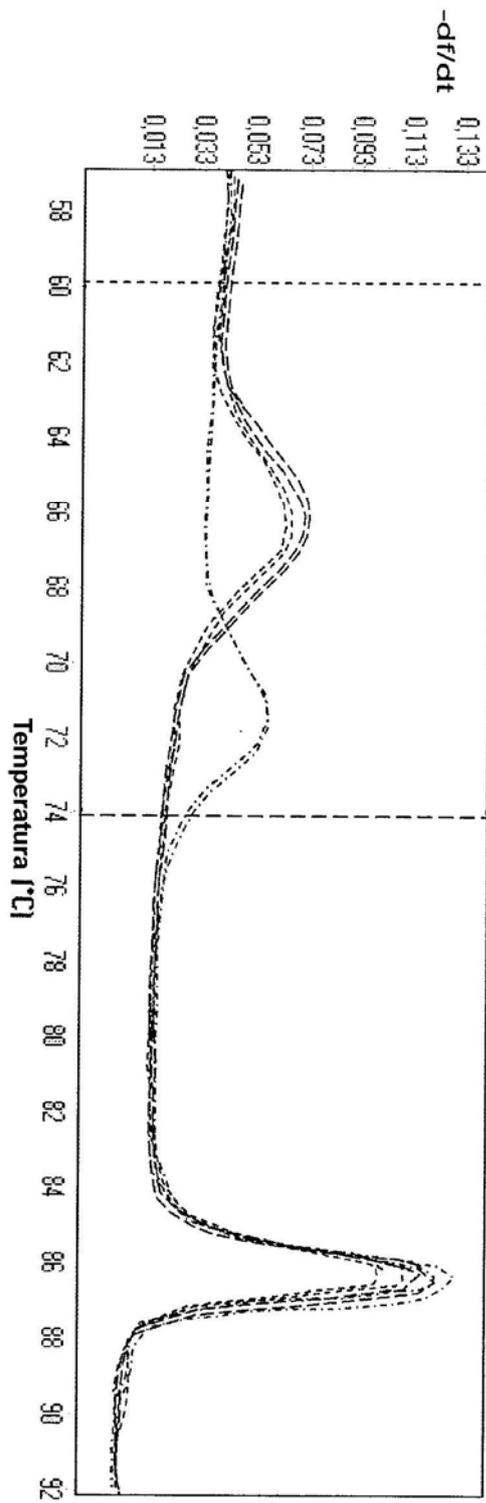


Fig. 8a

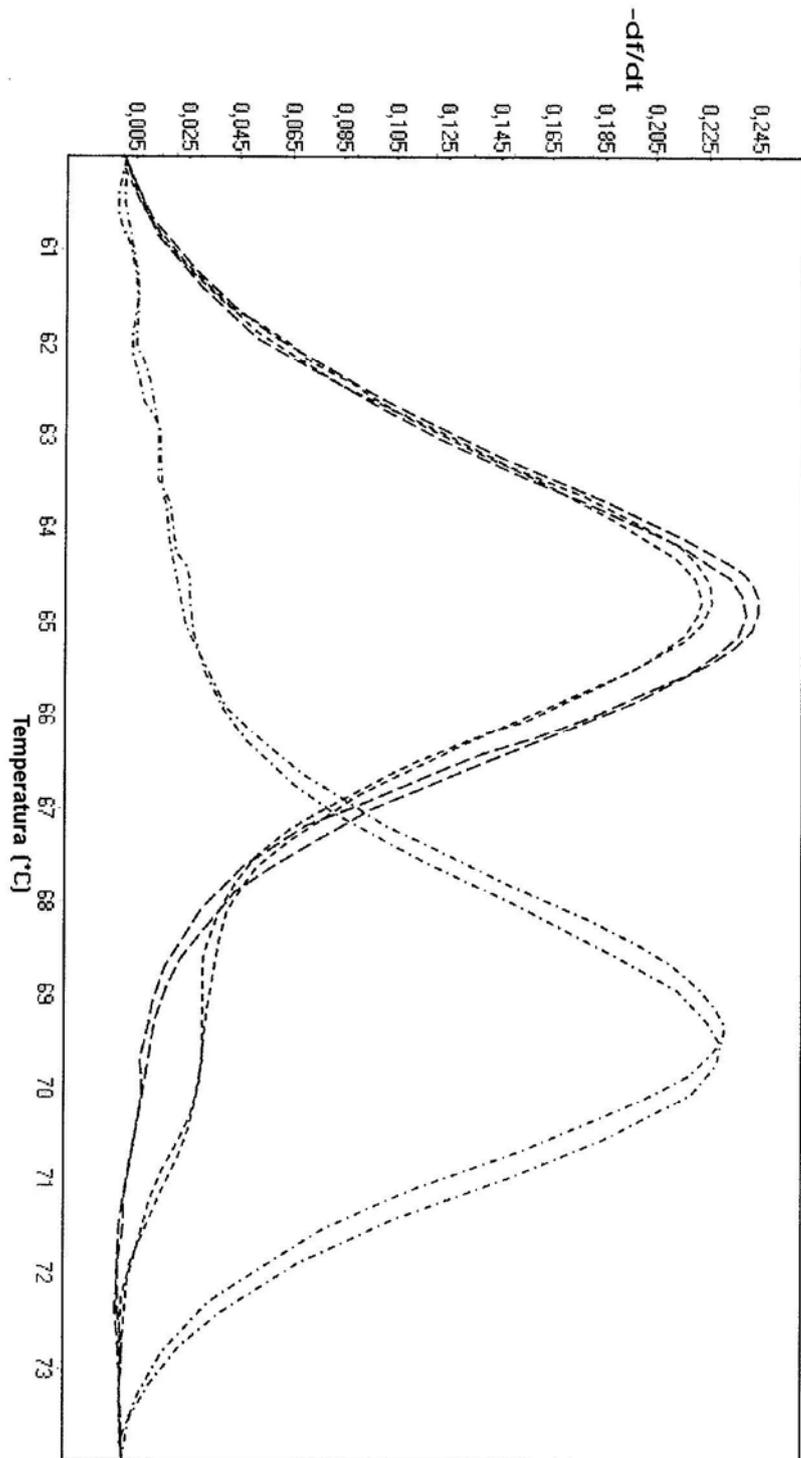


Fig. 8b

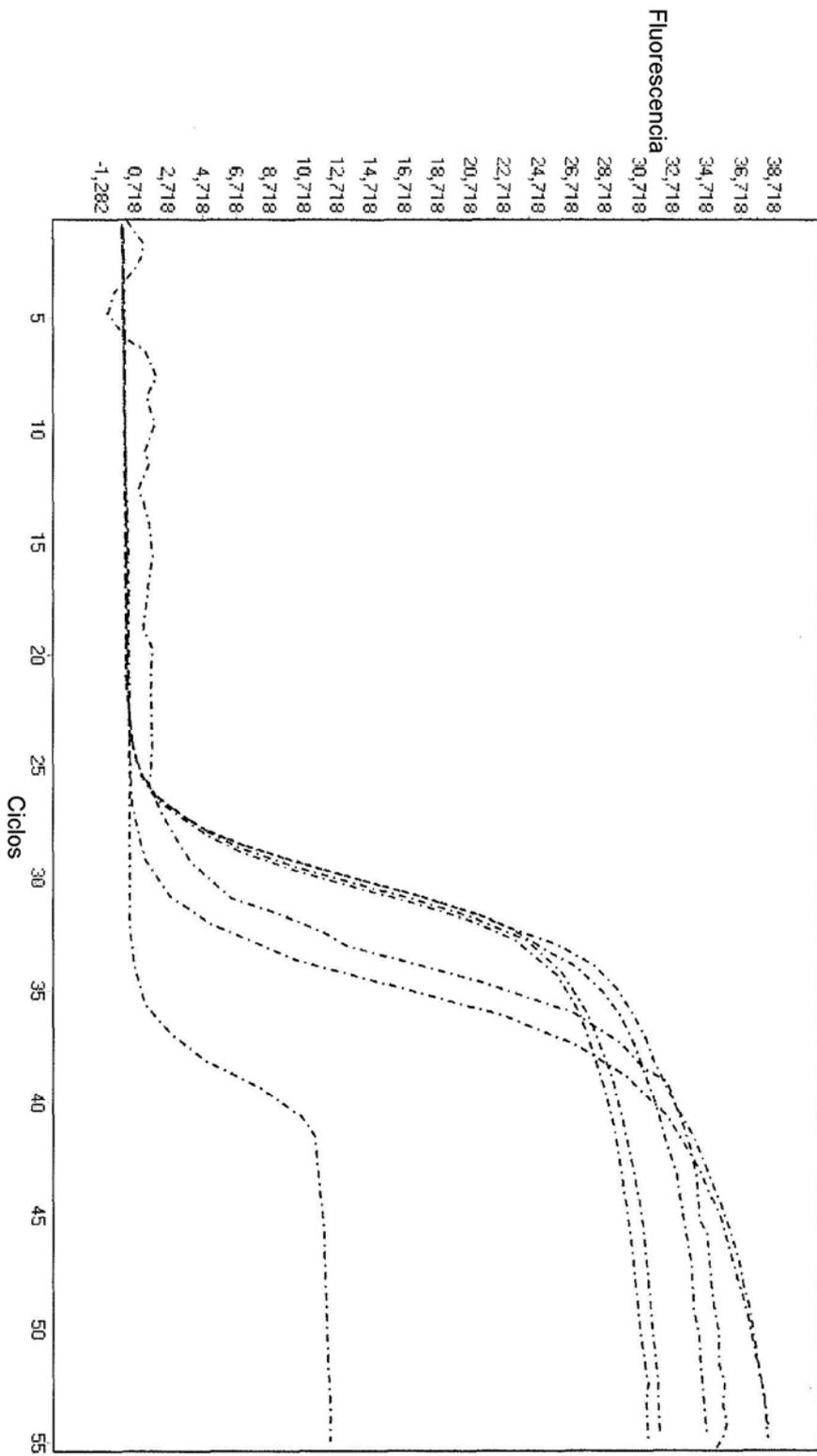


Fig. 8c

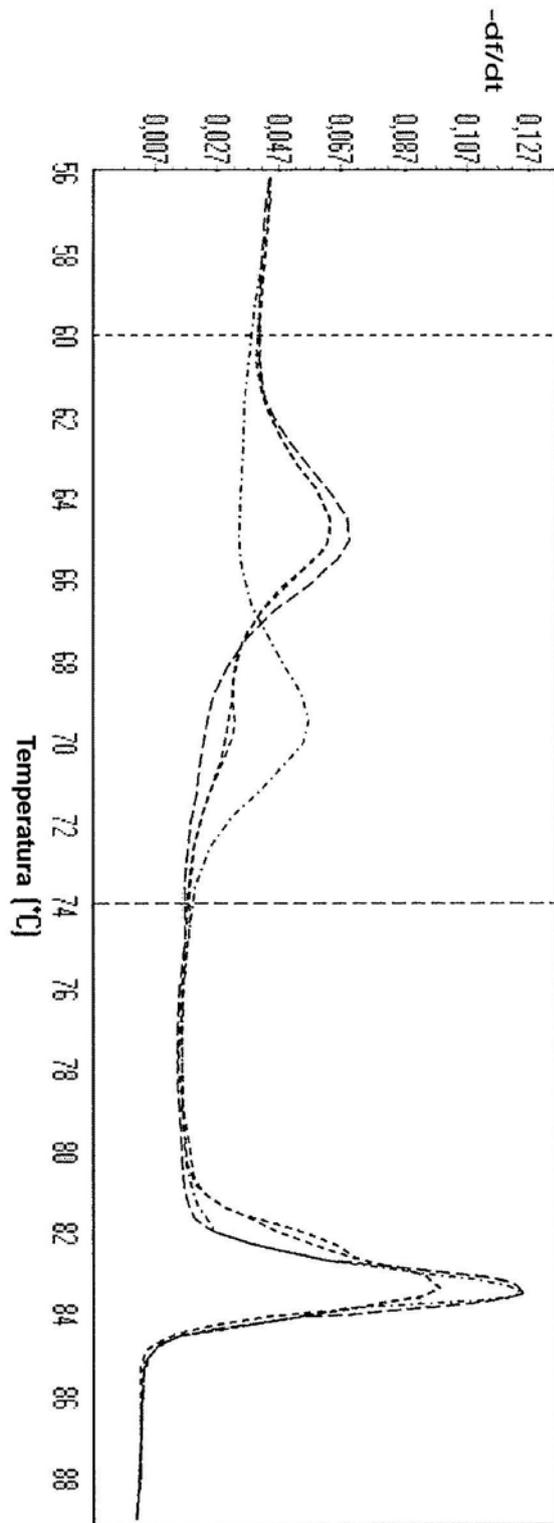


Fig. 9a

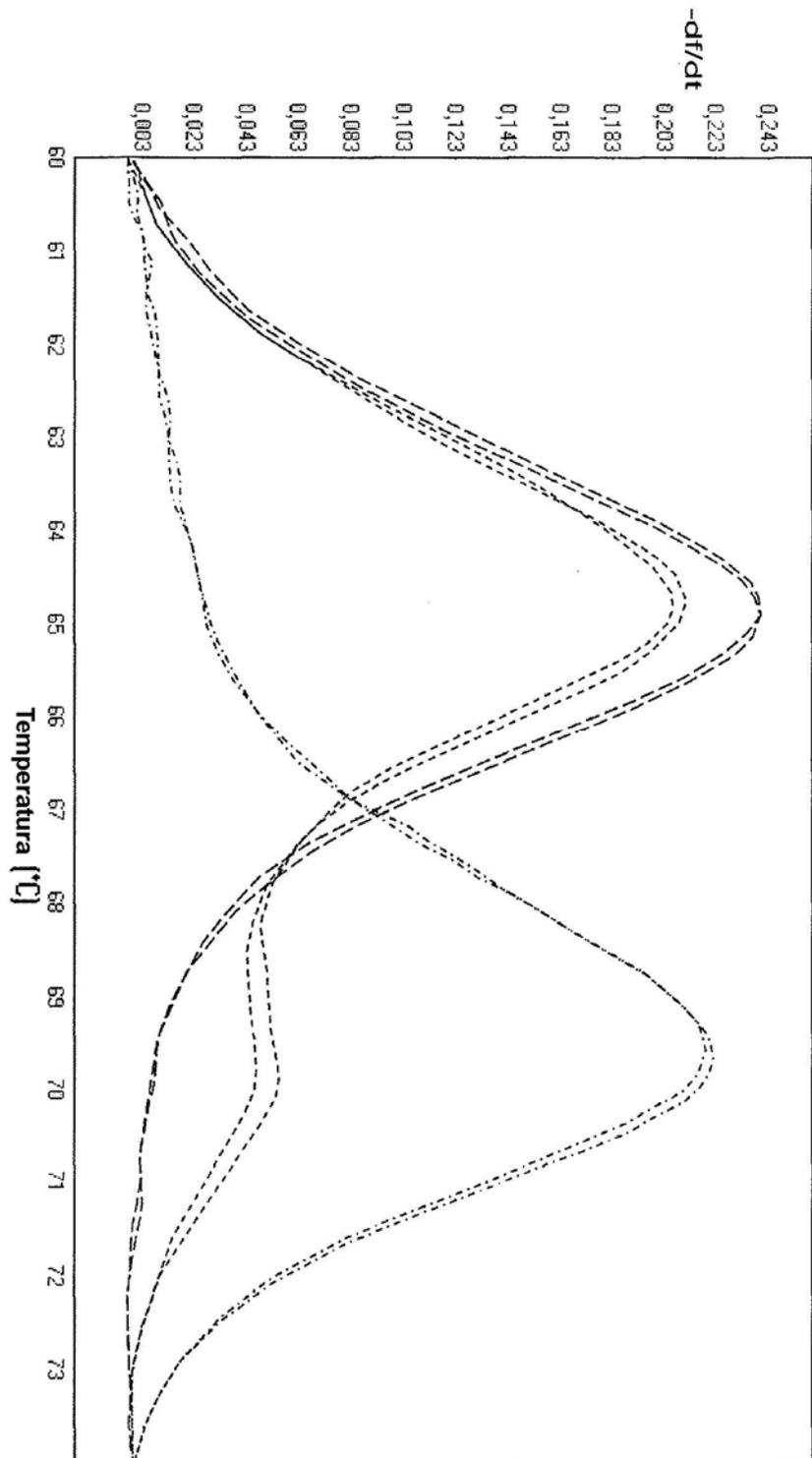


Fig. 9b

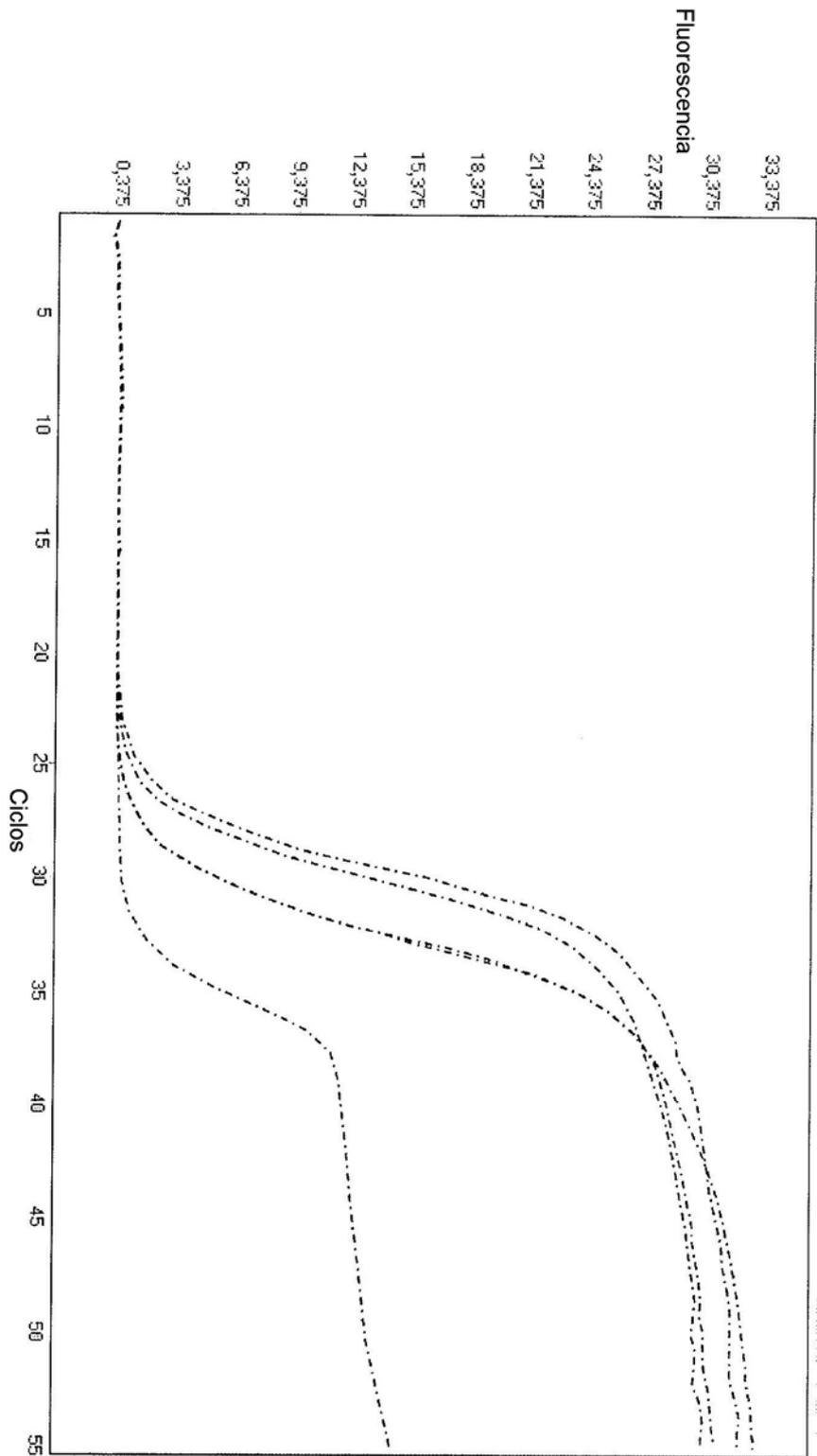


Fig. 9c

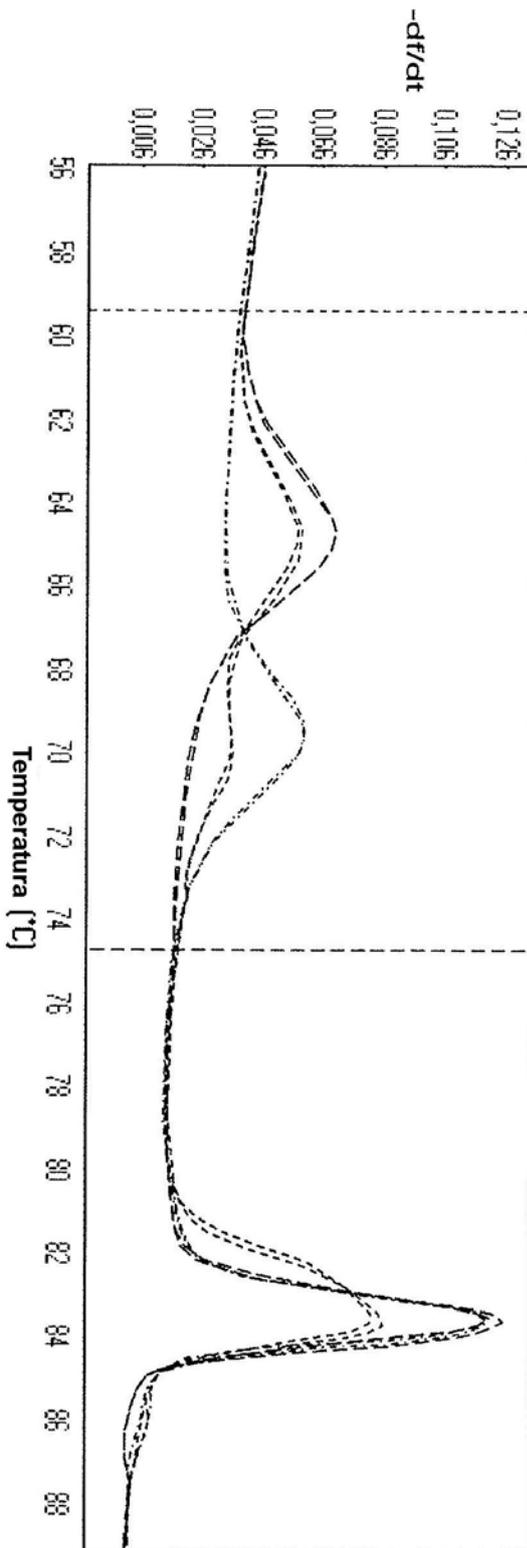


Fig. 10a

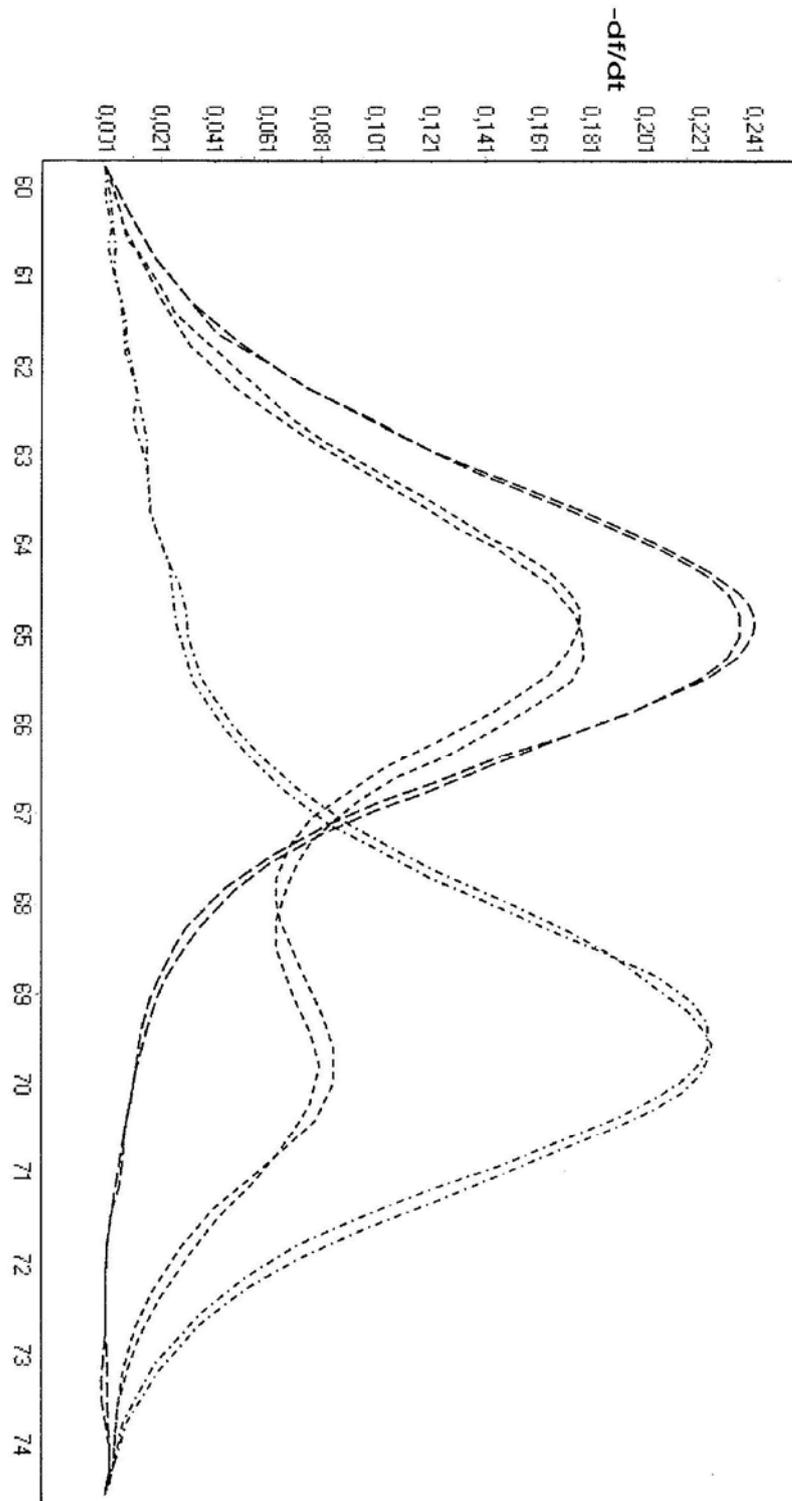


Fig. 10b

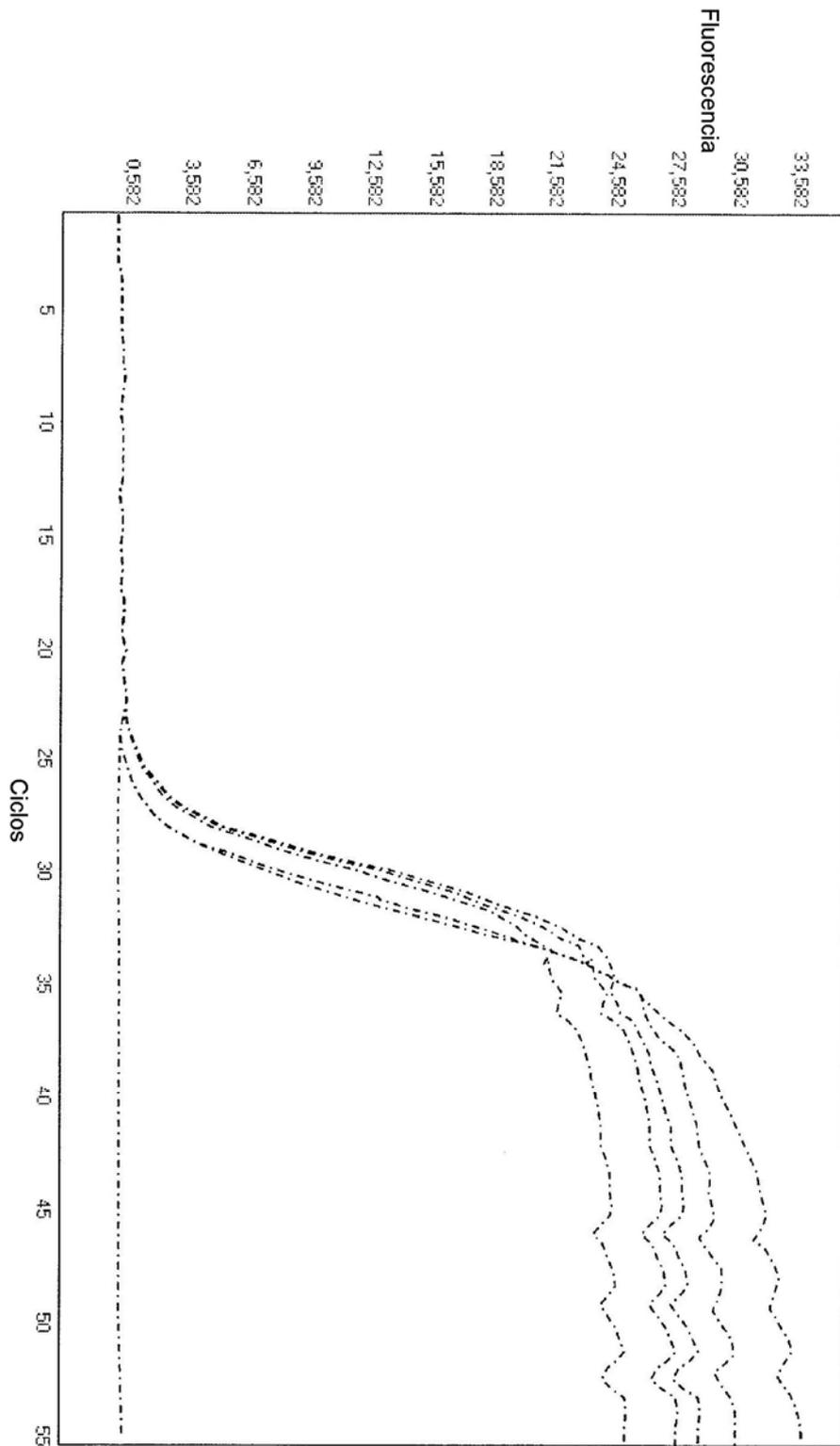


Fig. 10c

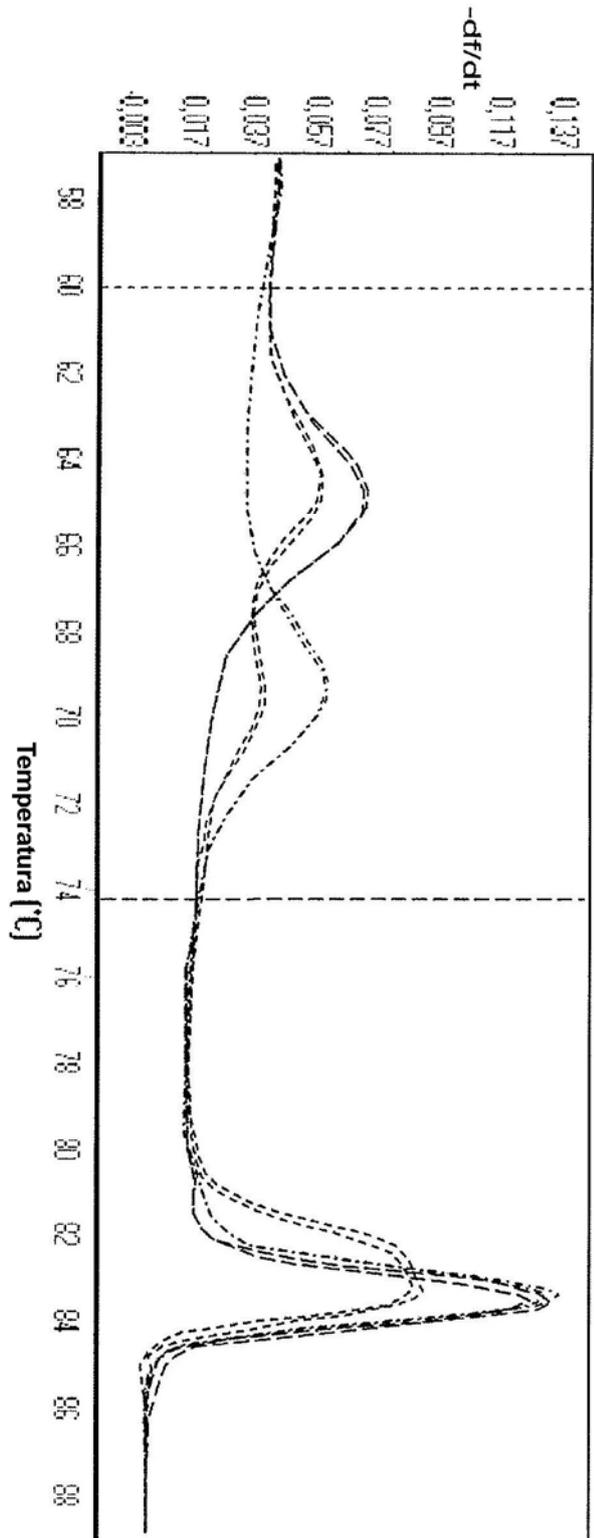


Fig. 11a

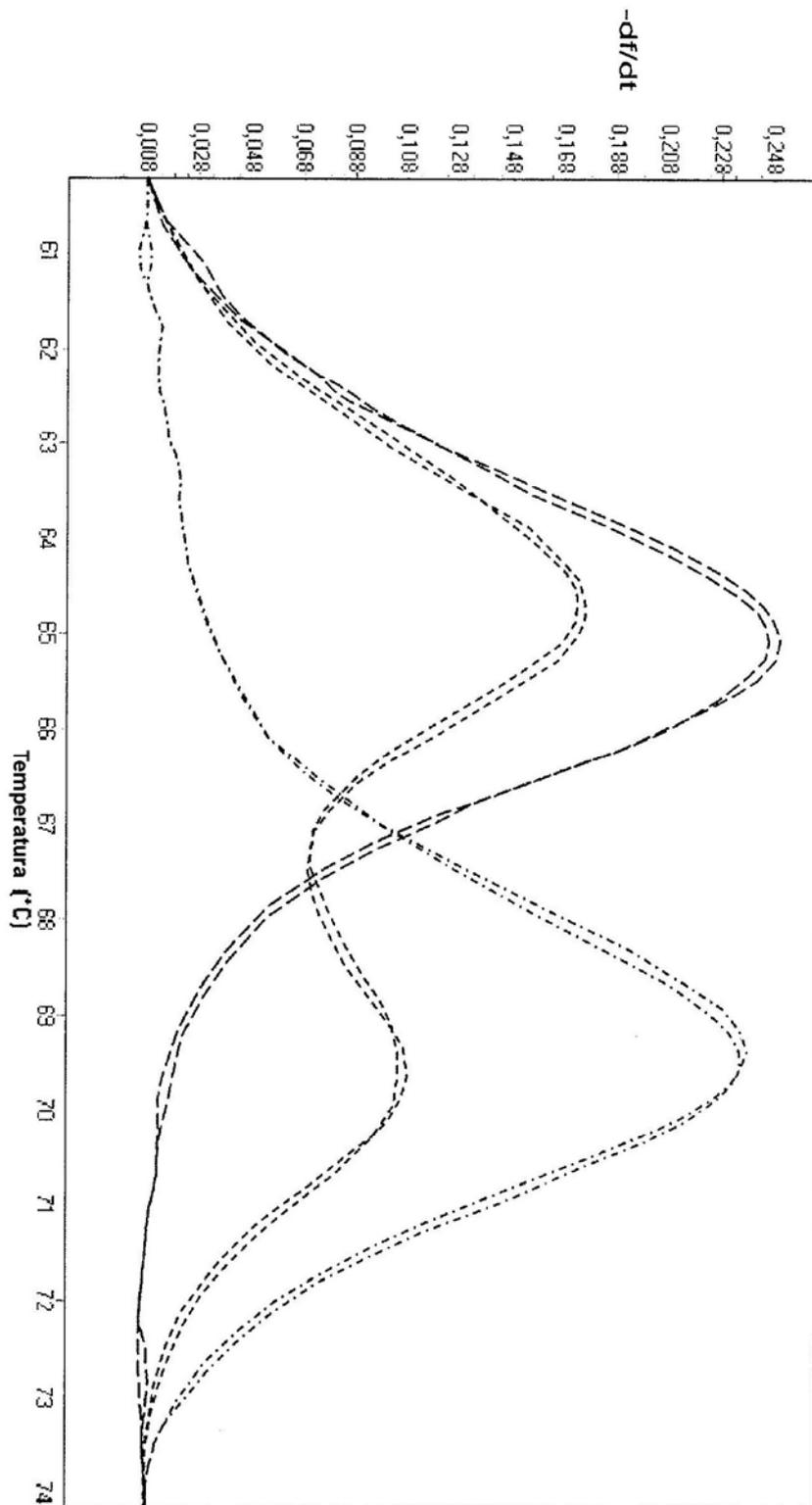


Fig. 11b

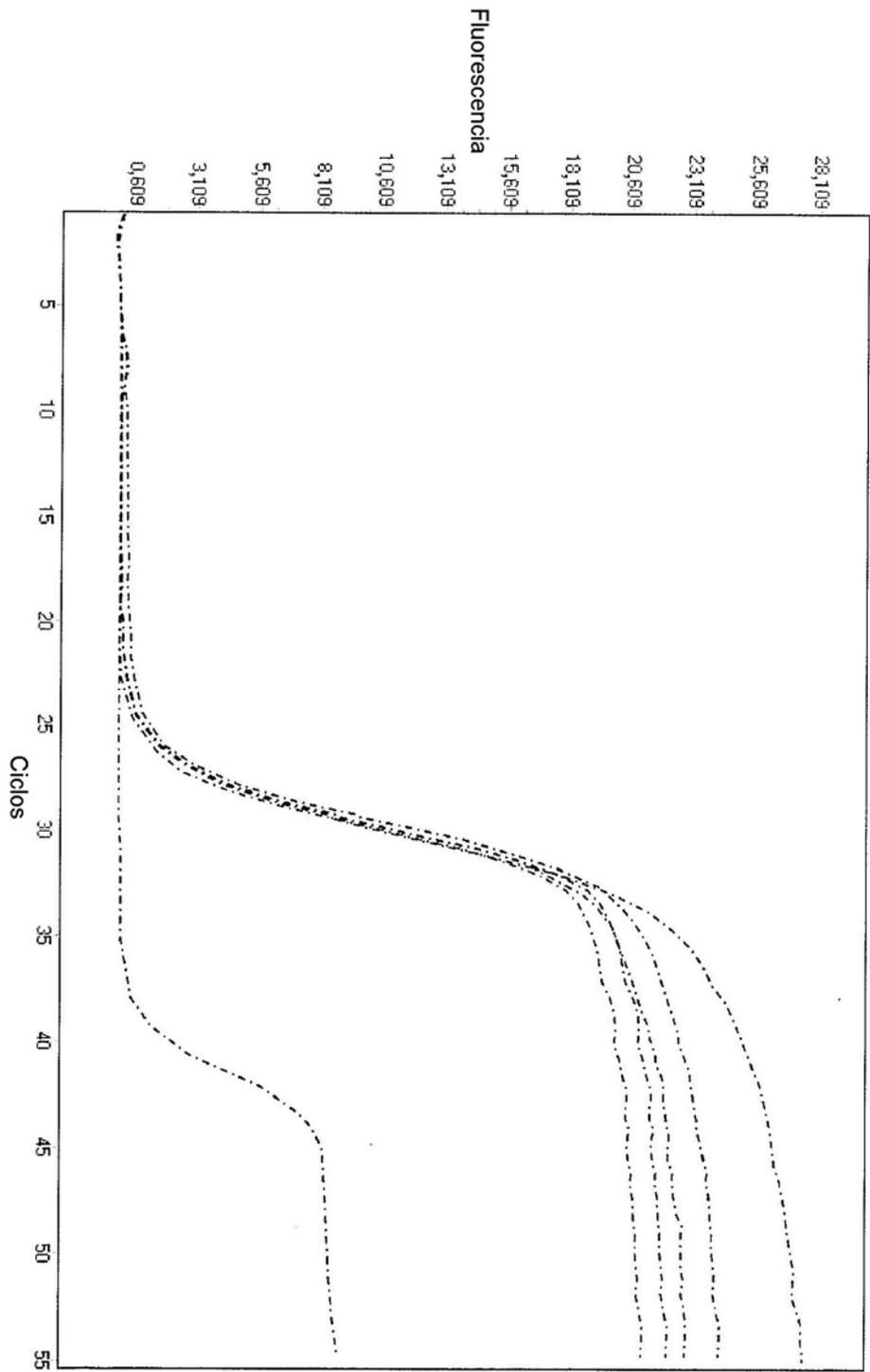


Fig. 11c

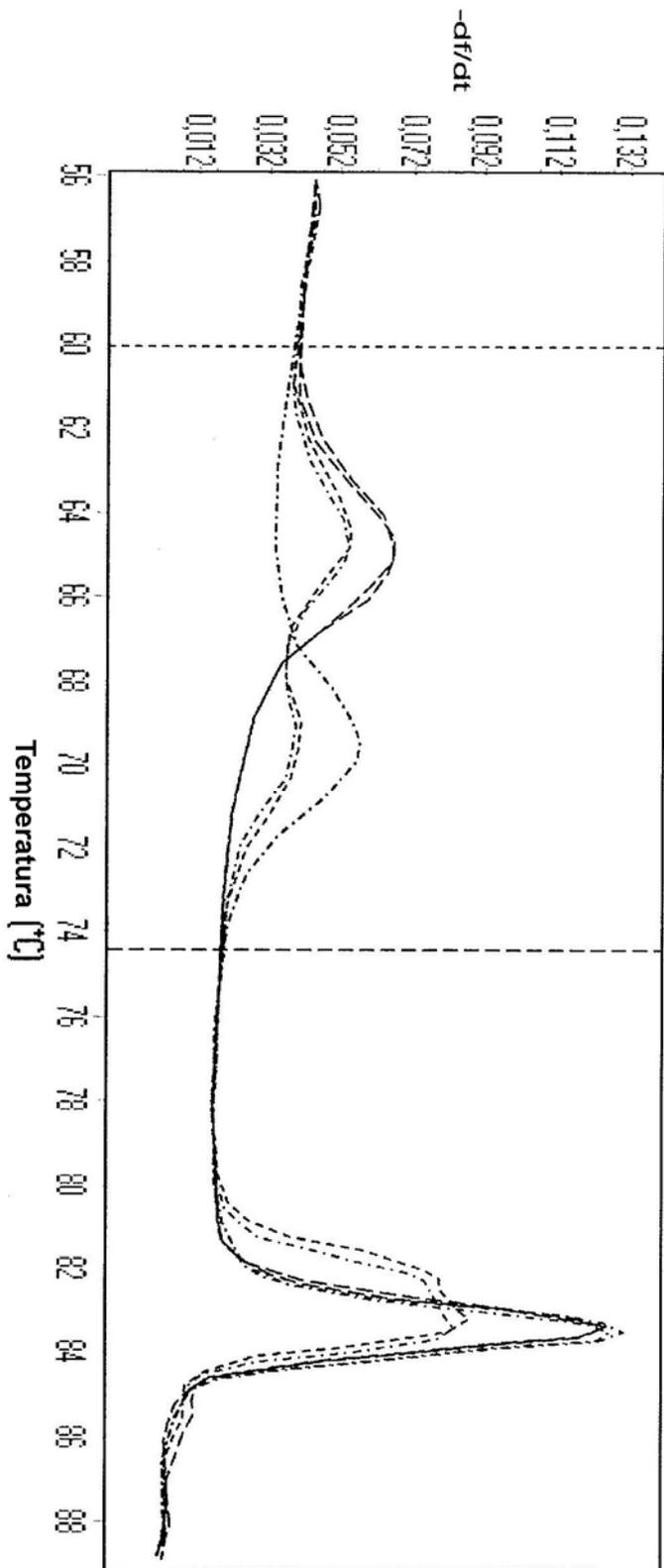


Fig. 12a

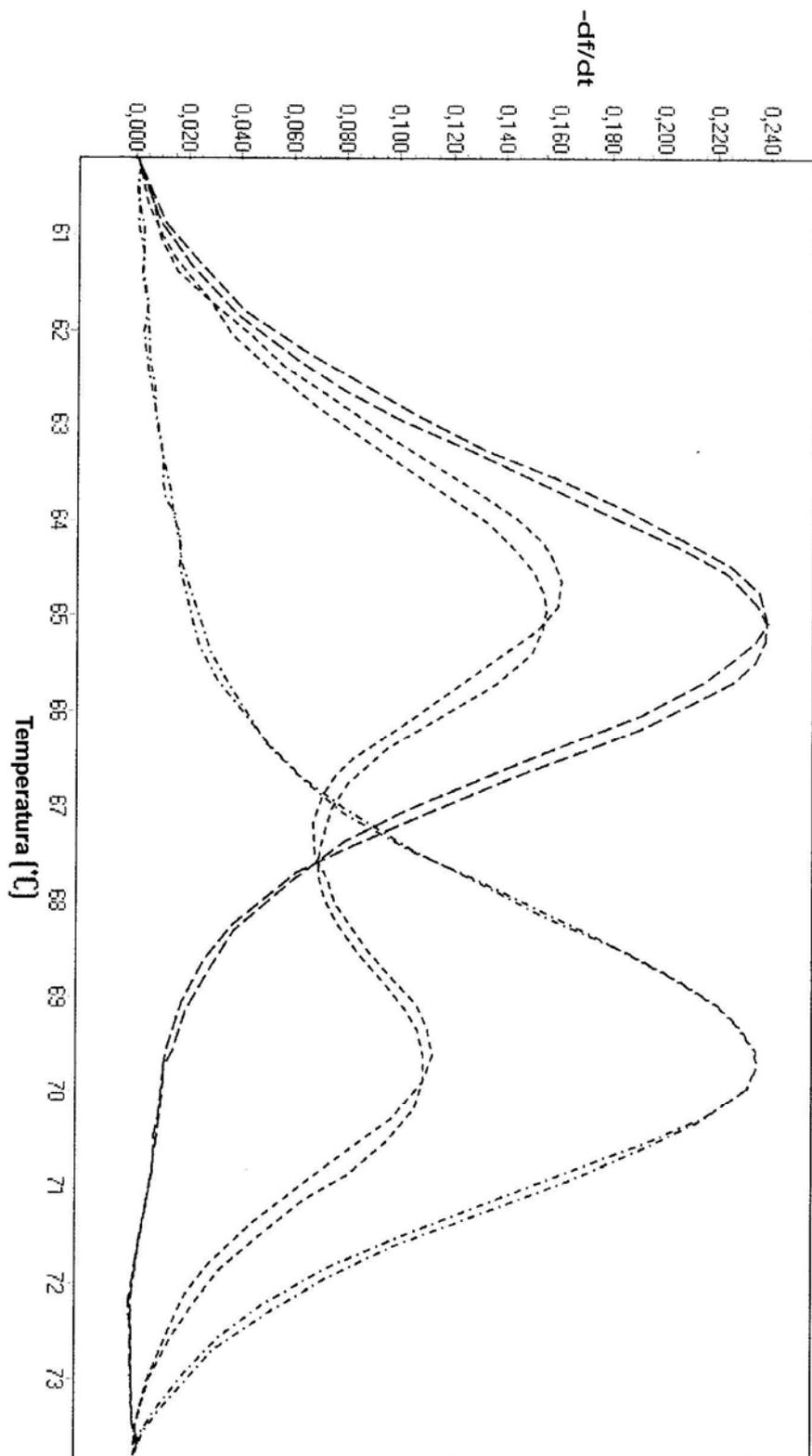


Fig. 12b

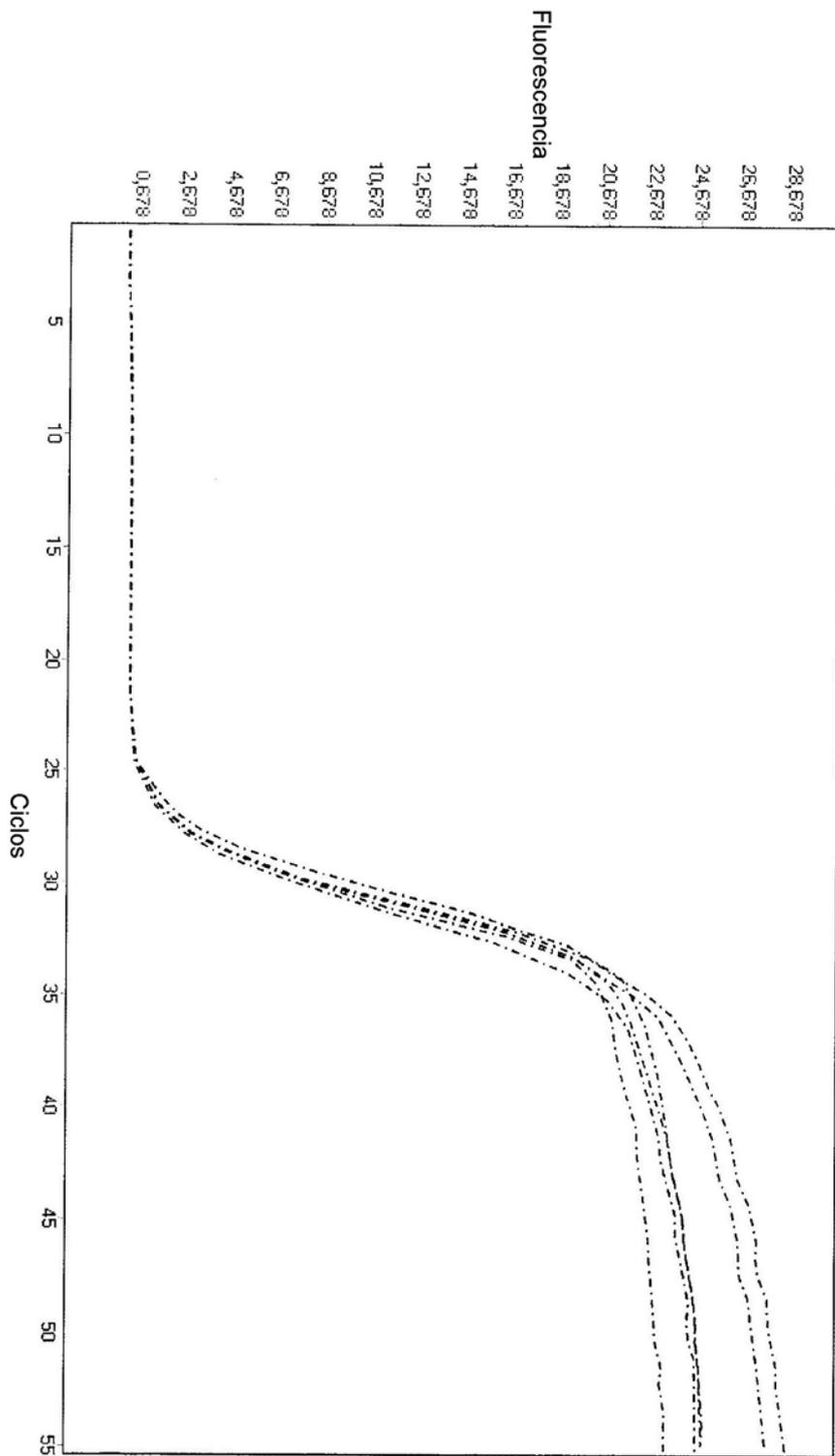


Fig. 12c

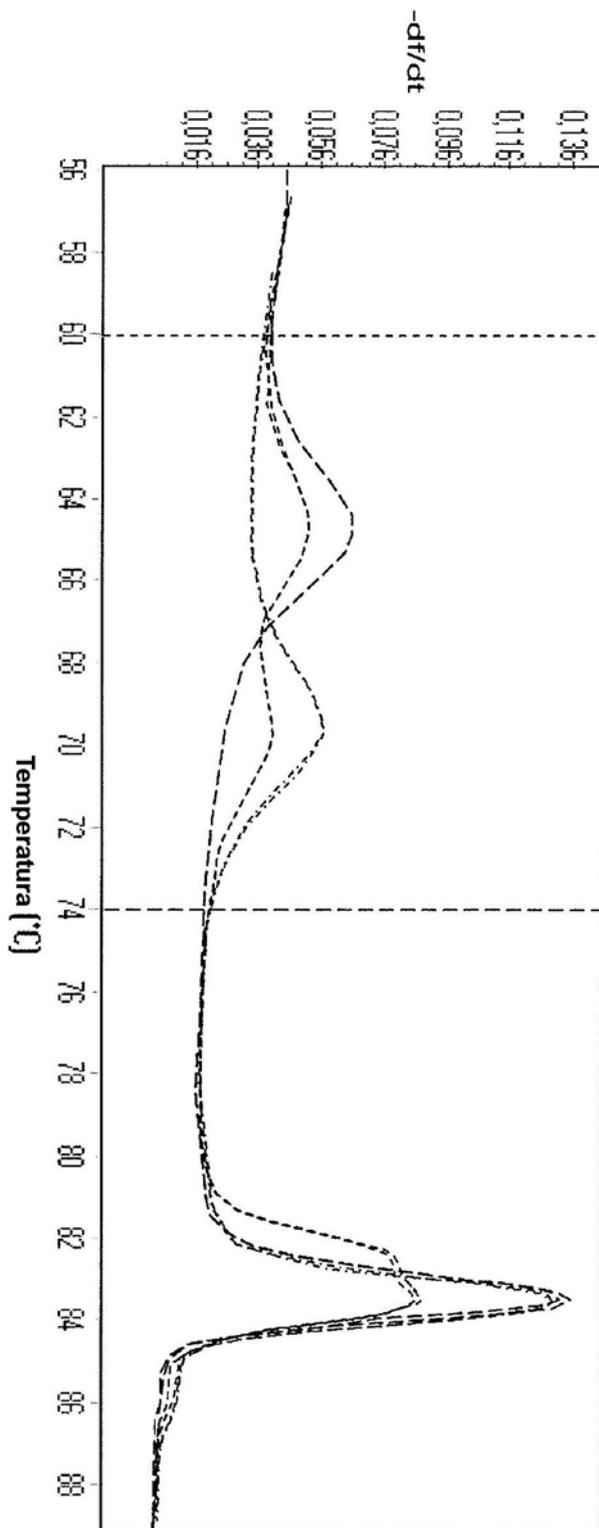


Fig. 13a

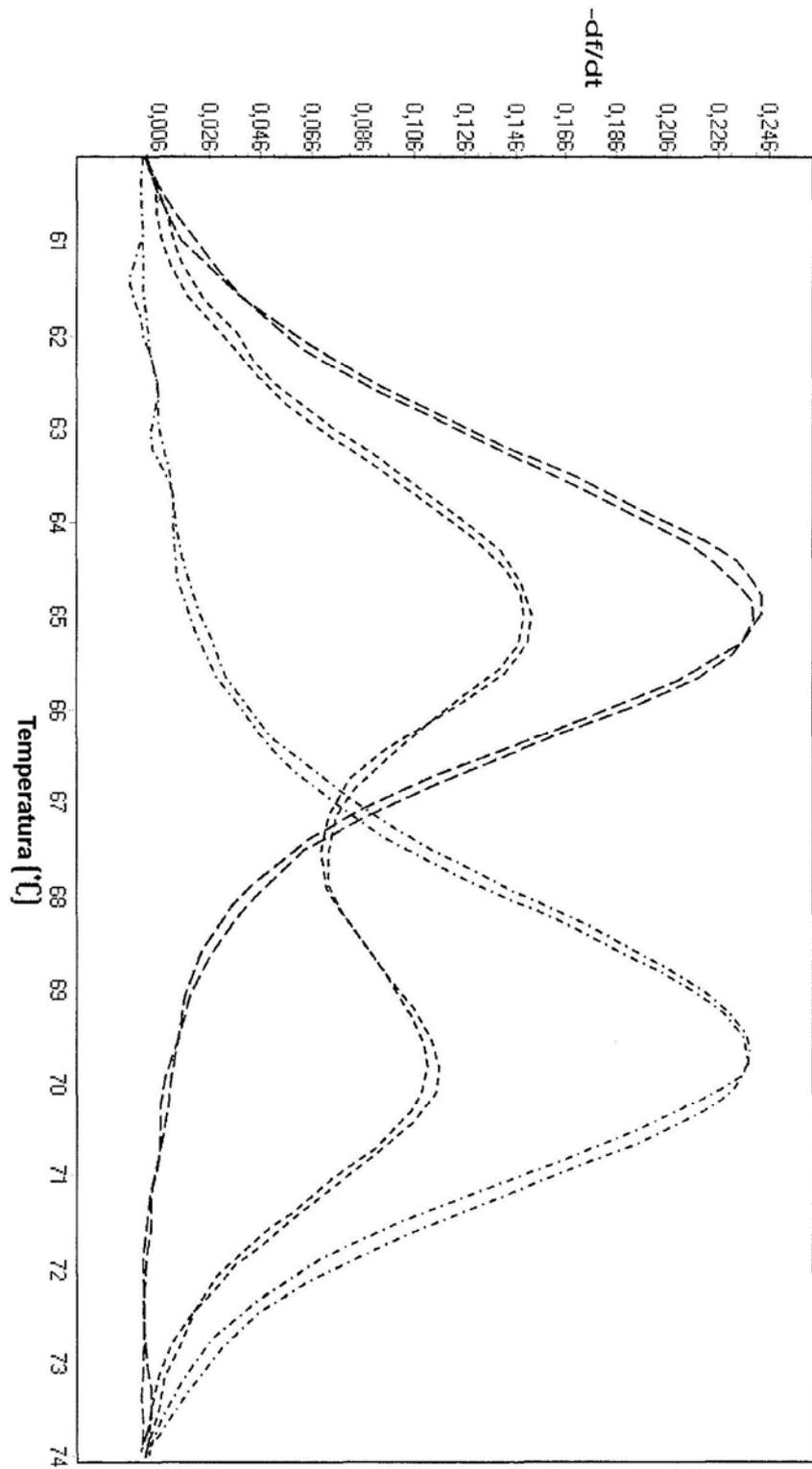


Fig. 13b

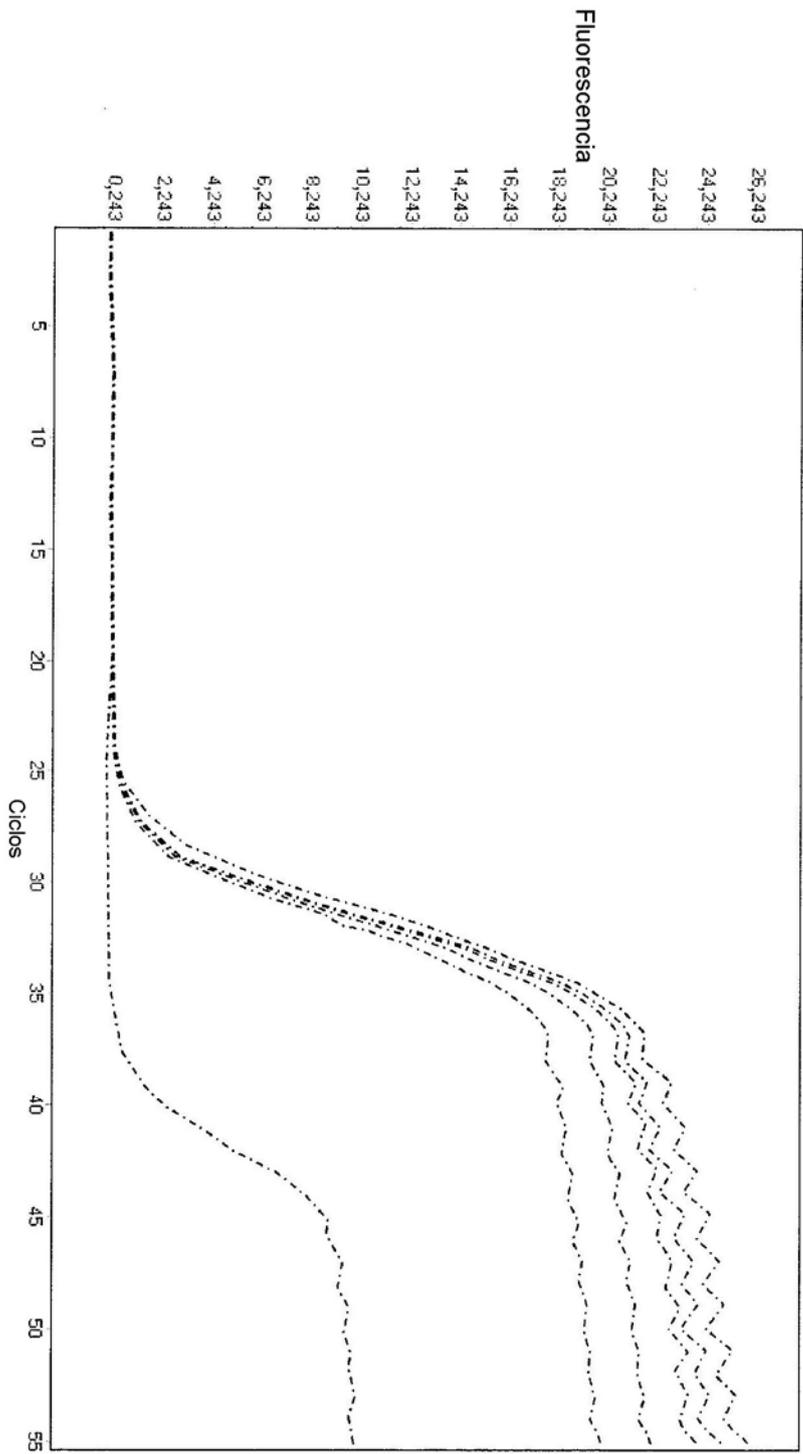


Fig. 13c

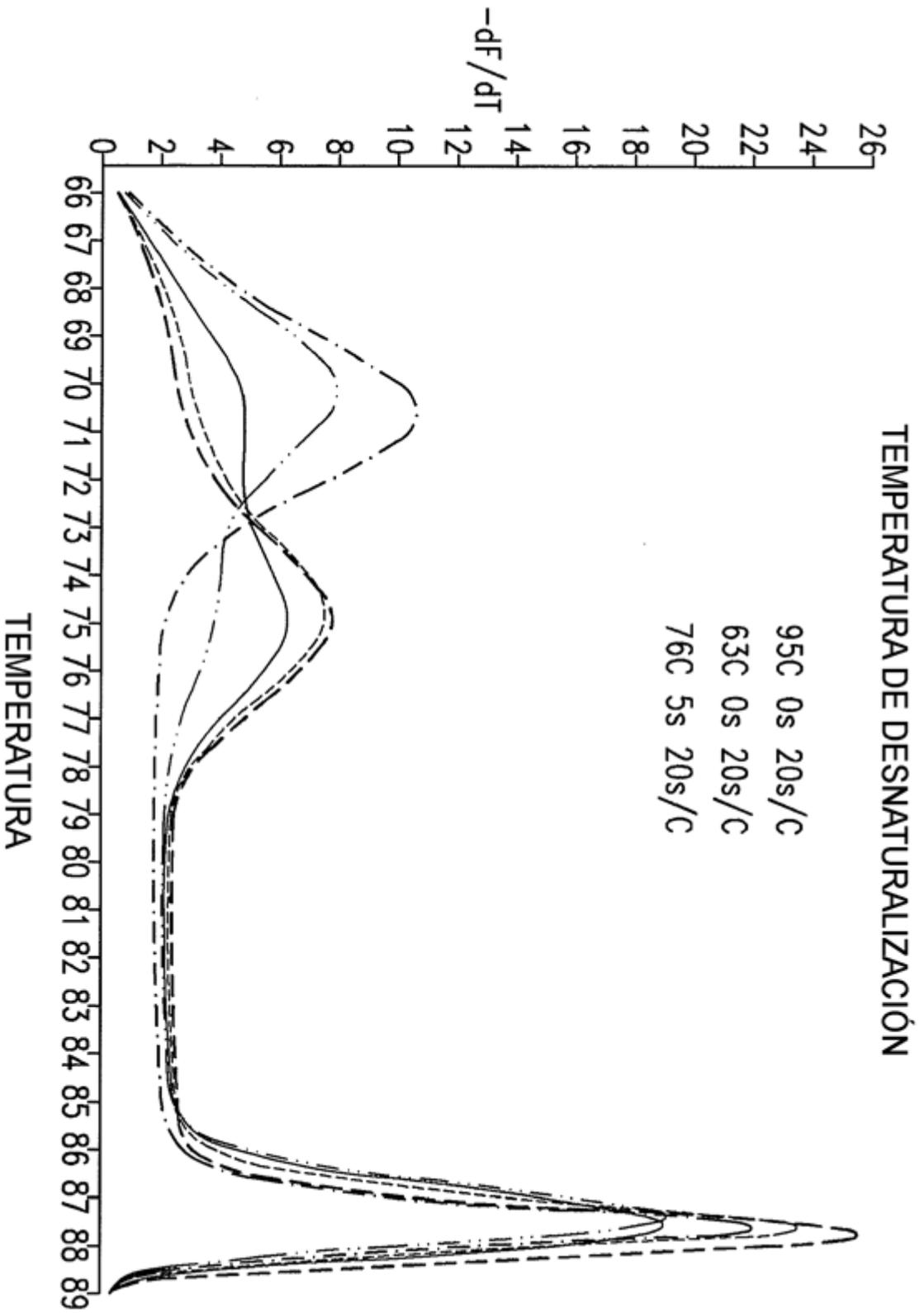


Fig. 14A

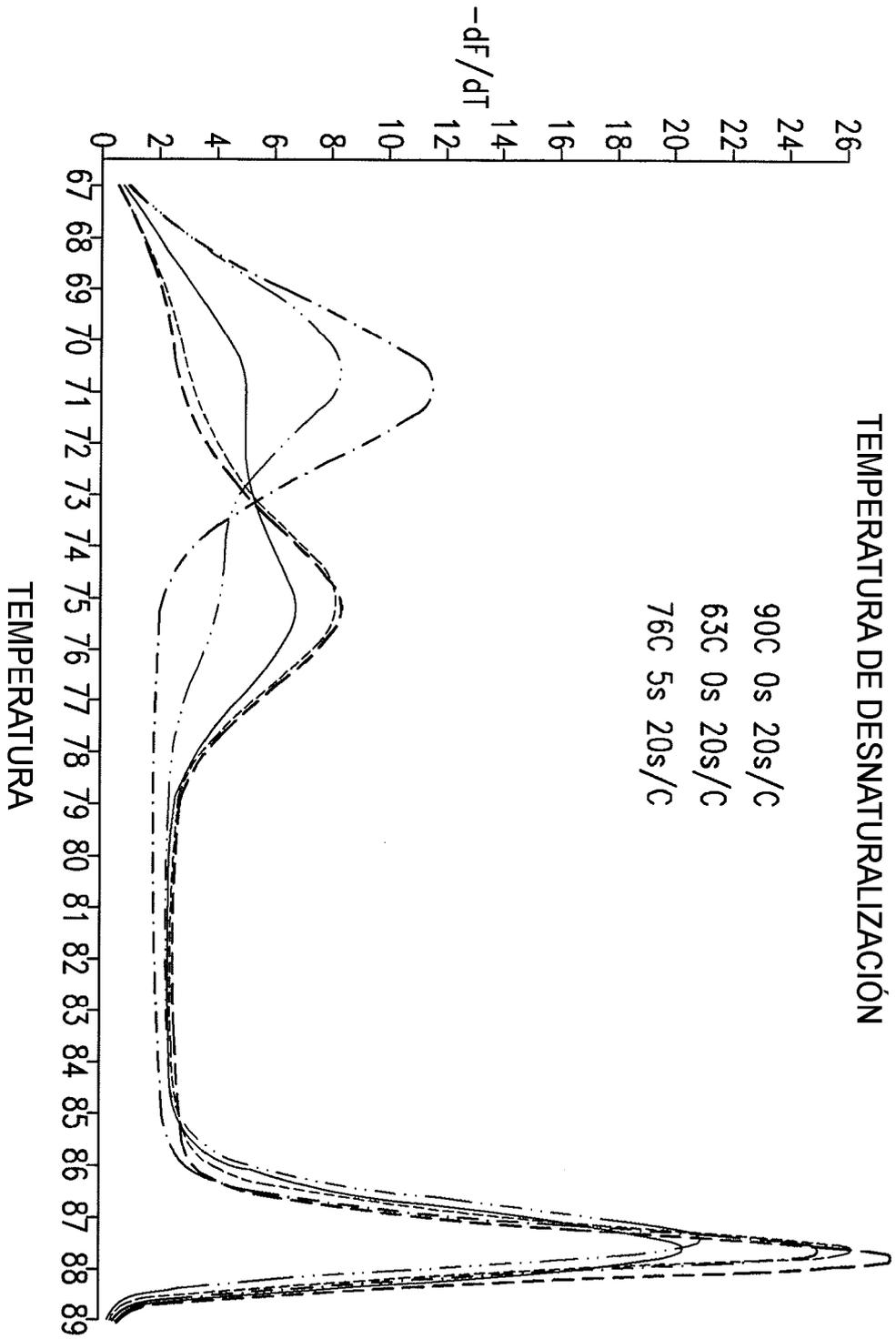


Fig. 14B

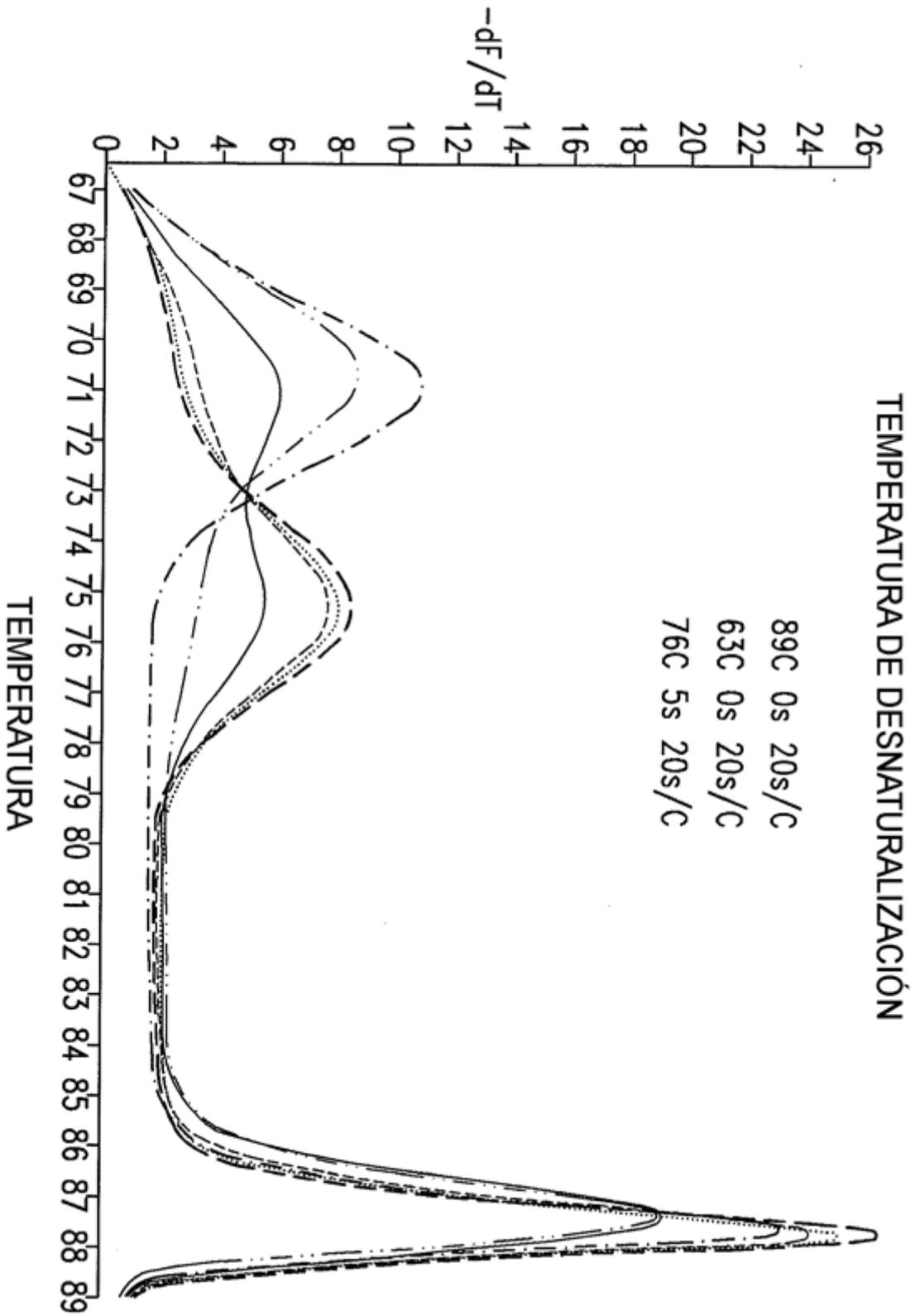


Fig. 14C

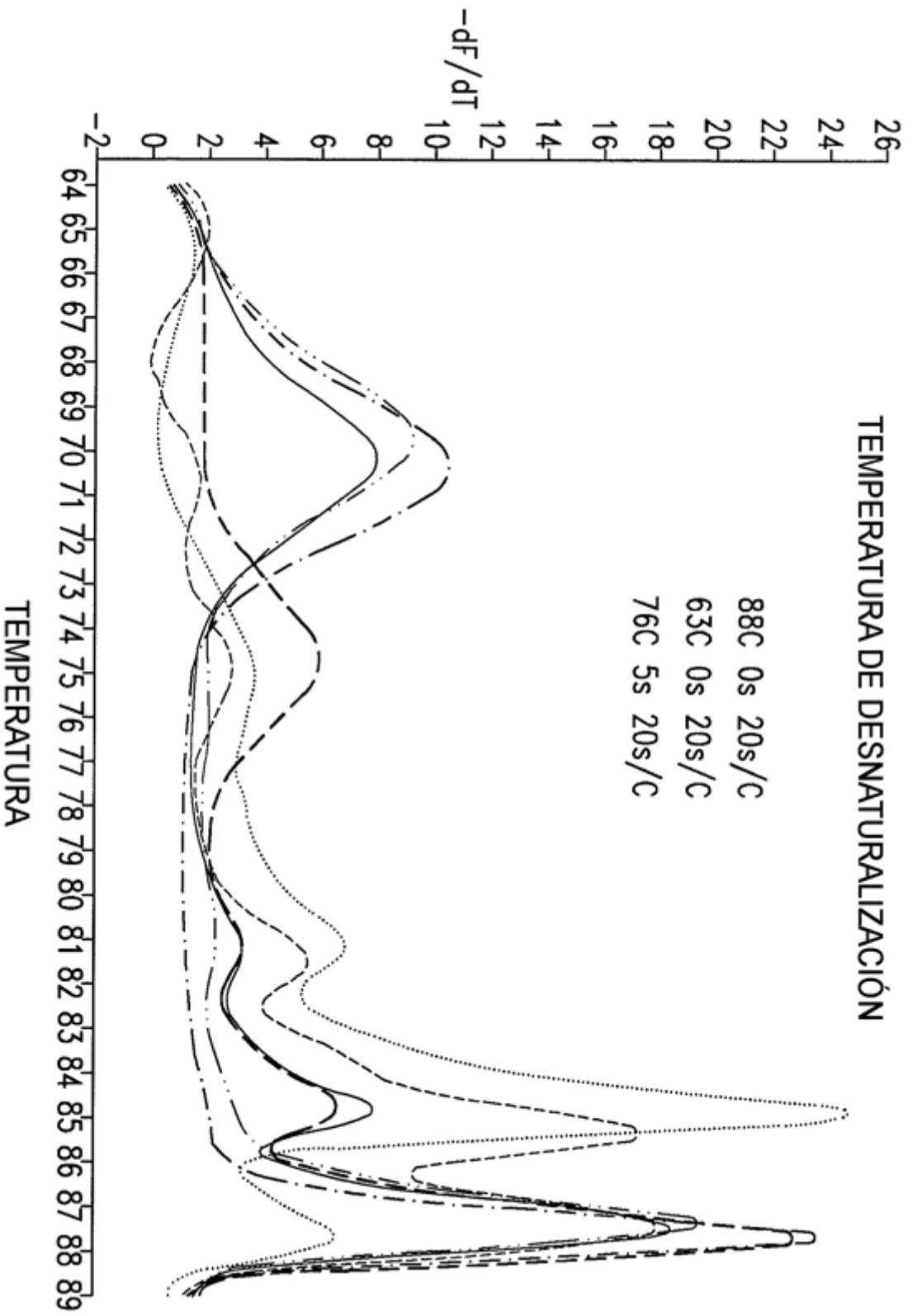


Fig. 14D

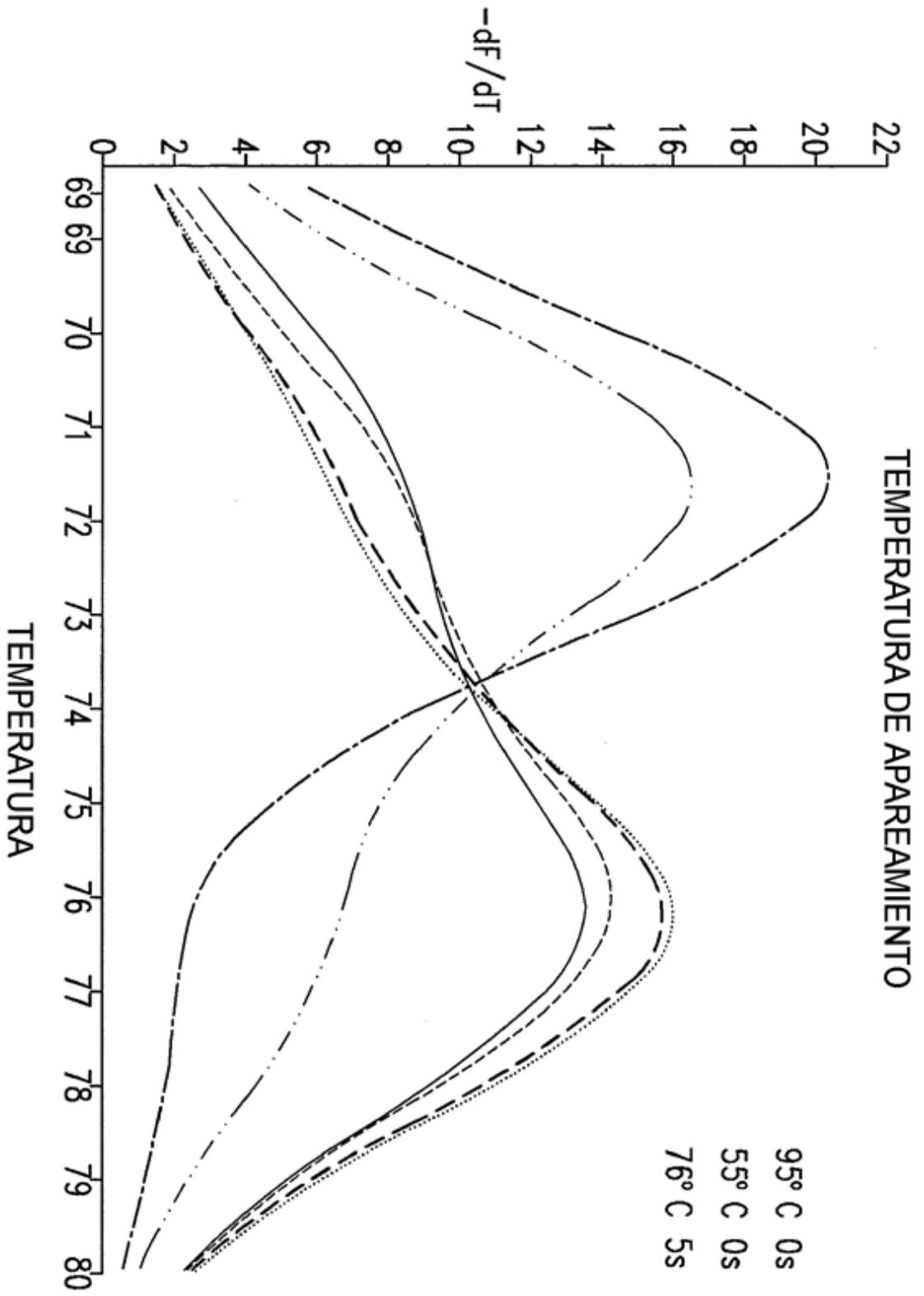


Fig. 15A

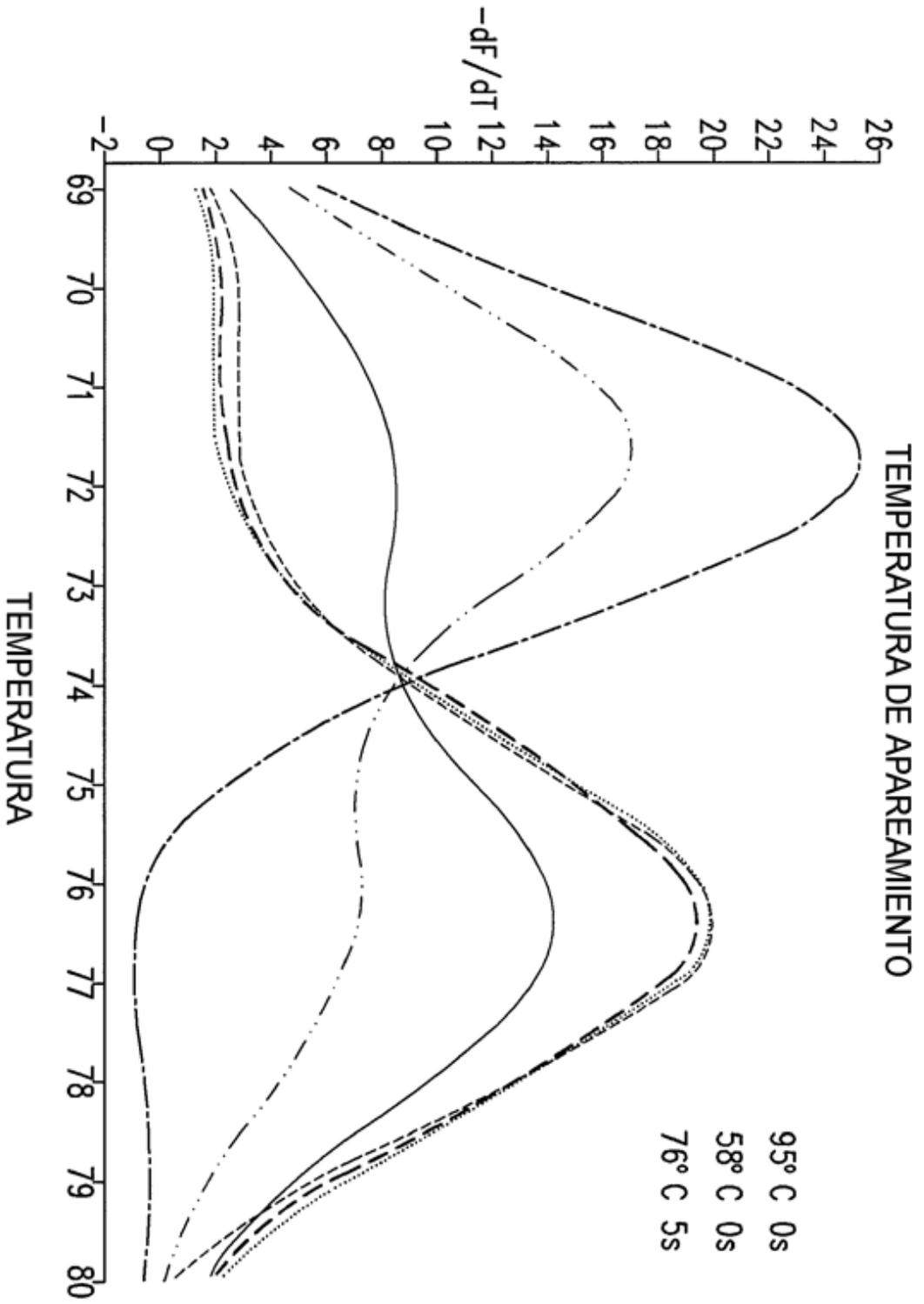


Fig. 15B

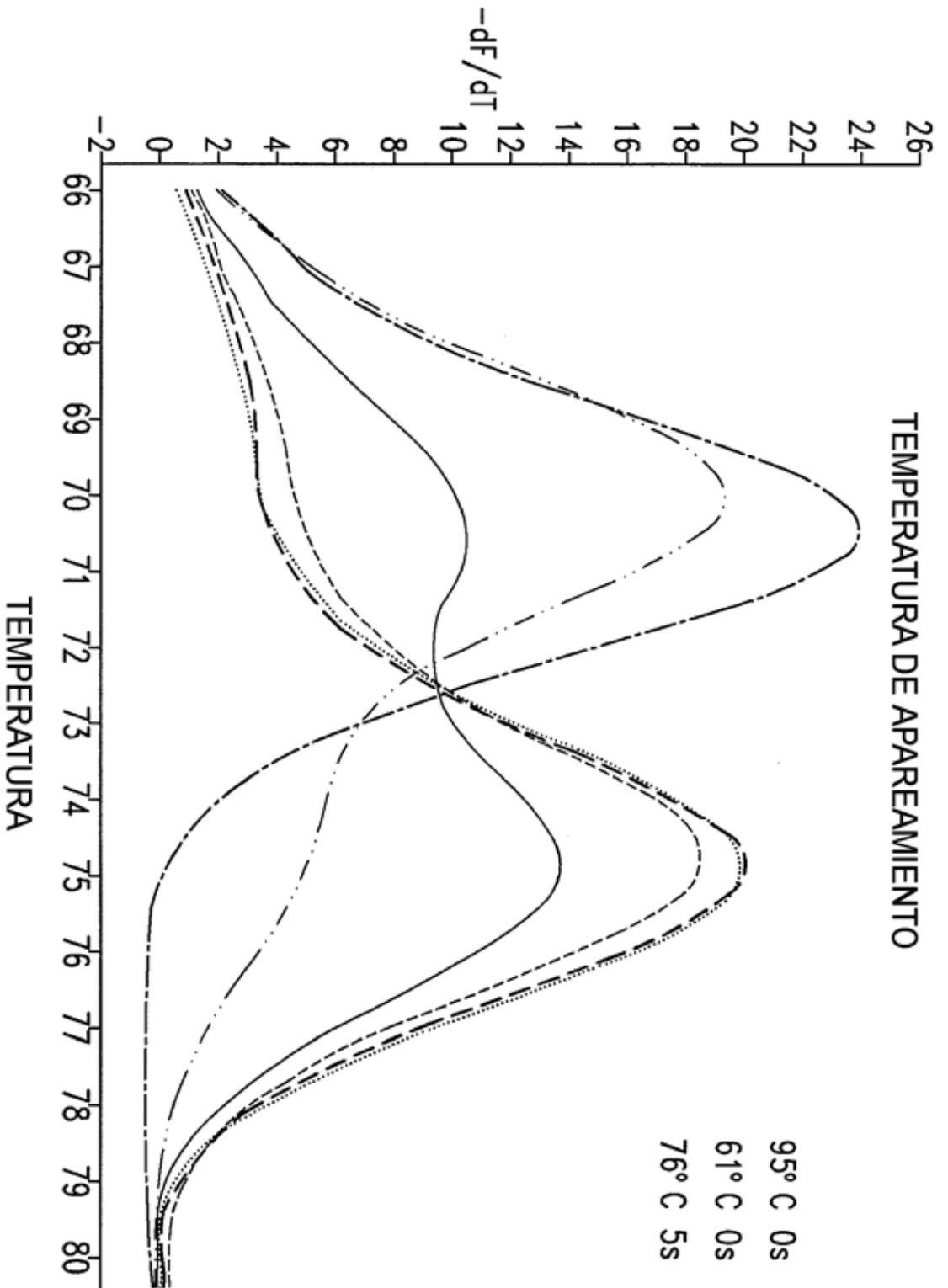


Fig. 15C

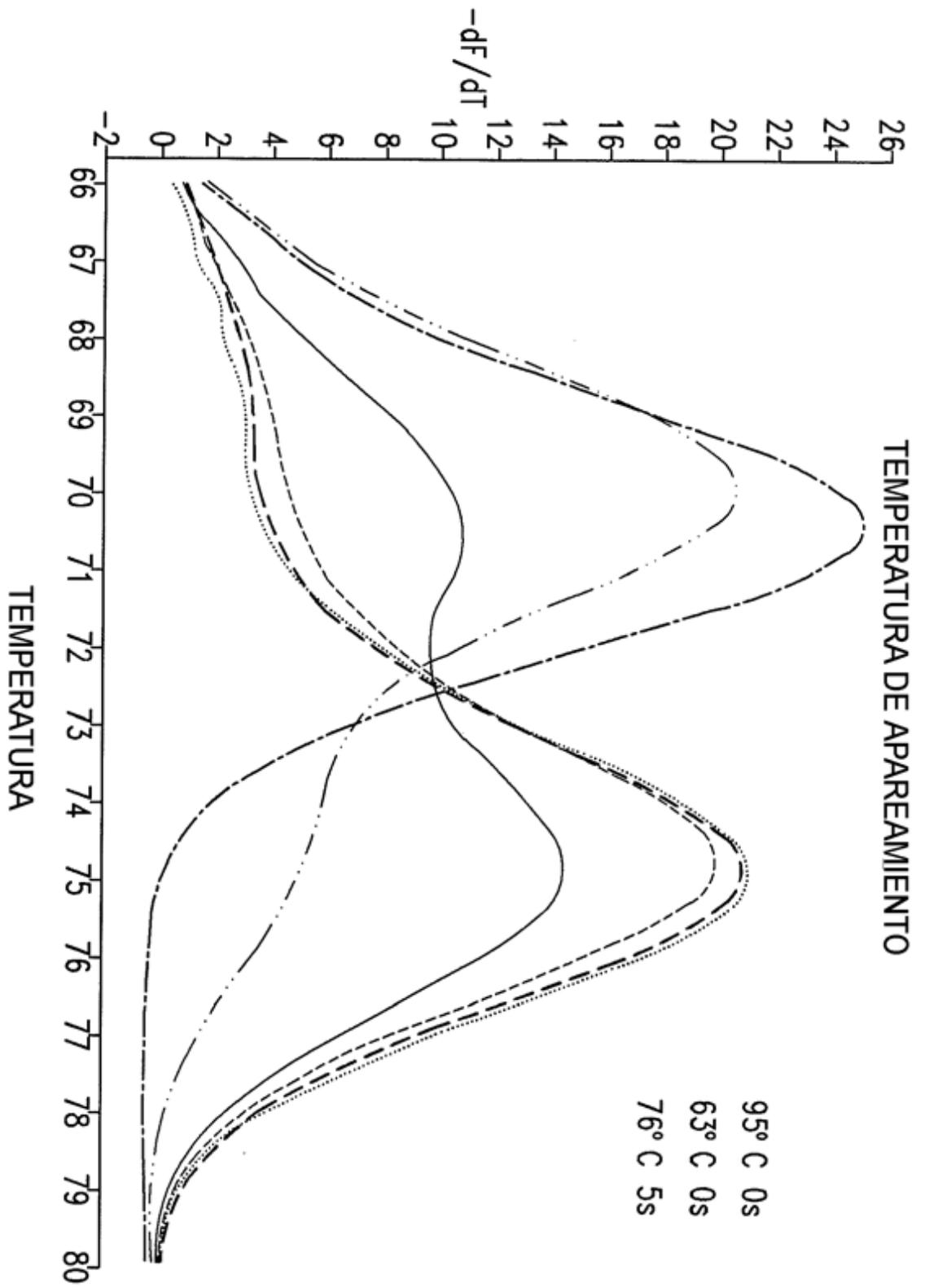


Fig. 15D

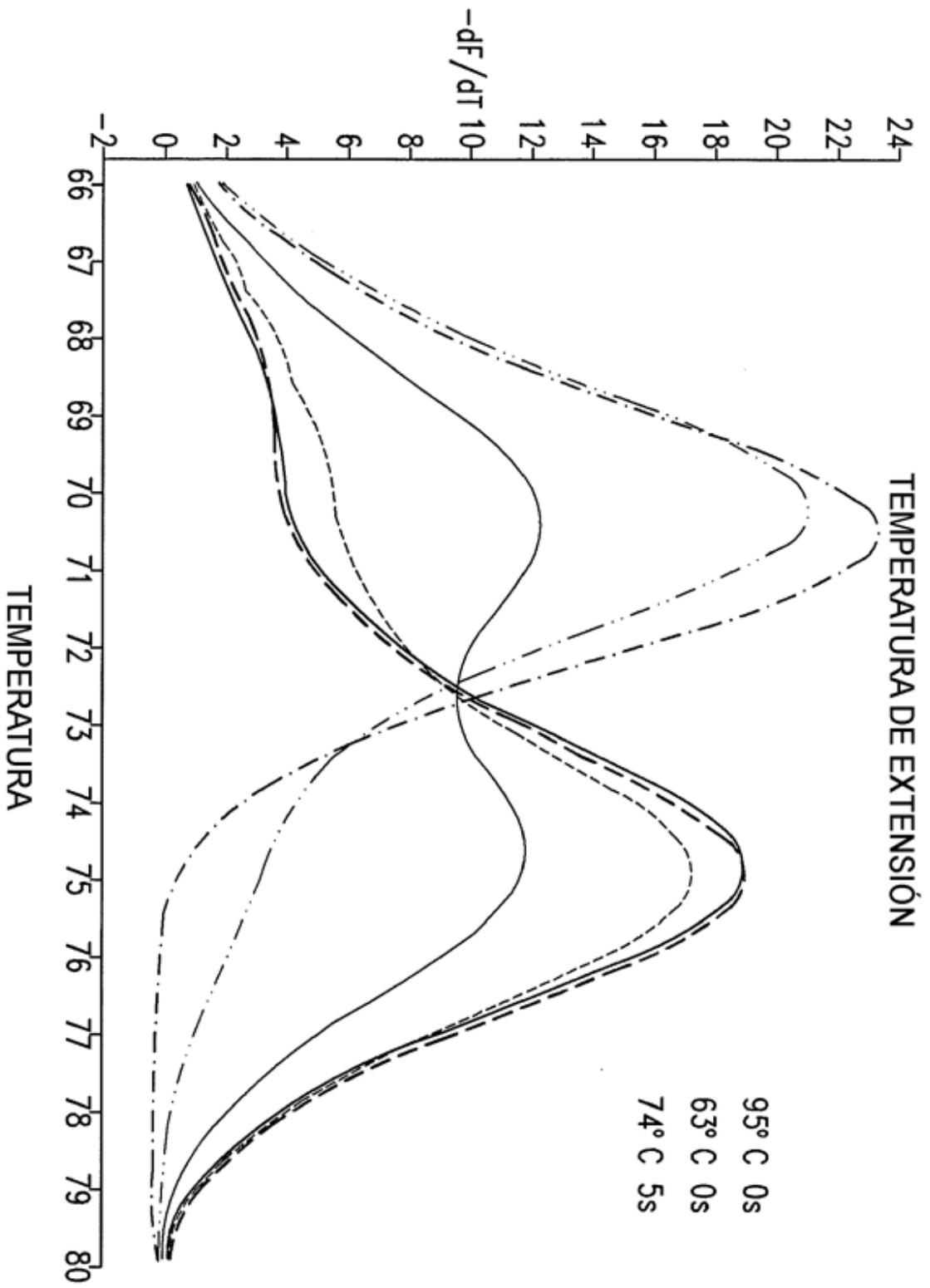


Fig. 16A

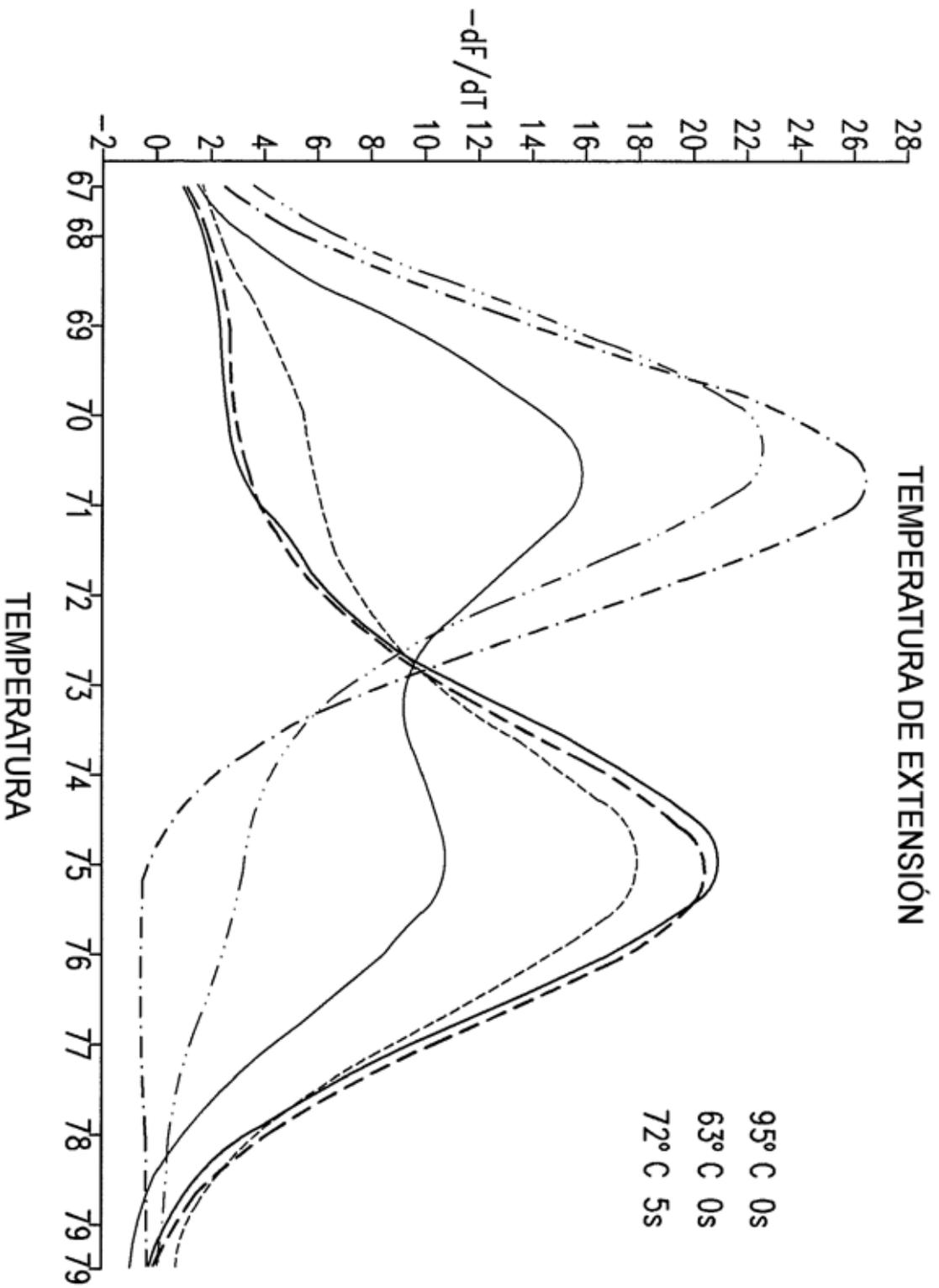


Fig. 16B

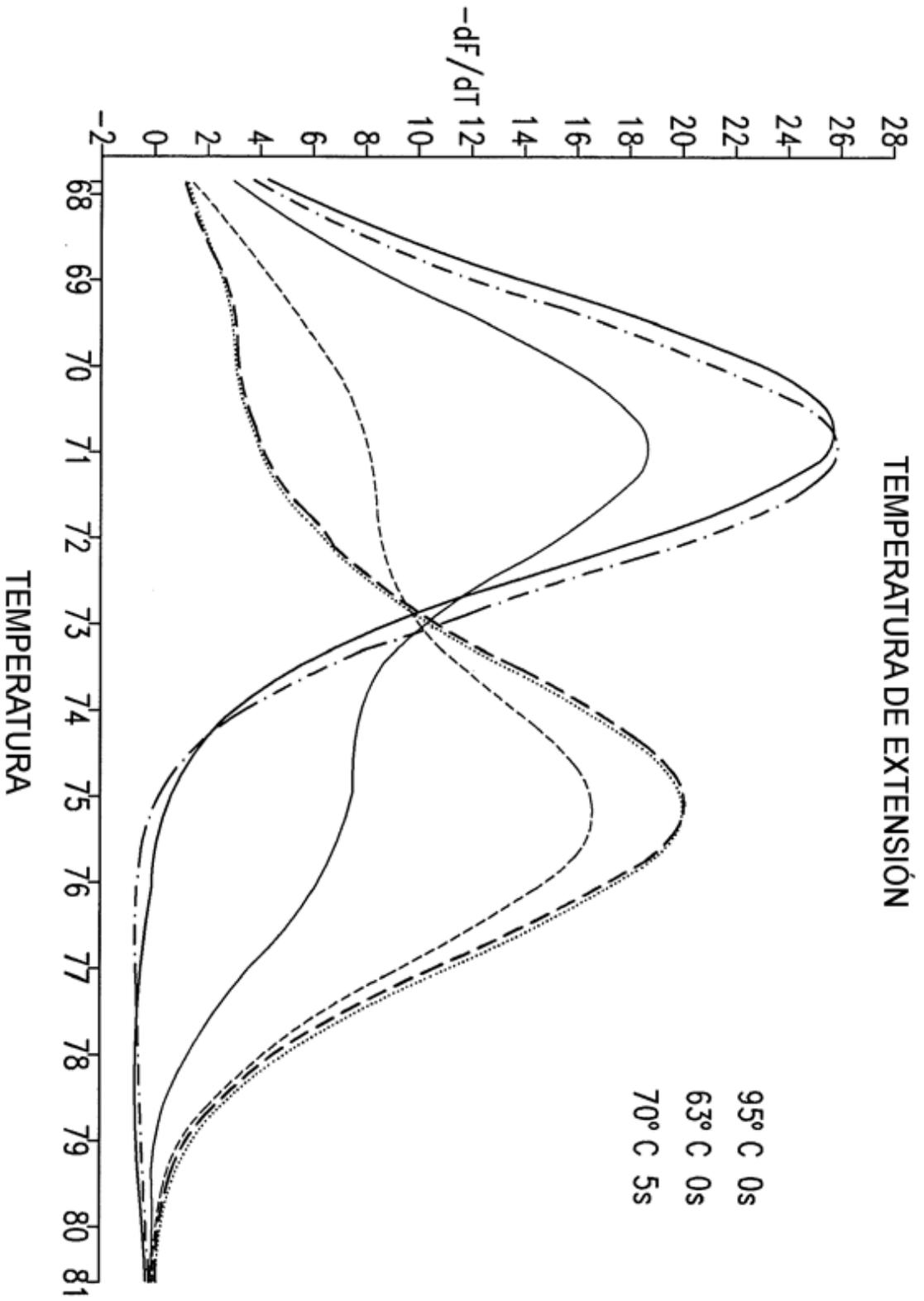


Fig. 16C

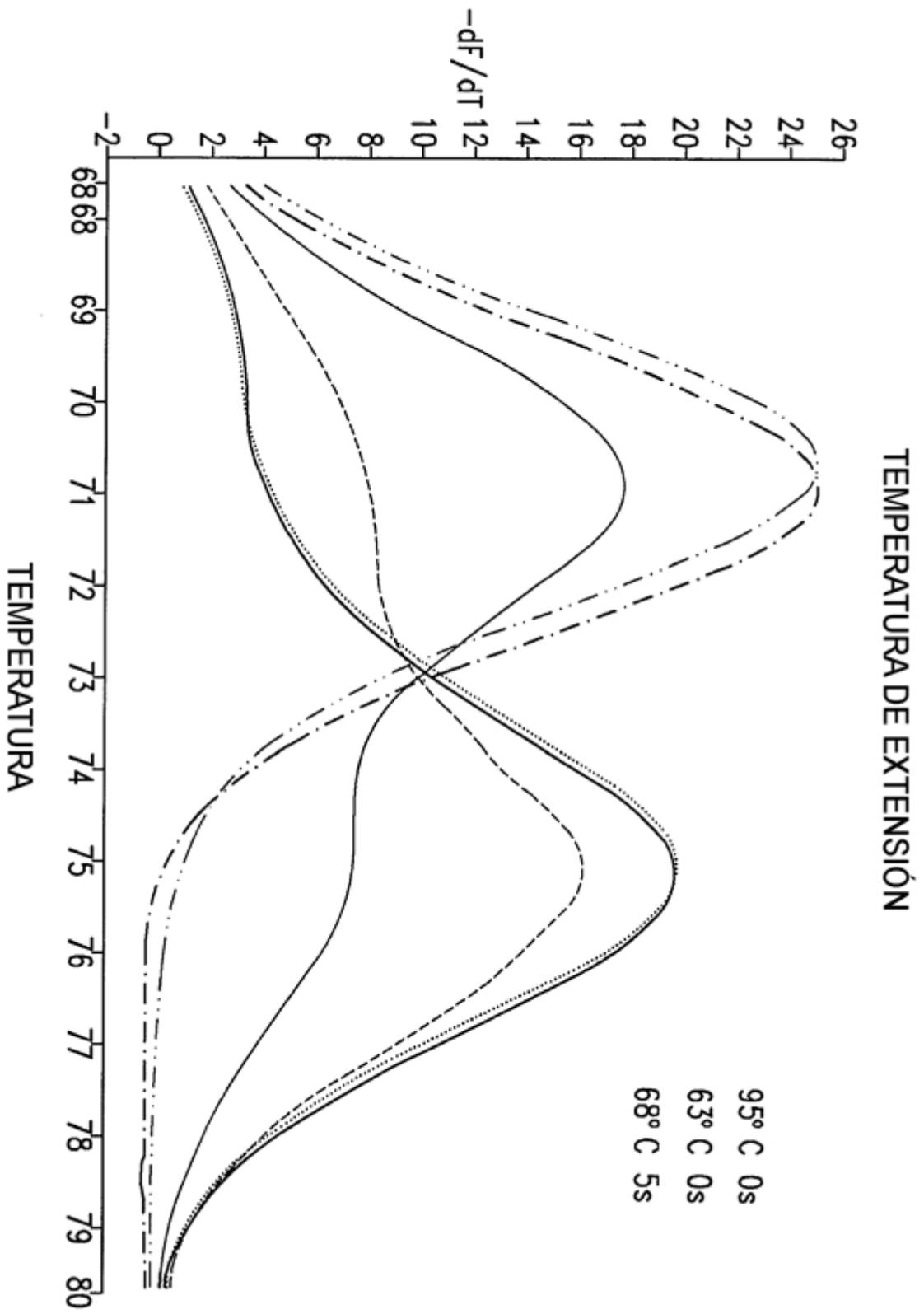


Fig. 16D

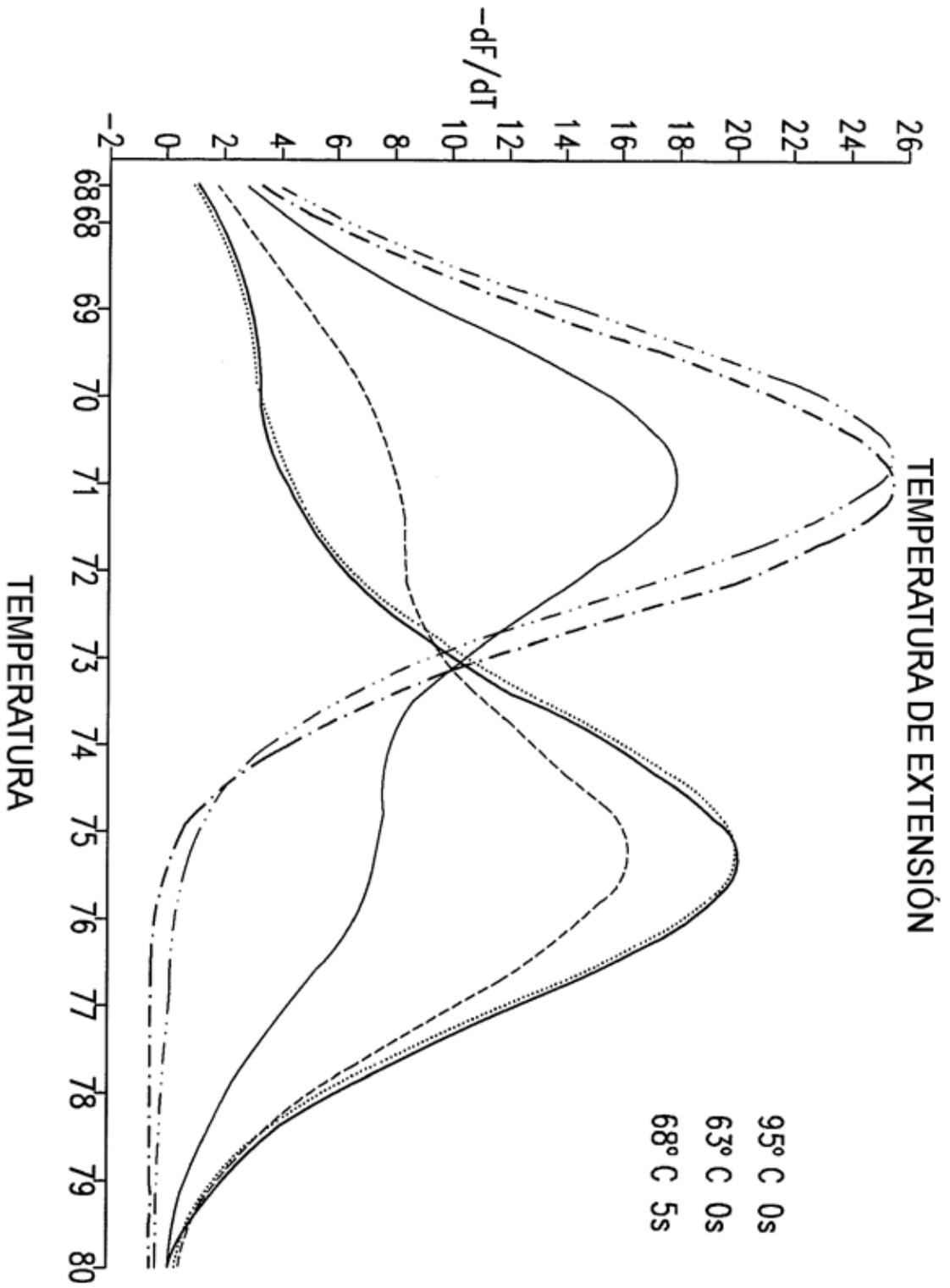


Fig. 17A

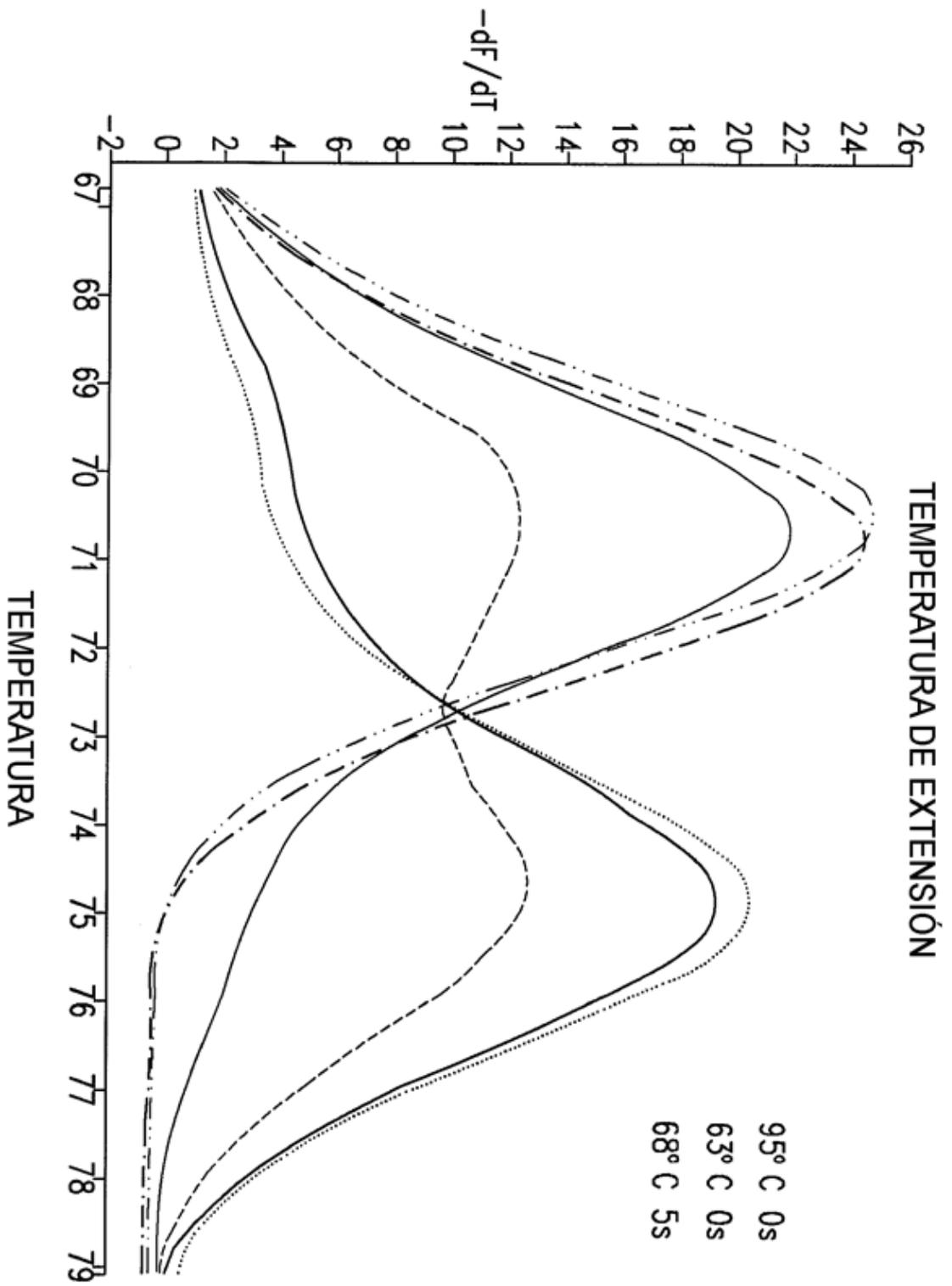


Fig. 17B

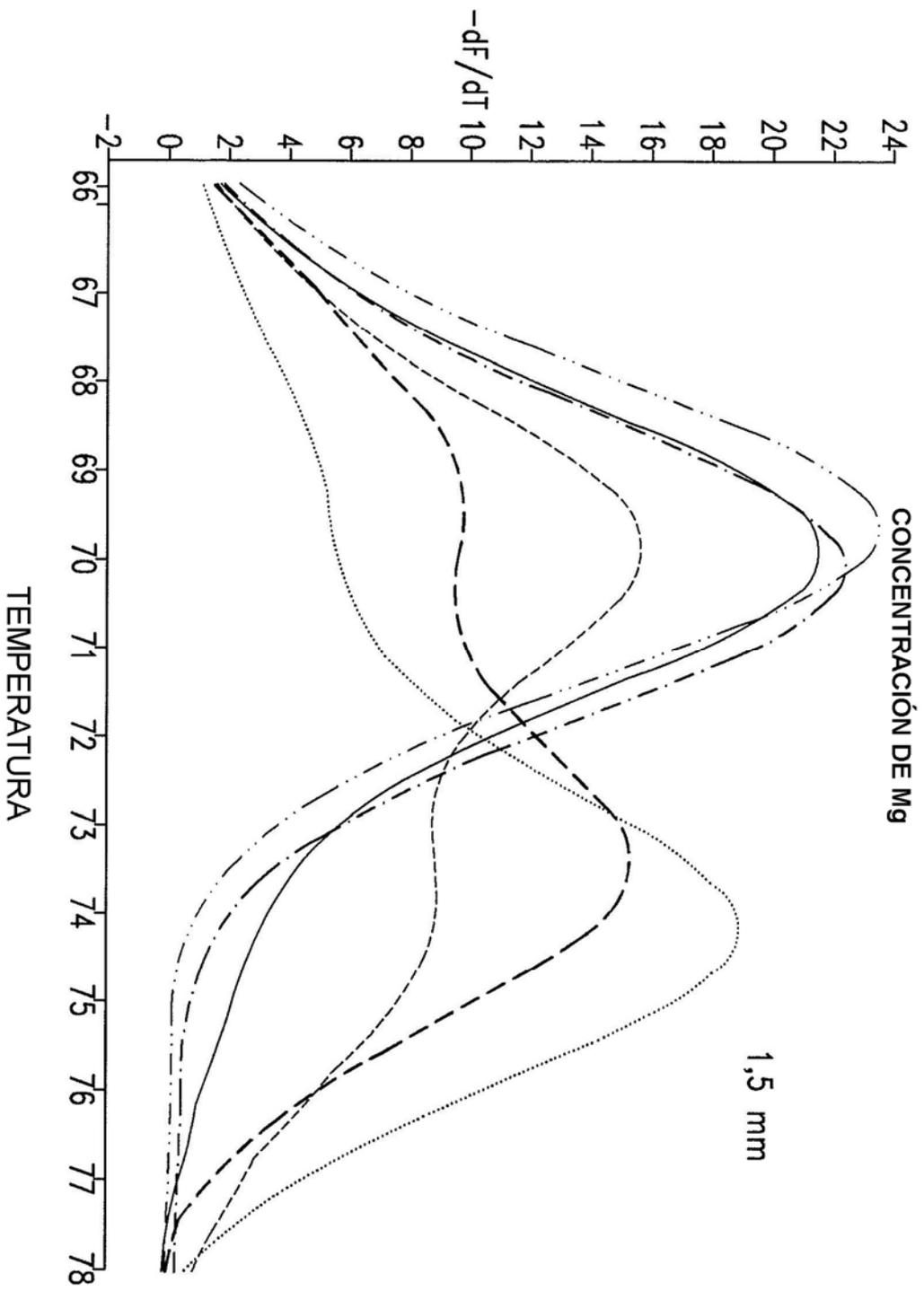


Fig. 18A

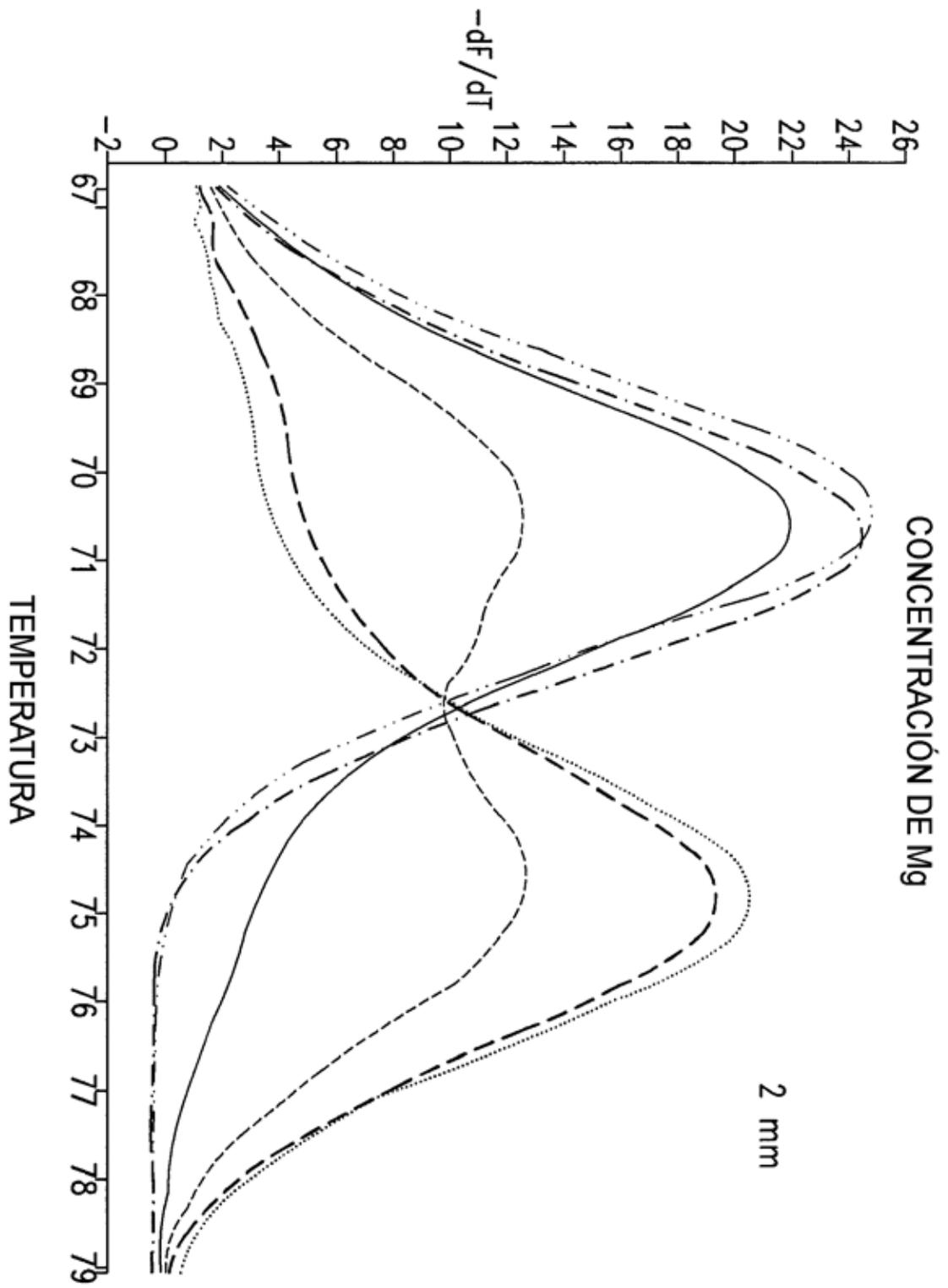


Fig. 18B

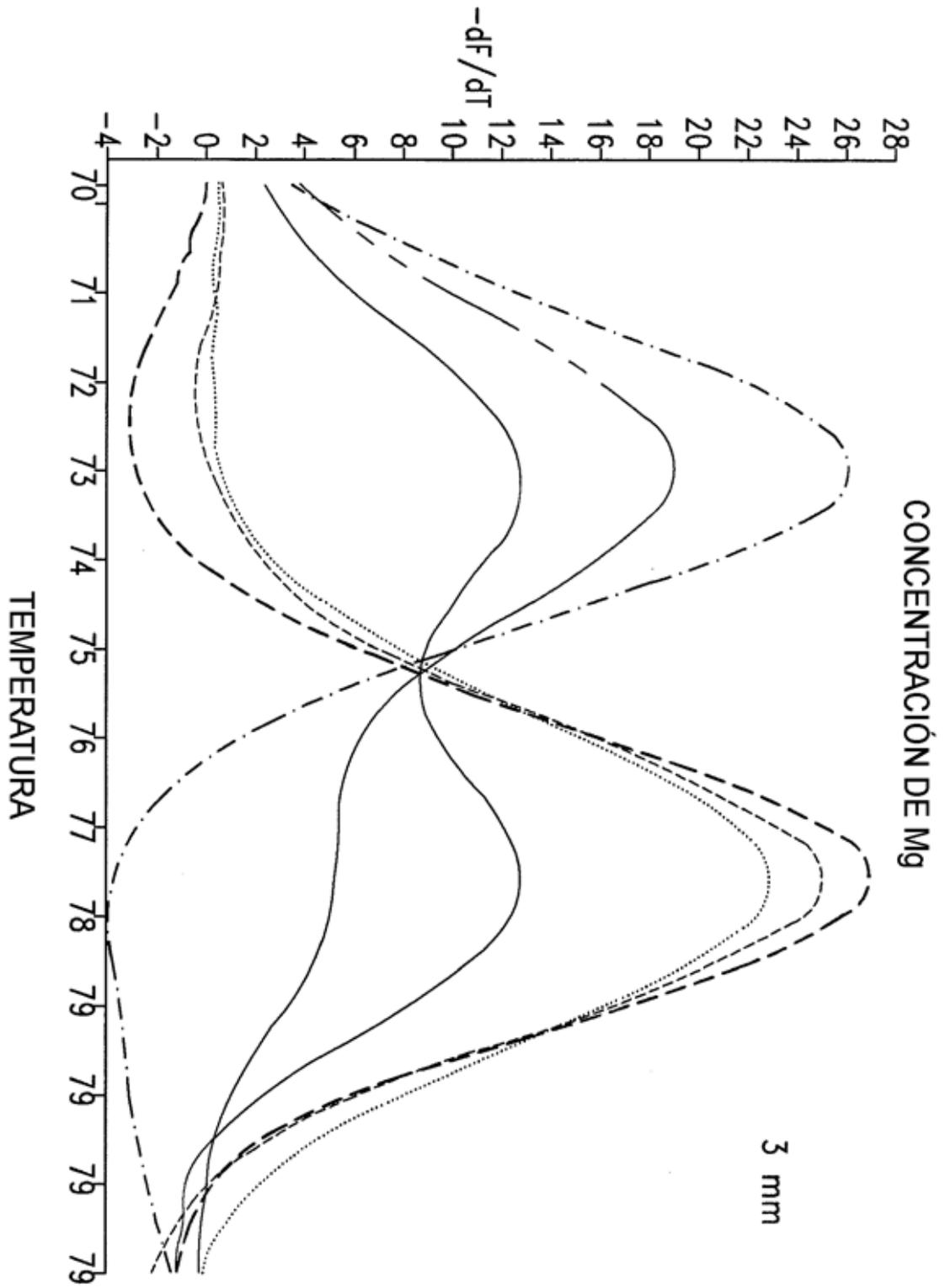


Fig. 18C

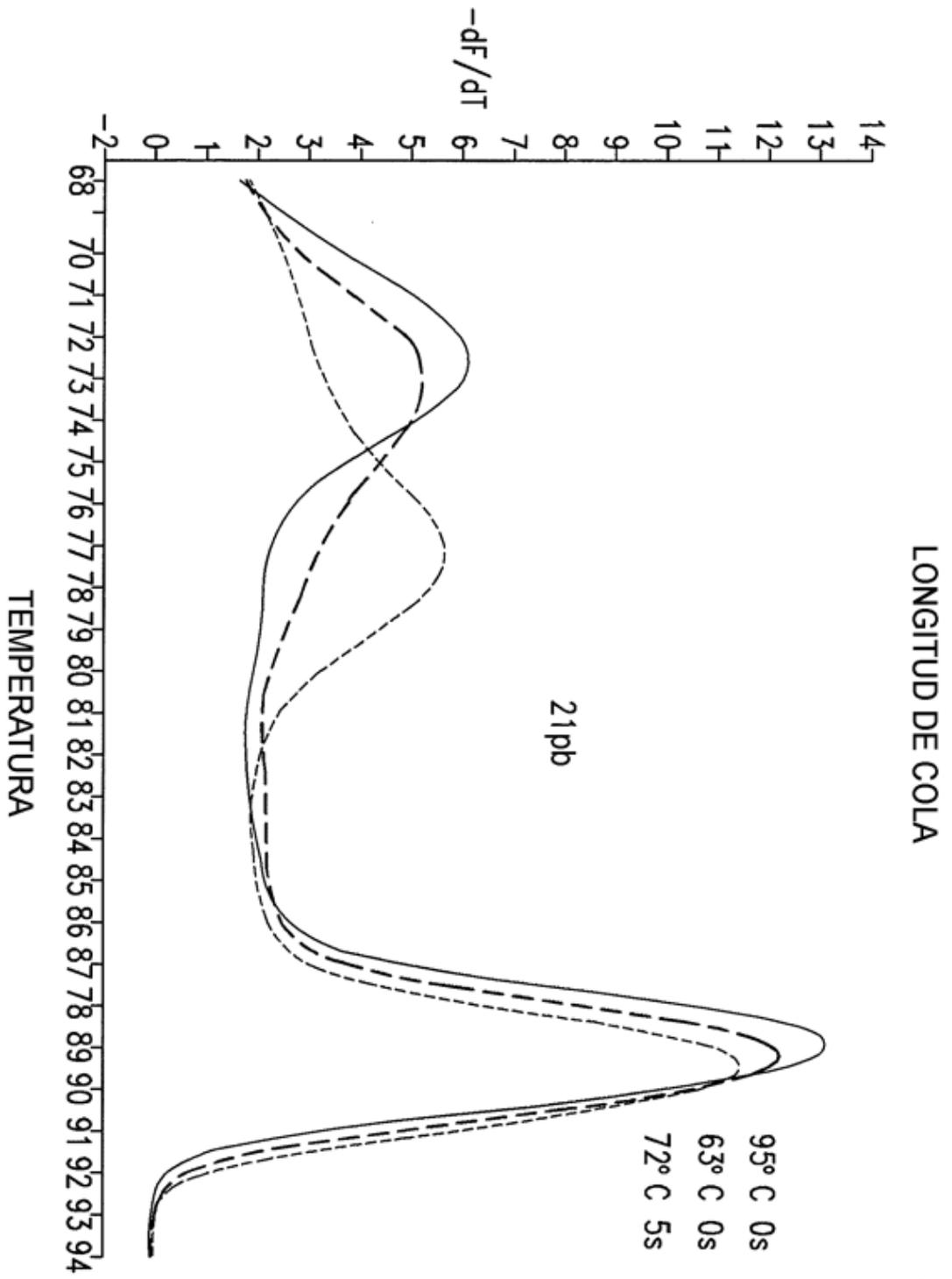


Fig. 19A

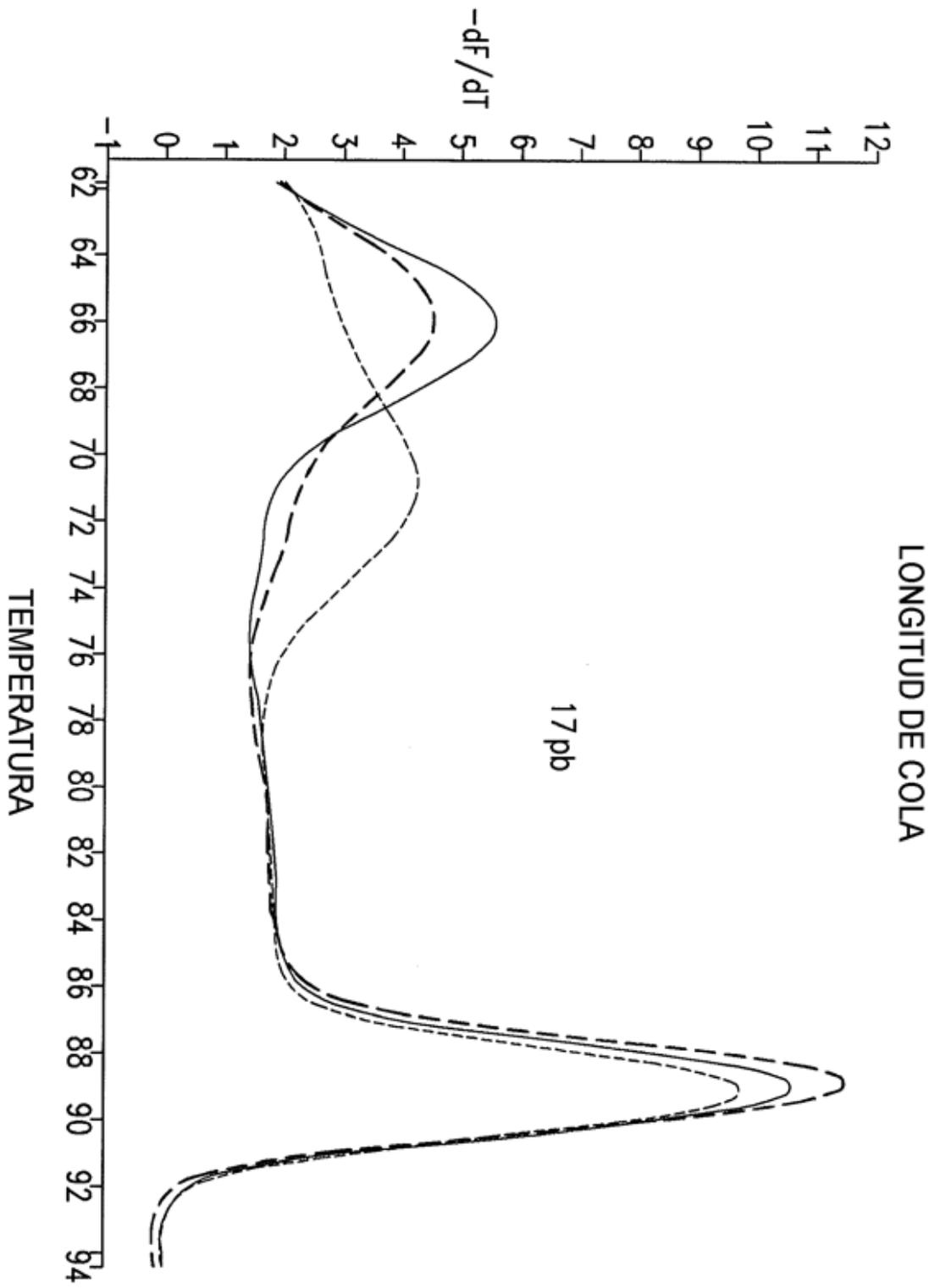


Fig. 19B

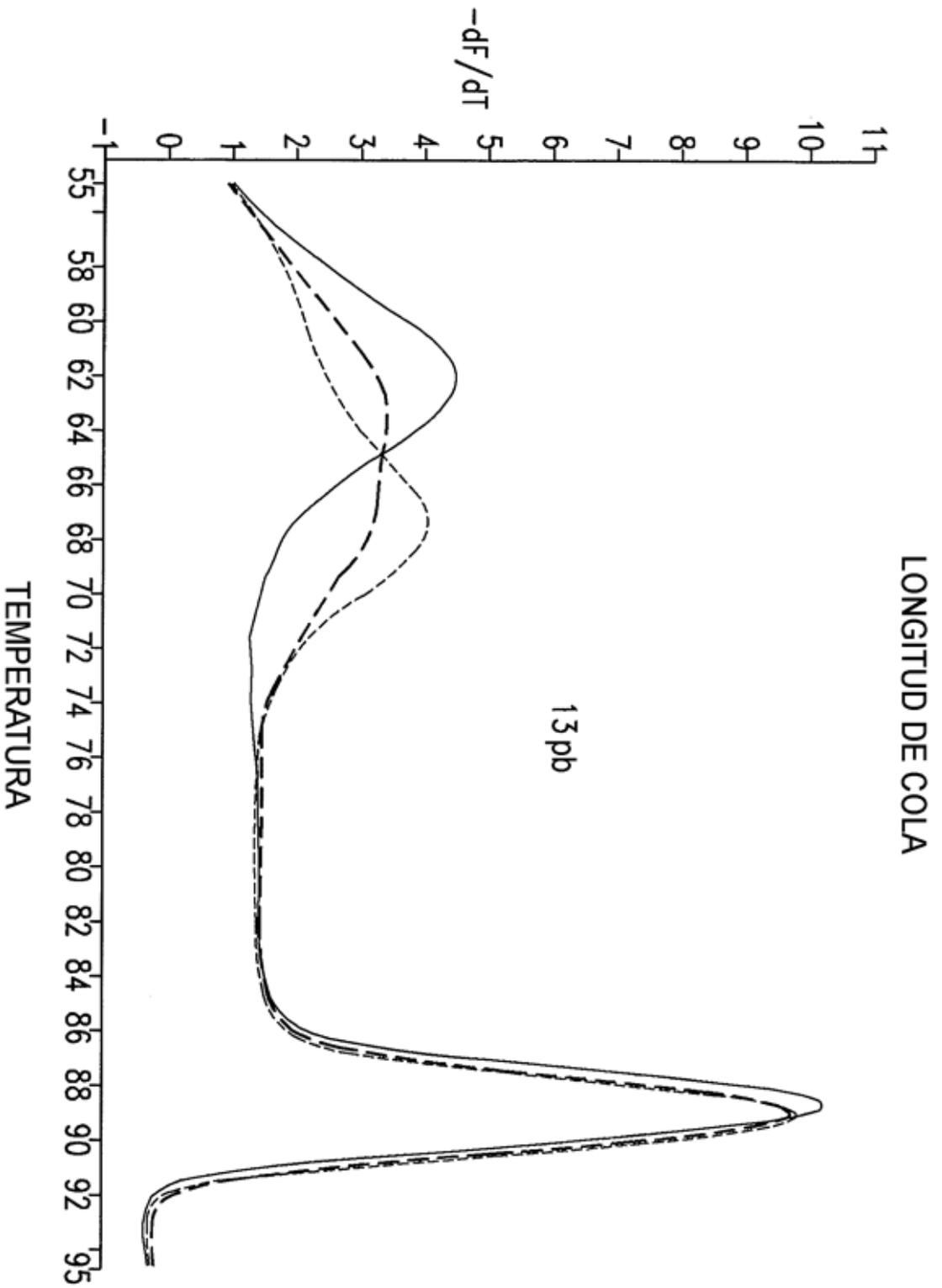


Fig. 19C

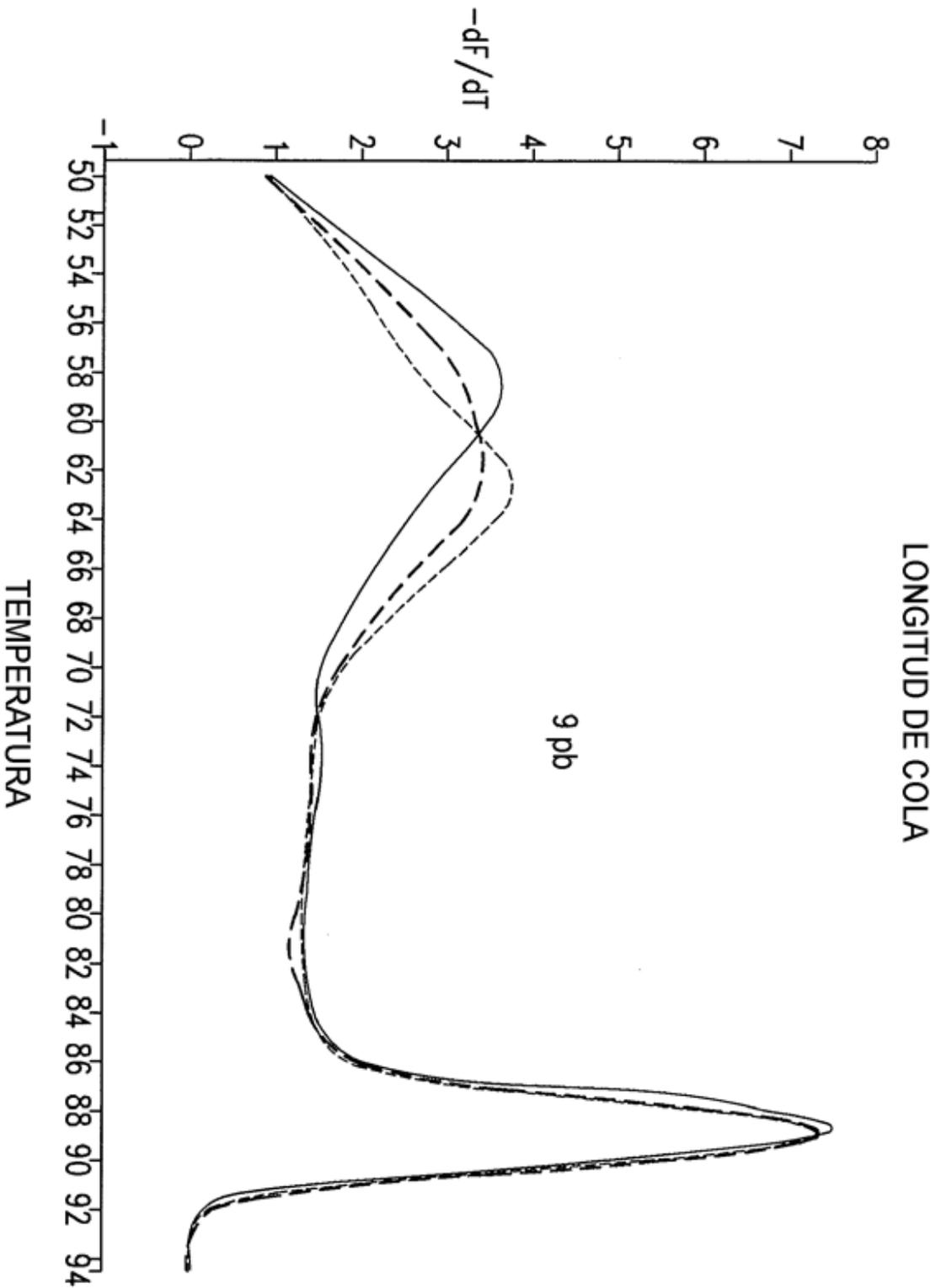


Fig. 19D

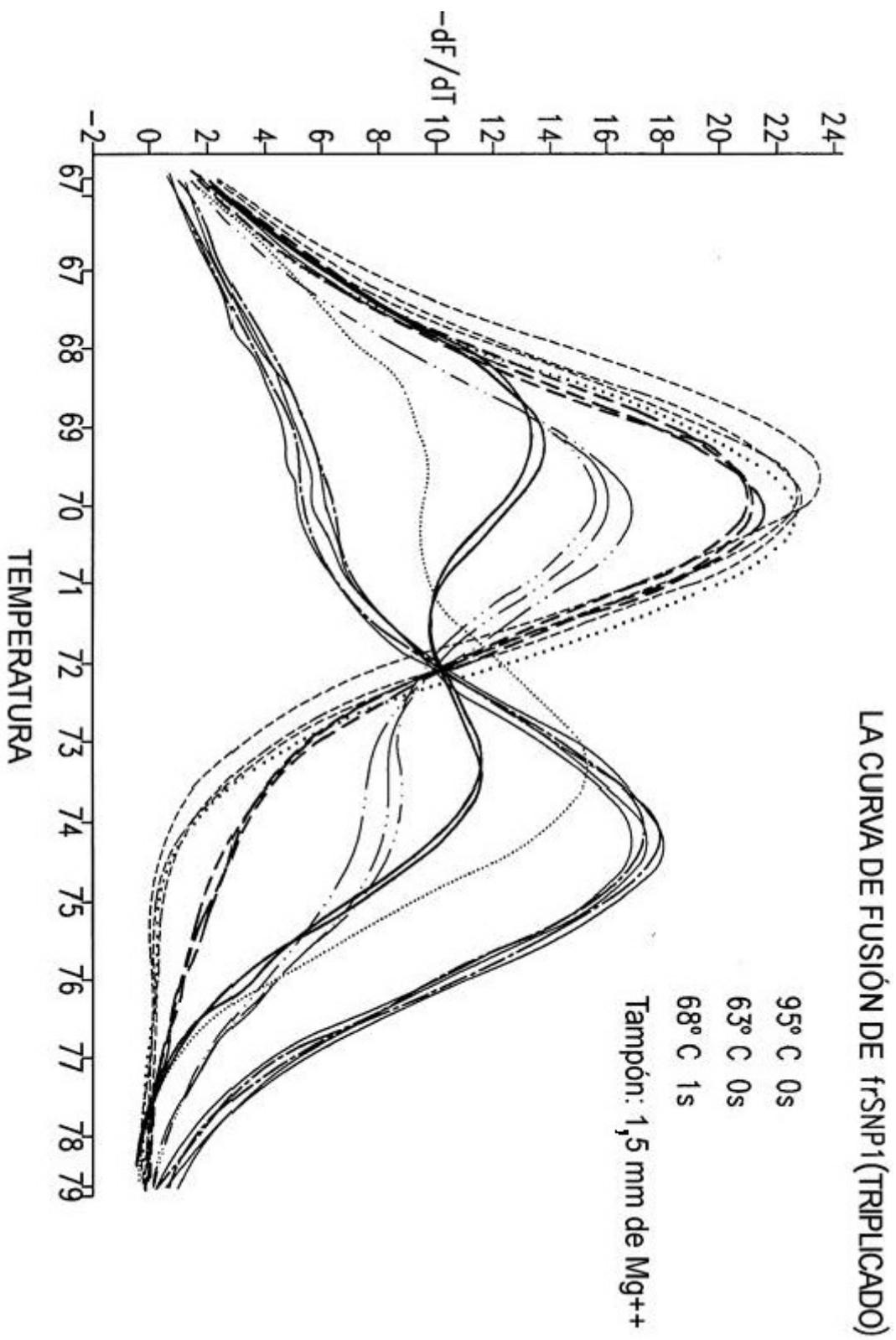


Fig. 20A

LA CURVA DE FUSIÓN DE t-SP1 (TRIPPLICADO)

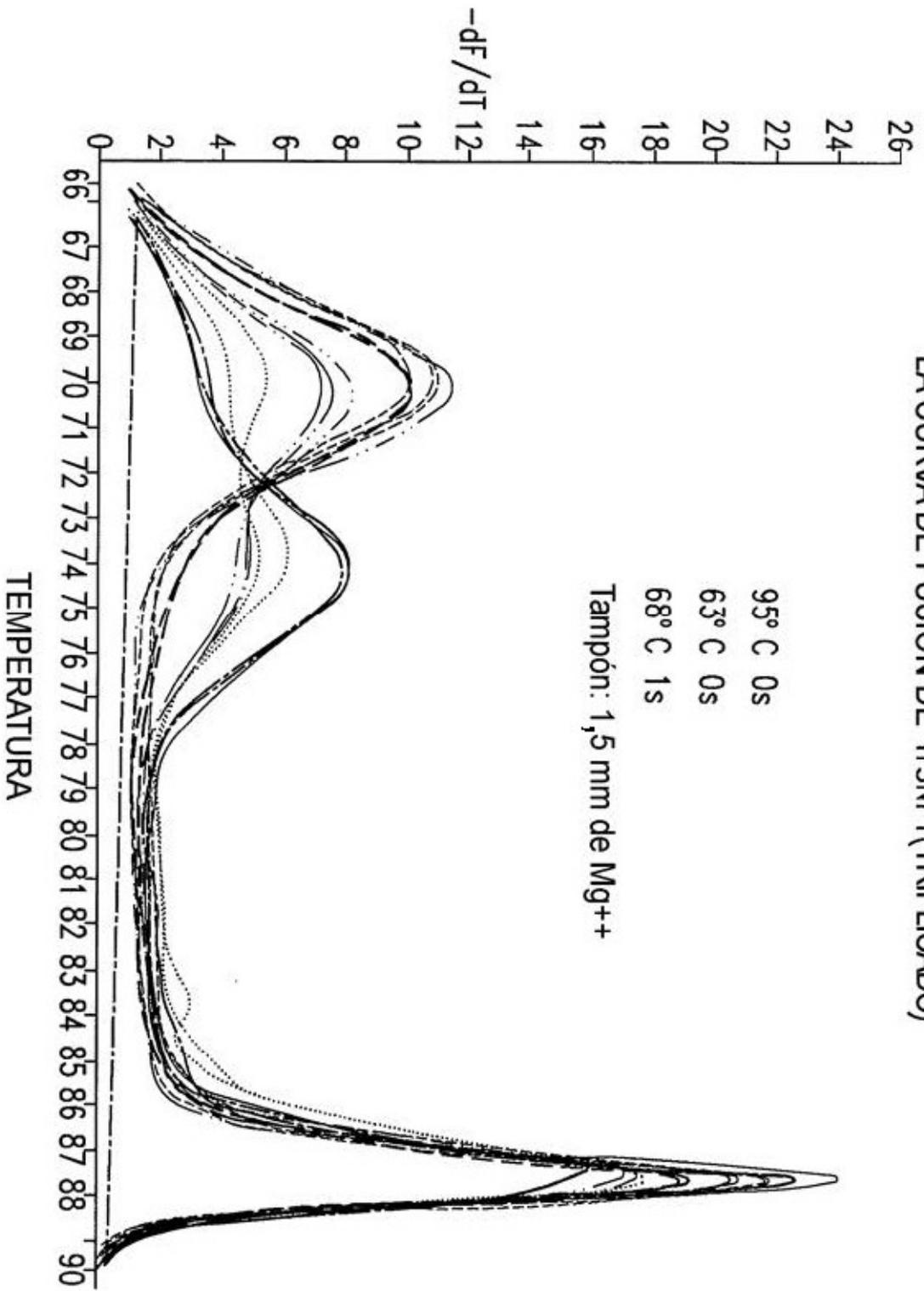


Fig. 20B

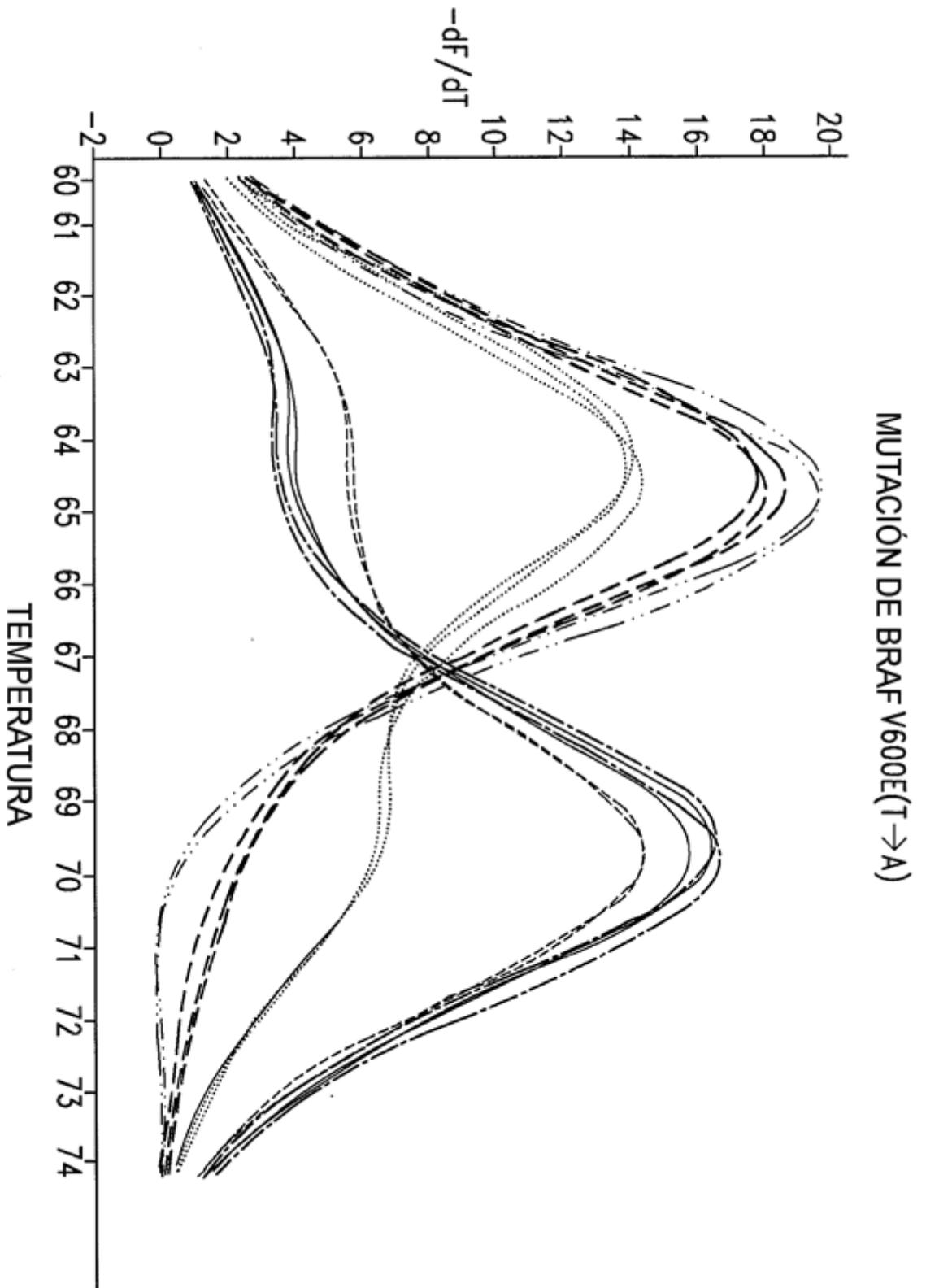


Fig. 21A

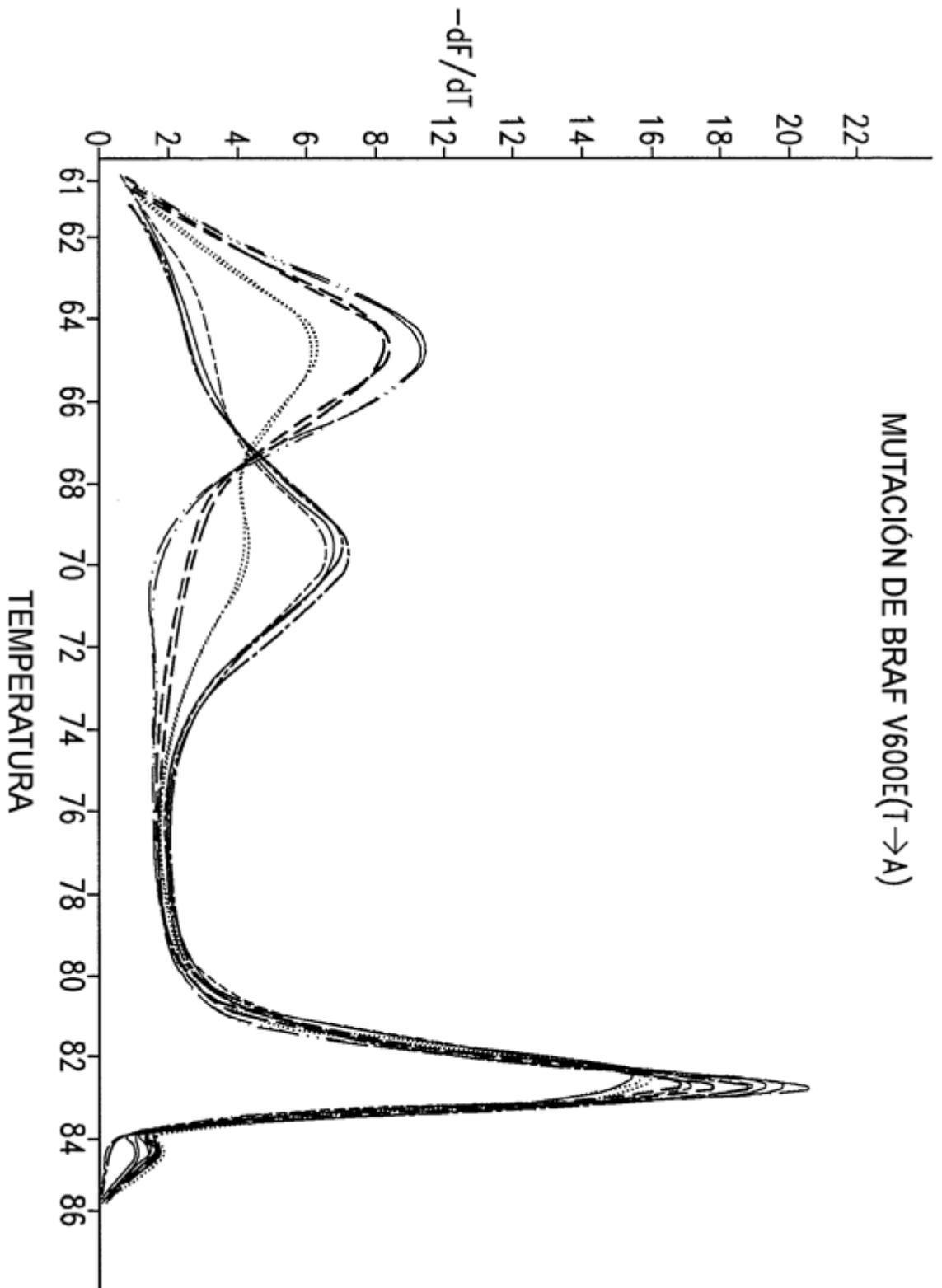


Fig. 21B

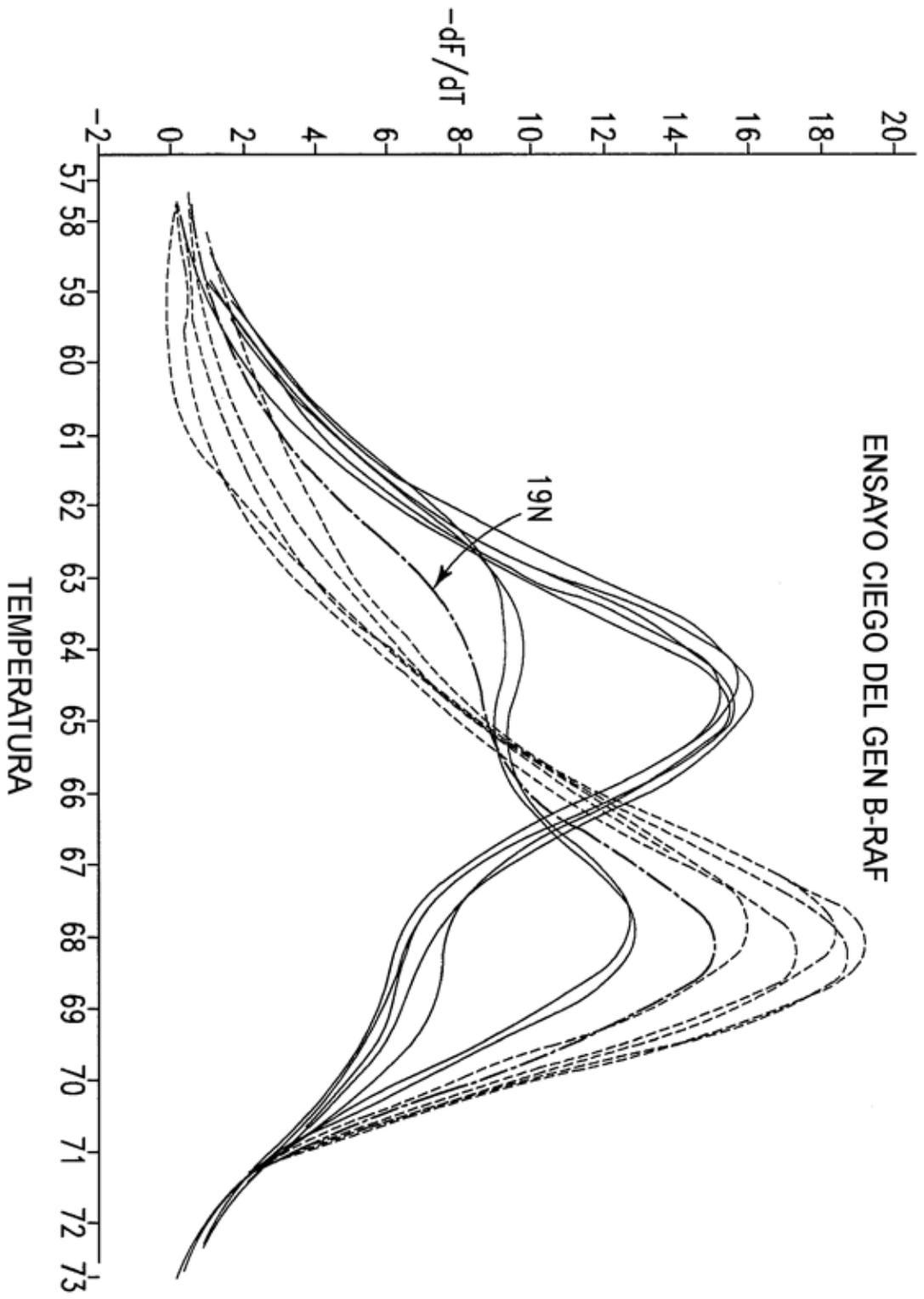


Fig. 22

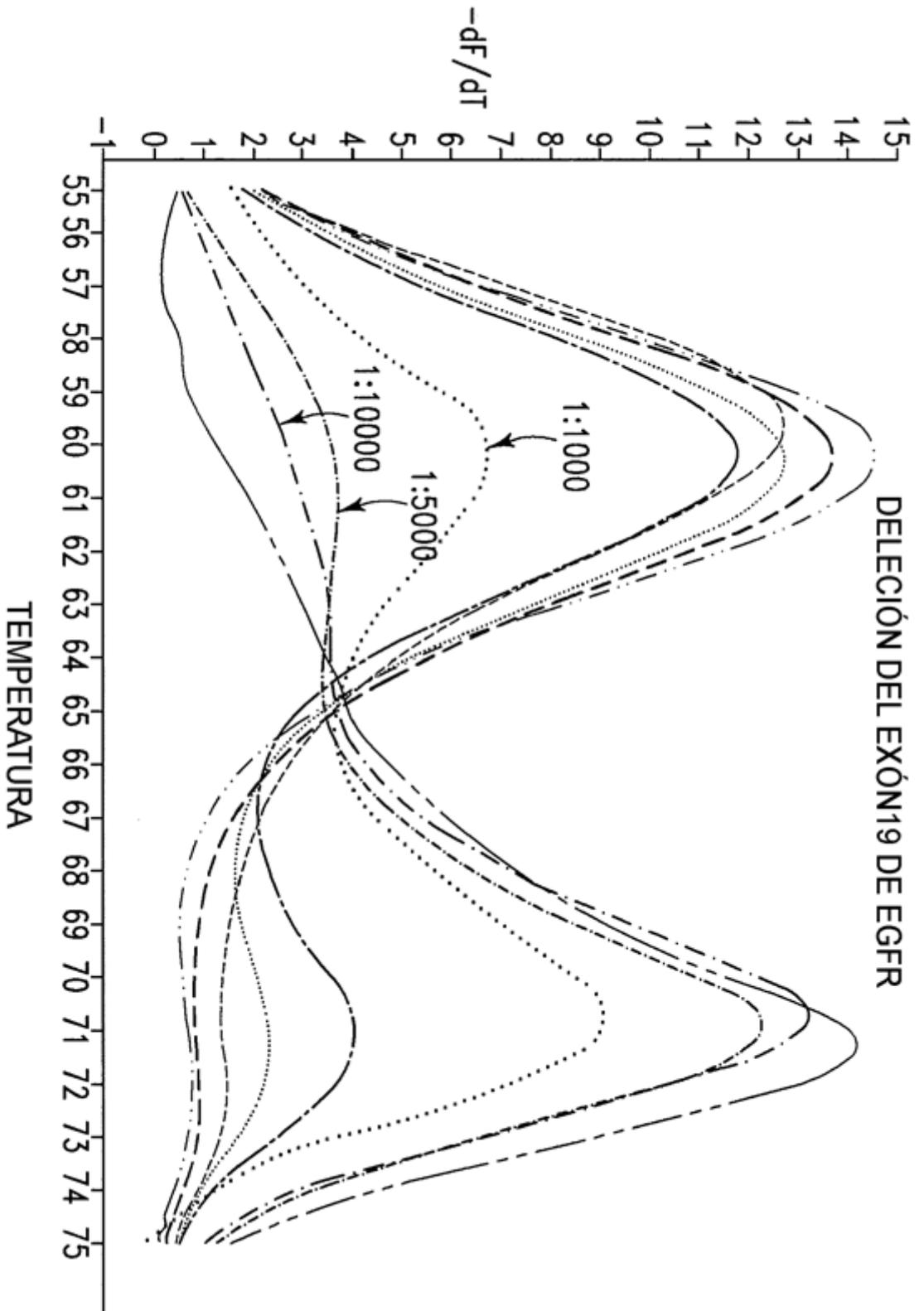


Fig. 23

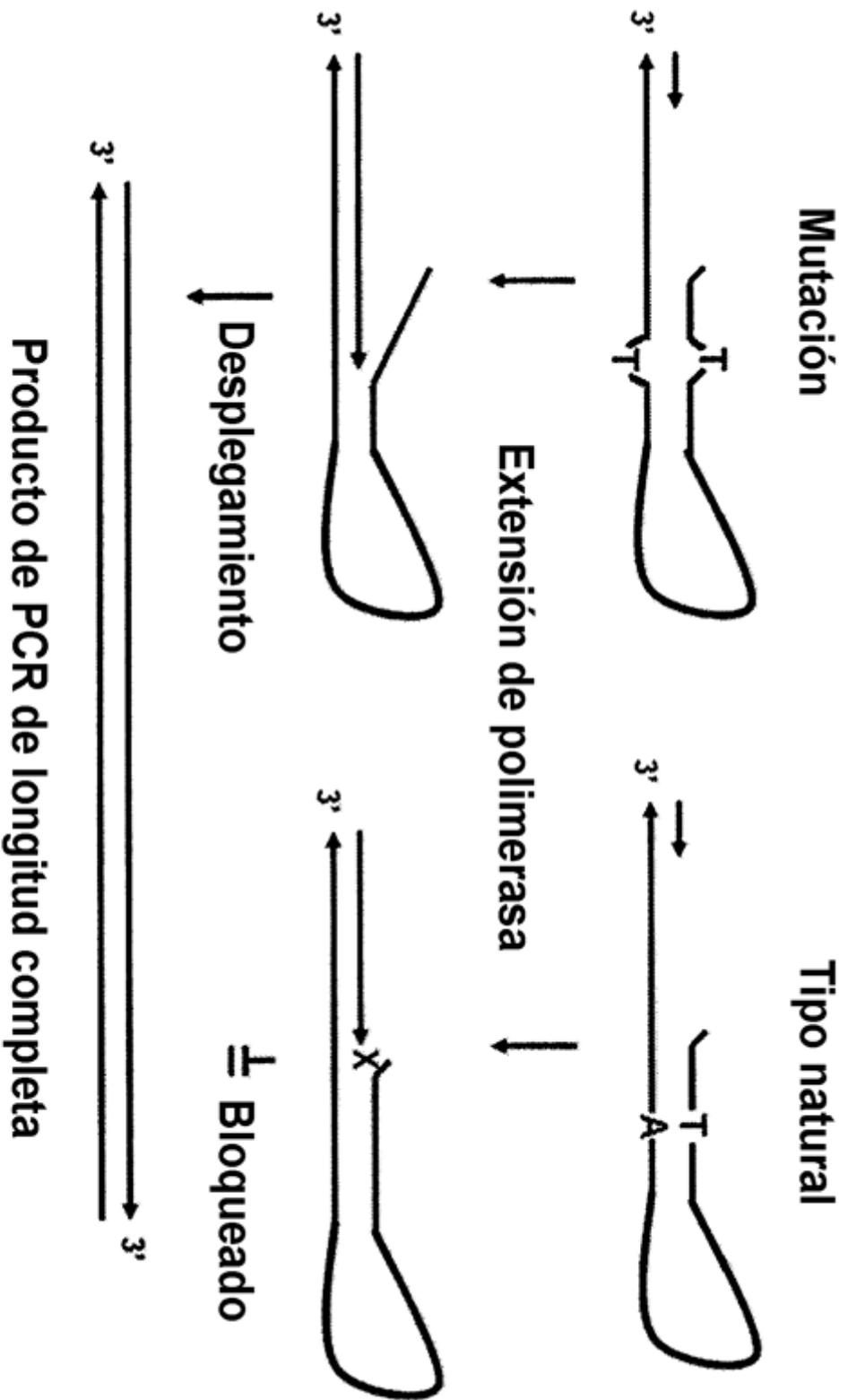


Fig. 25

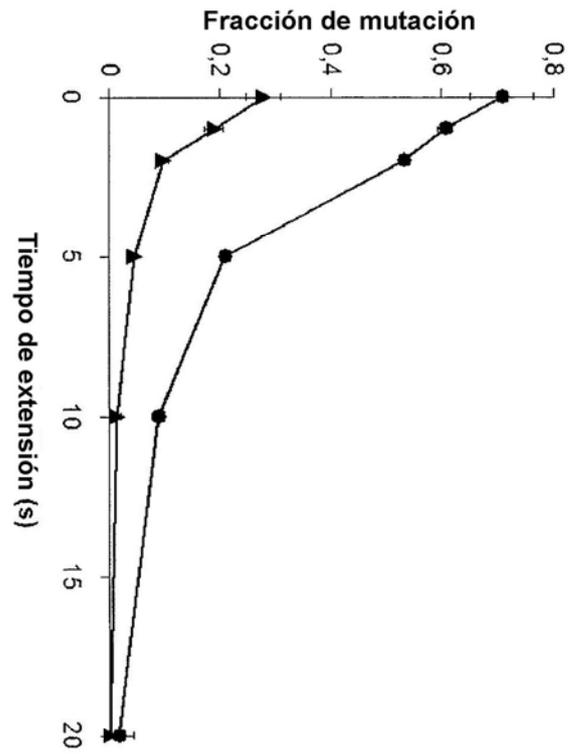


Fig. 26a

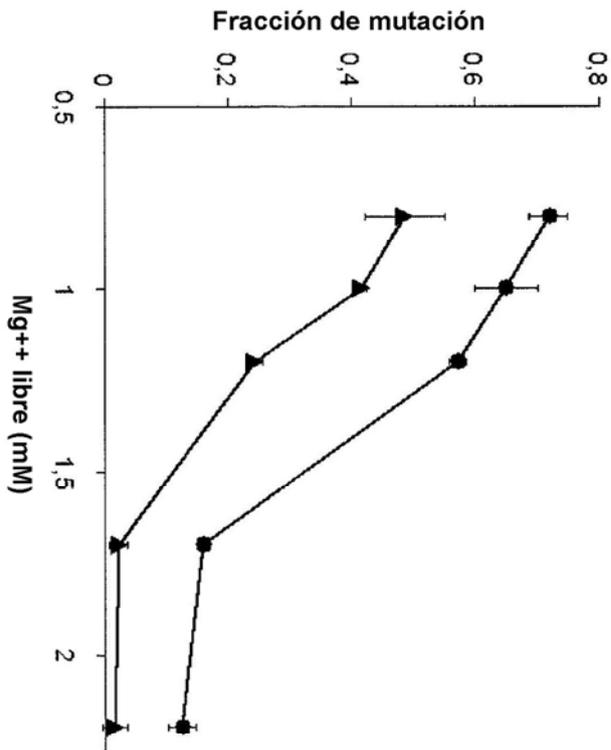


Fig. 26b

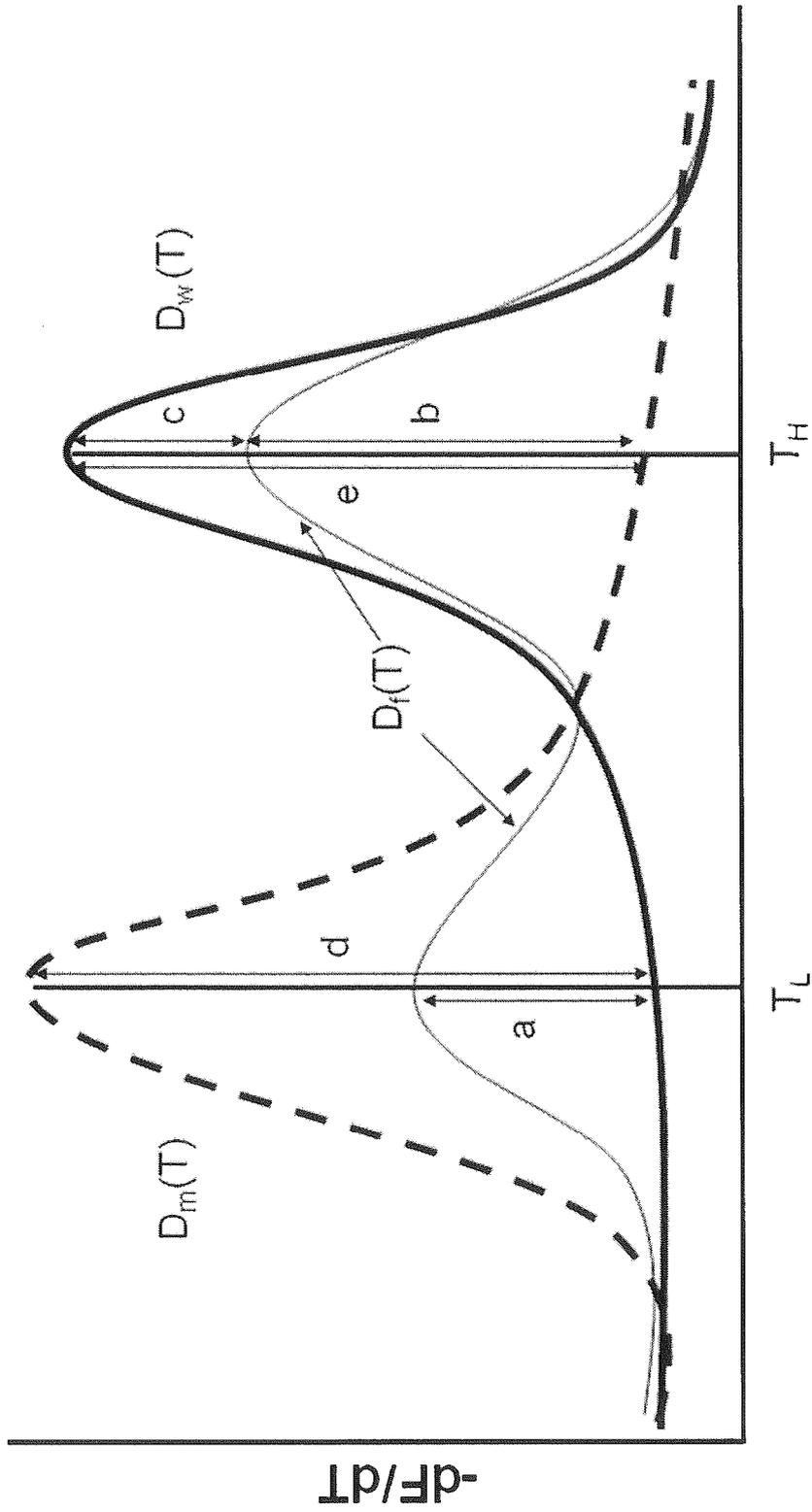


Fig. 24