

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 551**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/686 (2008.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2016** **PCT/EP2016/061121**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2016** **WO16184902**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2016** **E 16723135 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019** **EP 3298162**

54 Título: **Detección de un ácido nucleico diana y variantes**

30 Prioridad:

18.05.2015 SE 1550629

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.07.2020

73 Titular/es:

SAGA DIAGNOSTICS AB (100.0%)
Scheelevägen 2, MV-406
223 81 Lund, SE

72 Inventor/es:

SAAL, LAO HAYAMIZU y
GEORGE, ANTHONY MILES

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 775 551 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

Detección de un ácido nucleico diana y variantes

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de los métodos para la detección de ácidos nucleicos. Los métodos de la invención son sumamente sensibles y específicos y, por lo tanto, son útiles, por ejemplo, para la detección de mutaciones raras, o para la detección de variantes de baja abundancia en secuencias de ácidos nucleicos.

Antecedentes de la invención

10 La detección de ácidos nucleicos presentes en cantidades muy bajas y/o a baja frecuencia es deseable para muchas aplicaciones. La detección de mutaciones genéticas es importante, por ejemplo, para una gran cantidad de enfermedades, tales como la fibrosis quística, la anemia de células falciformes y el cáncer. Se reconoce cada vez más que son necesarios métodos excepcionalmente sensibles y específicos para la detección de mutaciones, en particular para muestras de bajo aporte tales como el ADN tumoral circulante (ADNtc) y el análisis de células individuales. Los métodos convencionales actuales pueden adolecer de una serie de problemas, incluidos un elevado requerimiento en cuanto a la cantidad de ADN de la muestra de entrada, un elevado costo por muestra, flujos de trabajo complejos y laboriosos, una sensibilidad y/o especificidad insuficientes, y la falta de capacidad para detectar secuencias de ADN mutadas de baja abundancia dentro de un fondo elevado de secuencias de tipo silvestre normales (la denominada "fracción de alelo mutante" (MAF)). Casi todos los métodos para la detección de mutaciones se basan en la amplificación del ADN mediante la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para copiar, de forma exponencial, las regiones de ADN diana de interés utilizando una enzima de ADN polimerasa.

25 Cuando el objetivo es el de discriminar entre una secuencia de tipo silvestre normal y una secuencia variante (mutante) que puede presentar una diferencia tan pequeña como una única base de nucleótidos, la fidelidad de la enzima de ADN polimerasa puede convertirse en una limitación significativa a la capacidad de discriminar (lo que afecta a la mayoría de las medidas del rendimiento de la detección de mutaciones). Cada enzima polimerasa tiene alguna tasa de error de incorporación de base para cada cambio de base incorrecta posible, normalmente en el intervalo de 0,5 a 300 errores por millón de pares de bases amplificados (es decir, de 5×10^{-7} a 3×10^{-4}). Para muchas aplicaciones, estos errores en la incorporación de base de polimerasa de una sola base son tolerables. Por ejemplo, si se dispone de grandes cantidades de ADN y la MAF es de moderado a alto, por ejemplo, > 10 -20%, una PCR ordinaria puede ser suficiente. Sin embargo, en aplicaciones que implican la detección de variantes de baja abundancia, existe una necesidad de métodos de detección ultrasensibles para que una mutación verdaderamente positiva pueda ser discriminada con respecto a un falso positivo inducido por un error de la polimerasa. Los ensayos actuales para la detección de mutaciones tienen límites de detección del 10-20% de MAF (secuenciación de Sanger), del 5-10% de la MAF (pirosecuenciación), del 1-5% de MAF (secuenciación de próxima generación) y del 0,1% de MAF (PCR digital, COLD-PCR, secuenciación ultraprofunda de próxima generación).

40 La PCR digital es un método que divide una reacción de PCR en muchas reacciones individuales más pequeñas de modo que cada división de reacción contiene de cero a solo unas pocas moléculas de secuencia diana. La división de todas las moléculas es aleatoria y sigue una distribución de Poisson. La división transforma la situación de una abundancia relativa extremadamente baja de una secuencia variante rara entre una abundancia de secuencias de tipo silvestre, a una situación en la que la mayoría de las divisiones tienen solamente secuencias de tipo silvestre y algunas divisiones tienen una abundancia relativa muy elevada de la secuencia variante rara en comparación con la secuencia de tipo silvestre. El resultado es un aumento en la sensibilidad para la detección de secuencias variantes raras debido a la dilución de la secuencia de tipo silvestre dentro de cada división. Sin embargo, el error de la polimerasa sigue siendo un problema importante incluso para la PCR digital que puede conducir a falsos positivos, lo que afecta negativamente el rendimiento discriminatorio y los límites de detección.

55 Se han descrito diferentes métodos basados en PCR para el enriquecimiento y la detección de alelos y mutaciones minoritarios, por ejemplo, por Milbury *et al.*, Clin Chem. 2009 Abr.; 55 (4): 632-640, sin embargo, ninguno de estos métodos es extremadamente sensible y de una implementación fácil.

El documento US 2012 describe métodos para analizar muestras de alto título que no se pueden dividir en un número suficiente de divisiones que contienen cero moléculas de ácido nucleico por división para permitir el análisis de Poisson (análisis de PCR digital).

Sumario de la invención

60 Por lo tanto, existe una necesidad insatisfecha de métodos extremadamente sensibles para detectar ácidos nucleicos de baja abundancia con una frecuencia muy baja de falsos positivos.

65 Los inventores encontraron que en los métodos que emplean la PCR estándar, las tasas de error de la ADN polimerasa crean una barrera de rendimiento hasta el límite de detección, debido a que como el ADN se amplifica

exponencialmente a números en los miles de millones de copias, se introducen errores de forma aleatoria en muchas copias de ADN, que incluyen la generación falsa de variantes de secuencia de interés, y estos errores se copian y amplifican.

5 La máxima sensibilidad alcanzable en un ensayo de PCR digital estándar también está limitada por la fidelidad de la enzima polimerasa utilizada en la reacción. Cuando una secuencia de tipo silvestre es copiada incorrectamente por la polimerasa, esto puede crear una copia portadora de una secuencia mutante falsa, y una reacción de este puede ser leída como positiva para la secuencia diana mutante. En función de cuántos ciclos de PCR se realizan y de con qué ciclo se introduce la secuencia mutante falsa, la señal puede ser indistinguible de la de un verdadero positivo y, por lo tanto, se leerá como un falso positivo. Si este evento de error de la polimerasa ocurre durante un ciclo de PCR tardío, las señales verdaderas positivas ya habrán ganado una "ventaja inicial" con respecto a las potenciales señales falsas positivas y puede haber una posibilidad de distinguir entre los verdaderos positivos y los falsos positivos.

15 Los métodos de la invención proporcionan de manera confiable a las reacciones verdaderas positivas una ventaja constante en su señal con respecto a las potenciales reacciones falsamente positivas.

Por lo tanto, la invención proporciona un método que es capaz de contrarrestar las consecuencias de los errores de la polimerasa para incrementar el rendimiento del ensayo en por lo menos un orden de magnitud. Los métodos de la invención permiten obtener una sensibilidad y especificidad sumamente elevadas, presentan un flujo de trabajo simple y son relativamente económicos.

25 La presente invención proporciona métodos extremadamente sensibles para detectar ácidos nucleicos de baja abundancia con una frecuencia muy baja de falsos positivos. Los métodos de la invención consisten en términos generales en una etapa de reacción de polimerasa incremental asimétrica (AIPR) en la que se utiliza una elevada temperatura de hibridación, seguida por una etapa de PCR simétrica más convencional en la que se utiliza una temperatura de hibridación más baja, ambas llevadas a cabo dentro de reacciones divididas tales como PCR digital en gotas (droplet digital PCR).

30 Los métodos para amplificar ácidos nucleicos usando ensayos basados en PCR con cebadores de diferentes temperaturas de fusión (T_m) son conocidos en la técnica. El documento WO2006/094360, por ejemplo, describe una única PCR de tubo cerrado, en la que se realizan dos PCR simétricas secuenciales. En una primera ronda, un ácido nucleico en un locus de interés se amplifica específicamente usando cebadores específicos para locus rotulados adecuados para realizar una PCR exhaustiva. En una segunda ronda, el producto de la amplificación de la primera ronda se amplifica seguidamente utilizando cebadores de rótulo que tienen una T_m más baja que los cebadores específicos para locus rotulados.

40 Debido a la elevada sensibilidad y especificidad, los métodos de la invención son útiles para la detección de secuencias de ácidos nucleicos de baja abundancia. En particular, los métodos son útiles para la detección de variantes raras de una sola base entre un alelo de tipo silvestre sumamente abundante, e incluso son útiles cuando la cantidad aportada de la muestra total es baja, como puede ser el caso de un ADN tumoral circulante (ADNtc) en plasma sanguíneo de un paciente.

45 En general, los métodos de la invención consisten en una etapa de reacción de polimerasa asimétrica incremental (AIPR) seguida por una etapa de PCR simétrica más convencional. En la etapa de AIPR, en general, solo se copia una cadena de la secuencia de ácido nucleico diana, lo que da lugar a una pluralidad de moldes para la PCR simétrica convencional. Por lo tanto, mientras que en principio una PCR convencional es una amplificación exponencial, entonces en principio la AIPR es una amplificación lineal. Para la amplificación de cualquier secuencia diana dada de interés, se diseñan al menos dos cebadores que flanquean la secuencia de interés de modo que uno de los cebadores (denominado en la presente como "cebador H") tenga una temperatura de fusión muy elevada (T_m) y el otro cebador en la cadena y orientación opuestas, tiene una T_m mucho más baja ("cebador L"). Las dos etapas (AIPR y PCR) difieren en sus condiciones de termociclado y en los cebadores que son funcionalmente activos durante cada etapa.

55 En la etapa de la AIPR, la secuencia diana monocatenaria es copiada por la polimerasa que se ceba usando el oligonucleótido cebador H complementario a un extremo de la secuencia diana de interés y solamente una copia única (por ejemplo, la secuencia complementaria al molde) es sintetizada por el ciclado térmico. Esto se logra generalmente mediante ciclado térmico a: 1) una temperatura para desnaturalizar el ADN en moléculas monocatenarias; 2) a una temperatura que es permisible para la alienación del cebador H para cebar el copiado monodireccional de la secuencia diana de interés por una ADN polimerasa, pero la temperatura no permisible para la alienación del cebador L; 3) a una temperatura para permitir la extensión de la cadena sintetizada mediante una ADN polimerasa, pero a la que el cebador L todavía no puede alienarse; 4) repetir las etapas 1 a 3 en ciclos repetidos según sea necesario, con una copia complementaria adicional sintetizada por ciclo que se ceba y se extiende desde el cebador H. La copia sintetizada es el complemento de Watson-Crick de la secuencia monocatenaria a la que se alinea el cebador H y, por lo tanto, cada copia sintetizada no se convierte en un molde para amplificación adicional durante ningún ciclo térmico de la etapa de la AIPR. De varias a realmente numerosas

rondas de AIPR que copian solamente en una sola dirección se llevan a cabo mediante ciclado como arriba indicado de las condiciones térmicas en donde solo el cebador H monodireccional es capaz de alinearse y de extenderse de manera de sintetizar una cadena de ácido nucleico. Por lo tanto, a partir de cada molde monocatenaria original y para cada ciclo térmico, se genera una única secuencia diana complementaria de manera que, por ejemplo, después de que se ejecute un número X de ciclos asimétricos, habrá X nuevas moléculas de ADN complementarias al final de la etapa para cada número Y de moléculas de molde de partida monocatenarias en la división (el número total de nuevas moléculas de ADN complementarias en la división de reacción será, por lo tanto, $X \cdot Y$). Por ejemplo, después de 64 ciclos con solamente un molde diana monocatenaria en la división de reacción, habrá 1 molde monocatenario más $1 \cdot 64 = 64$ copias complementarias en la división. Con una probabilidad muy elevada, la gran mayoría de estas nuevas moléculas será una copia complementaria exacta de la molécula molde original, ya que la tasa de error de la polimerasa es baja (se amplifican de 0,5 a 300 errores por millón de pares de bases) y, por ejemplo, solamente se sintetizan 64 copias de varias docenas a varios miles de pares de longitud cada una. Incluso en el caso de que se produjera un error de la polimerasa durante uno de estos ciclos de la AIPR en una división de reacción que contenía solo 1 molécula de secuencia diana de tipo silvestre y 0 secuencias diana mutantes para empezar, de las 64 moléculas de ADN nuevas, solamente 1 sería mutante entre las 63 no mutantes. Esta secuencia diana mutante inducida por error sería potencialmente problemática si ocurriera en la posición de secuencia exacta de mayor interés, pero puede no ser problemática si ocurriera en otra posición. Por el contrario, en una división de reacción positiva verdadera que comenzó con 1 molécula mutante verdadera de secuencia diana y 0 dianas de tipo silvestre, habría 64 moléculas mutantes que contienen ADN nuevas, y de una manera sumamente rara, 63 moléculas que contienen mutantes nuevas y 1 molécula falsamente de tipo silvestre. Por lo tanto, en una reacción de PCR digital, las divisiones de reacción verdadero positivas tendrían de 62 a 64 moléculas diana mutantes adicionales que la división, que ocurre raramente, que ahora contiene una secuencia mutante falso positiva debido al error de polimerasa. Después de esta etapa de AIPR, comienza la etapa de PCR simétrica convencional y las divisiones de reacción positivas verdaderas tienen el equivalente de aproximadamente $\log_2(X)$ ciclos de "ventaja inicial" en términos de copias moleculares con respecto a las divisiones de reacción falso positivas. En otras palabras, en el ejemplo precedente con $X = 64$ ciclos asimétricos, las divisiones de reacción verdadero positivas tendrán aproximadamente $\log_2(64) = 6$ ciclos de ventaja inicial.

En un sistema de PCR digital que utiliza sondas fluorescentes desactivadas, complementarias a la secuencia diana de interés, que se alinea a su secuencia diana y cuyo fluoróforo se escinde y por lo tanto no se desactiva por la actividad de exonucleasa de una polimerasa, los fluoróforos liberados se acumulan en la división y aumentan su señal fluorescente. La PCR convencional se continúa hasta que la señal verdadera positiva sea discernible y la señal falso positiva todavía está rezagada en un número de ciclos. Se establece un umbral para separar las dos señales. También pueden utilizarse otros métodos para detectar el producto de la PCR convencional.

La Figura 1 proporciona una vista general del método de acuerdo con una forma de realización de la invención.

Una manera de lograr el copiado unidireccional de solo una cadena de molde durante la etapa asimétrica mientras se evita el copiado en la dirección opuesta (cadena opuesta) consiste en solo incluir un único cebador durante la etapa de AIPR y agregar el segundo cebador al comienzo de la etapa de PCR simétrica. Sin embargo, la mayoría de los métodos de PCR digital basados en divisiones, no permiten actualmente la adición de reactivos una vez que se ha producido la división; por ejemplo, es difícil agregar reactivos a las gotas de reacción en la PCR digital en gotas (ddPCR).

Una divulgación proporciona un método para el diseño de un ensayo que produce cebadores que permiten la AIPR con ambos cebadores presentes en la reacción, por medio de la utilización de pares de cebadores con temperaturas de fusión muy diferentes. Se diseña un cebador de elevada T_m (cebador H) para una cadena al final de la secuencia diana de interés y se diseña un cebador de baja T_m (cebador L) para la otra cadena en el otro extremo de la secuencia diana de interés. Los métodos también incluyen medios para detectar alelos específicos. Dichos medios pueden ser, por ejemplo, sondas específicas para alelos, posicionadas sobre una base variante. La etapa de la AIPR se ejecuta a una temperatura muy elevada en la que el cebador H de elevada T_m es capaz de alinearse eficazmente y el cebador L de baja T_m no lo es. La etapa de PCR simétrica convencional se ejecuta a una temperatura más baja que el cebador L de baja T_m y el cebador H de elevada T_m puede unirse de manera eficiente a moldes específicos. Si el sistema utiliza sondas específicas para alelos, entonces éstas están diseñadas preferentemente para que se unan a la temperatura de alineación más baja o cerca de ella. La T_m de los cebadores, y por lo tanto, la actividad durante las dos etapas, puede manipularse mediante la longitud del cebador, introducción de no apareamiento de secuencia diseñadas en el cebador y/o mediante modificaciones del cebador (por ejemplo, mediante el uso de nucleótidos variantes, tales como bases de ácido nucleico bloqueadas [ANB], u otras modificaciones de oligonucleótidos tales como la adición de un aglutinante de surco menor [MGB]). Es crítico que la actividad del cebador L se suprima durante la etapa de AIPR asimétrica porque siempre que se produce la unión y extensión del cebador de baja T_m , se produce una copia simétrica de ambas cadenas, lo que aumenta el sustrato para potenciales errores de polimerasa que luego se propagarán durante cada ciclo subsiguiente. Debido a esto, el diseño de ensayo preferido en términos de evitación de falsos positivos es uno en el que la diferencia entre la temperatura de hibridación de la etapa asimétrica y la temperatura de fusión del cebador de baja T_m es elevada.

La invención se define por las reivindicaciones y proporciona un método para la detección de la presencia de una

secuencia de ácidos nucleicos diana o detección de la presencia de una secuencia variante en una secuencia de ácidos nucleicos diana en una muestra que comprende las etapas de

- a) proporcionar una muestra que comprende ácidos nucleicos de molde
- 5 b) proporcionar un conjunto de cebadores que comprende al menos un par de cebadores específicamente capaces de amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana, en donde el conjunto de cebadores al menos comprende un cebador H y un cebador L, en donde la temperatura de fusión de cebador H es al menos 16 °C mayor que la temperatura de fusión del cebador L y en donde el cebador L contiene una secuencia complementaria de un fragmento del producto de elongación de cebador H,
- 10 c) proporcionar una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad de polimerasa a una temperatura de elongación,
- d) preparar reacciones de PCR divididas que comprenden cada una de ellas una parte de la muestra, el conjunto de cebadores, la polimerasa de ácido nucleico, reactivos de PCR y opcionalmente reactivos de detección
- e) llevar a cabo una reacción de polimerasa incremental asimétrica (AIPR) que comprende las etapas de:
 - 15 i. incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de la desnaturalización, lo que desnaturaliza así el ADN en moléculas monocatenarias
 - ii. incubar las reacciones de PCR divididas a una elevada temperatura de hibridación que permite la hibridación del cebador H, pero no del cebador L,
 - 20 iii. opcionalmente incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de elongación,
 - iv. opcionalmente repetir las etapas i a iii,
 - v. amplificar así solo una cadena de la secuencia de ácidos nucleicos diana
- f) llevar a cabo una reacción de cadena de la polimerasa (PCR) que comprende las etapas de:
 - 25 1) incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de la desnaturalización, lo que desnaturaliza así el ADN en moléculas monocatenarias
 - 2) incubar la PCR a una baja temperatura de hibridación que permite la hibridación tanto del cebador H como del cebador L,
 - 30 3) incubar la PCR a la temperatura de elongación lo que permite así la extensión de los cebadores alineados
 - 4) opcionalmente repetir las etapas II a IV,
 - 5) amplificar así ambas cadenas de la secuencia de ácidos nucleicos diana para obtener un producto de PCR
- 35 g) detectar si el producto de PCR comprende la secuencia de ácidos nucleicos diana o la secuencia variante en la secuencia de ácidos nucleicos diana.

La invención también proporciona un kit de partes que comprende:

- 40 a) un conjunto de cebadores que comprende al menos un par de cebadores específicamente capaces de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana, en donde el conjunto de cebadores comprende al menos un cebador H y un cebador L, en donde la temperatura de fusión del cebador H es al menos 16 °C mayor que la temperatura de fusión del cebador L, y en donde el cebador L contiene una secuencia complementaria al producto de elongación del cebador H.
- 45 b) una sonda de detección que es capaz de hibridar con la secuencia de ácido nucleico diana, estando dicha sonda unida a al menos un fluoróforo y al menos un desactivador
- c) una polimerasa de ácido nucleico;
- d) reactivos de PCR;
- 50 e) reactivos para preparar gotas que contienen reacciones de PCR divididas.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una vista general de un método de IBSAFE. La Figura 1A muestra la situación en la que está presente un molde mutante. Durante la etapa de la AIPR, se generan copias complementarias de la secuencia mutante. La temperatura se mantiene suficientemente elevada para que el cebador L y las sondas no se alineen. En la etapa simétrica, el ADN mutante se amplifica exponencialmente. La Figura 1B muestra la situación en la que está presente un molde de tipo silvestre, pero se produce un error de polimerasa. Durante la etapa de la AIPR se generan varias copias de la secuencia de tipo silvestre, pero solo una copia de la secuencia mutante errónea. La temperatura se mantiene suficientemente elevada para que el cebador L y las sondas no se alineen. En la etapa simétrica, tanto el ADN de tipo silvestre como el ADN mutante erróneo se amplifican exponencialmente; sin embargo, dado que hay muchas más copias de ADN de tipo silvestre al inicio de la fase exponencial, el ADN de tipo silvestre supera ampliamente al ADN mutante.

La Figura 2 muestra dos ejemplos específicos de diseños de ensayo para dos secuencias diana de interés, ambas dentro del oncogén PIK3CA: la variante H1047R ubicada en el codón 3140 con cambio de nucleótidos de A a G (arriba) y la variante E542K localizada en el codón 1624 con cambio de nucleótido G a A (abajo).

La Figura 3 muestra gráficos de PCR digital en gotas. La figura muestra la señal de ADN mutante obtenida del ensayo de mutación PrimePCR™ (lado izquierdo) y de los ensayos IBSAFE (lado derecho) para la variante PIK3CA H1047R (mitad superior) y para la variante PIK3CA E542K (mitad inferior). Las gotas (eje X) se indican como puntos con su intensidad fluorescente (eje Y). Téngase en cuenta la falta de gotas falso positivas dentro de las cavidades de control negativo cuando se utiliza el método IBSAFE (descrito en recuadros en las esquinas superiores derechas de cada diagrama) en comparación con el ensayo de mutación PrimePCR™.

La Figura 4 muestra un diseño de ensayo experimental - diseño de ensayo dirigido a PIK3CA c.3140A> G (H1047R) con versiones alternativas de cebador H (beta 1 y beta 2). El cebador H beta 1 es más corto y, por lo tanto, tiene una temperatura de fusión más baja que el cebador H beta 2. Las sondas utilizadas en este ensayo son sondas TaqMan® MGB personalizadas (Applied Biosystems) que contienen un colorante indicador 5' (FAM o HEX), un desactivador no fluorescente de 3', y un aglutinante de surco menor de 3' unido a la molécula desactivadora.

La Figura 5 muestra gráficos de la señal mutante (específica) que demuestra el efecto de la AIPR sobre la señal falso positiva. Se usó el diseño de ensayo experimental que se muestra en la Figura 4, que incluye el cebador H beta 1 o beta 2 junto con el cebador L, y las sondas específicas de mutación y específicas de tipo silvestre (ver la Figura 4) se ejecutaron con el molde de ADN positiva para mutación (no se muestran, todos los ensayos detectaron la mutación) y el molde de tipo silvestre sin AIPR (A), con AIPR a una temperatura inferior (67 °C) (B) y con AIPR a una temperatura más elevada (74 °) (C). Los paneles D, E y F muestran señales mutantes (específicas) y sin señales falso positivas que utilizan diferentes temperaturas de hibridación de AIPR y temperaturas de hibridación simétricas; (D) ensayo IBSAFE para la mutación PIK3CA E542K. En este ejemplo, la AIPR se ejecuta con una temperatura de hibridación de 75 °C y la etapa simétrica con una temperatura de hibridación a 46 °C; (E) ensayo de IBSAFE para la mutación E545K en PIK3CA. En este ejemplo, la AIPR se ejecuta con una temperatura de hibridación a 75 °C y la etapa simétrica usando una temperatura de hibridación a 46 °C; (F) ensayo de IBSAFE para la mutación NRAS Q61R con AIPR usando una temperatura de hibridación a 73 °C y la etapa simétrica usando una temperatura de hibridación a 48 °C.

La Figura 6 muestra un ejemplo de comparación del límite de detección: se muestran la frecuencia del alelo mutante medida para el ensayo de mutación PrimePCR™ (lado izquierdo) y los ensayos IBSAFE (lado derecho) para la variante PIK3CA H1047R (panel superior y panel inferior) y la variante PIK3CA E542K (panel central). Los paneles superior e intermedio muestran los resultados de ensayos que comprenden ADN de molde que comprende 0, 0,01, 0,1 y 1% de ADN mutante (el resto es de tipo silvestre), mientras que el panel inferior muestra los resultados de ensayos que comprenden ADN de molde que comprende 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 y 10% de ADN mutante. Las señales falso positivas para el ensayo de mutación PrimePCR™ indican que no se puede confiar en los resultados con MAF al 0,01% (superposición con el control negativo) y, por lo tanto, el límite inferior de detección es del 0,1%. Por el contrario, para los ensayos de IBSAFE, el MAF al 0,01% es fiable, e incluso al 0,001% los resultados son confiables. El límite más bajo de detección todavía no se ha ensayado completamente, pero es probable, en función del ensayo, que sea considerablemente menor que el 0,001%.

La Figura 7 muestra el diseño del ensayo (A) y los resultados (B) de un método de acuerdo con la invención en el que se utiliza un cebador L modificado por apareamiento fallido dirigido a la mutación KRAS G13D.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Amplificación: Amplificación de un ácido nucleico es la generación de copias de dicho ácido nucleico. La expresión "par de cebadores capaces de amplificación de un ácido nucleico diana" como se usa en la presente se refiere a si dicho par de cebadores se añade a una PCR junto con el ácido nucleico diana, nucleótidos y una polimerasa de ácido nucleico, entonces dicha PCR darán como resultado la producción del ácido nucleico diana.

Aproximadamente: El término "aproximadamente" como se usa en la presente se refiere a +/- el 10%, con preferencia, +/- el 5%, por ejemplo, a +/- el 1%.

Temperatura de desnaturalización: La temperatura de desnaturalización es una temperatura que permite desnaturalizar todas las moléculas de ADN en la muestra y/o en las reacciones de PCR y/o la AIPR para desnaturalizar en moléculas monocatenarias. La temperatura de desnaturalización es, con preferencia, suficientemente baja para asegurar que la polimerasa de ácido nucleico no se desnaturaliza de modo permanente. Normalmente, la temperatura de desnaturalización es una temperatura en el intervalo de 90 a 99 °C, como en el intervalo de 92 a 97 °C, por ejemplo, en el intervalo de 94 a 95 °C.

Temperatura de elongación: La temperatura de elongación es una temperatura que permite la actividad enzimática de la polimerasa de ácido nucleico. Normalmente, una polimerasa de ácido nucleico tiene actividad en todo un intervalo de temperaturas y así, la temperatura de elongación puede ser cualquier temperatura dentro de ese

intervalo. La mayoría de las polimerasas de ácido nucleico tienen una temperatura óptima, pero retienen actividad a otras temperaturas que la temperatura óptima. En estos casos, la temperatura de elongación puede ser cualquier temperatura donde la polimerasa de ácido nucleico tiene actividad incluso si la temperatura no es la temperatura óptima. La expresión "polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad de polimerasa a una temperatura de elongación" como se usa en la presente se refiere a que la polimerasa de ácido nucleico es capaz de catalizar la síntesis de una nueva cadena de ácido nucleico complementaria de una cadena de molde a la temperatura de elongación. En algunas formas de realización de la invención, la temperatura de elongación está cerca de la temperatura de fusión del cebador H. Así, se puede elegir una polimerasa de ácido nucleico, que tiene actividad de polimerasa a una temperatura cercana a la temperatura de fusión del cebador H y/o el cebador H se puede diseñar para tener una temperatura de fusión cercana a la temperatura de elongación. La expresión "cerca de la temperatura" como se usa en la presente puede estar, por ejemplo, dentro de $\pm 5^{\circ}\text{C}$, como $\pm 2^{\circ}\text{C}$, por ejemplo, $\pm 1^{\circ}\text{C}$ de dicha temperatura. Usualmente, la temperatura de elongación está en el intervalo de 65 a 80°C , por ejemplo, en el intervalo de 68 a 75°C .

Temperatura de fusión: La temperatura de fusión de un cebador es la temperatura a la que el 50% del cebador forma una doble hélice estable con su secuencia complementaria y el otro 50% se separa en moléculas monocatenarias. La temperatura de fusión también se puede mencionar como T_m . La T_m como se usa en la presente se calcula usando un método del vecino más cercano basándose en el método descrito en Breslauer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3746-50 (1986) usando un parámetro de concentración salina de 50 mM y concentración de cebador de 900 nM. Por ejemplo, el método se implementa por medio del software "Multiple Primer Analyzer" de Life Technologies/Thermo Fisher Scientific Inc.

La expresión "par de cebadores capaces de la amplificación de un ácido nucleico diana" como se usa en la presente se refiere a que, si dicho par de cebadores se añade a una PCR junto con el ácido nucleico diana, nucleótidos, polimerasa de ácido nucleico y otros reactivos de PCR, entonces dicha PCR dará como resultado la producción del ácido nucleico diana. Uno de los cebadores del par de cebadores será un cebador directo, mientras que el otro será un cebador inverso. Si el cebador H es un cebador directo, entonces, con preferencia, el cebador L es un cebador inverso y viceversa.

Reactivos de PCR: los reactivos de PCR son reactivos que se añaden a una PCR además de polimerasa de ácido nucleico, muestra y conjunto de cebadores. Los reactivos de PCR comprenden al menos nucleótidos. Además, los reactivos de PCR pueden comprender otros compuestos tales como sales y tampones.

Cebador H y cebador L: un cebador H es un cebador que tiene una temperatura de fusión elevada, mientras que el cebador L es un cebador que tiene una temperatura de fusión baja.

Conjunto de cebadores: un conjunto de cebadores contiene dos o más cebadores diferentes. Un conjunto de cebadores contiene al menos un par de cebadores específicamente capaces de la amplificación de un ácido nucleico diana. Por otra parte, un conjunto de cebadores de acuerdo con la invención contiene al menos un cebador H y un cebador L. Así, en formas de realización de la invención, en donde el conjunto de cebadores contiene solo dos cebadores diferentes, el conjunto de cebadores contiene un cebador H y un cebador L, en donde el cebador H y cebador L son capaces de la amplificación de un ácido nucleico diana.

Ácido nucleico diana: cualquier secuencia de ácidos nucleicos, cuya presencia se desea detectar. El ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos asociada con una afección clínica.

Método para la detección de una secuencia variante o un ácido nucleico diana

La presente invención proporciona métodos para la detección de la presencia de una secuencia variante en un ácido nucleico diana en una muestra.

Estos métodos pueden ser de utilidad para detectar si una secuencia variante está presente en una muestra, que puede comprender una mezcla de ácidos nucleicos diana, en donde solo una porción de los ácidos nucleicos diana puede comprender la secuencia variante. En particular, los métodos son de utilidad para detectar la presencia de una secuencia variante en una muestra que comprende ácidos nucleicos diana cuya menor fracción solo puede comprender potencialmente la secuencia variante.

Dicha secuencia variante puede ser cualquier secuencia variante que se desea detectar. Por ejemplo, la secuencia variante se puede asociar con una afección clínica como se describe en la presente más abajo con mayor detalle en la sección "Método para predecir la presencia de una afección clínica". En particular, la secuencia variante puede ser cualquiera de las secuencias variantes descritas más abajo en la sección "Secuencia variante y secuencia de ácidos nucleicos diana".

La muestra puede ser cualquier muestra en la que se desea detectar si dicha secuencia variante está presente. Por ejemplo, si la secuencia variante es indicativa de una afección clínica, la muestra puede ser una muestra de un individuo en riesgo de adquirir dicha afección clínica.

La presente invención también proporciona métodos para la detección de la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana en una muestra.

Estos métodos pueden ser de utilidad para detectar si una secuencia de ácidos nucleicos diana está presente en una muestra. Dicha muestra puede comprender una mezcla de ácidos nucleicos de molde que comprende potencialmente la secuencia de ácidos nucleicos diana. En particular, los métodos son de utilidad para detectar la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana en una muestra, que potencialmente puede comprender solo un nivel muy bajo de dicha secuencia de ácidos nucleicos diana.

Dicha secuencia de ácidos nucleicos diana puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos diana, que se desea detectar. Por ejemplo, la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana se puede asociar con una afección clínica como se describe más abajo en la presente con mayor detalle en la sección "Método para predecir la presencia de una afección clínica". En particular, la secuencia de ácidos nucleicos diana puede ser cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos diana descritas más abajo en la sección "Secuencia variante y secuencia de ácidos nucleicos diana".

La muestra puede ser cualquier muestra en la que es deseable detectar si dicha secuencia de ácidos nucleicos diana está presente. Por ejemplo, si la secuencia de ácidos nucleicos diana es indicativa de una afección clínica, la muestra puede ser una muestra de un individuo en riesgo de adquirir dicha afección clínica.

Los métodos de detección de la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana o la presencia de un ácido nucleico variante en una muestra en general comprenden las siguientes etapas:

- a) proporcionar una muestra que comprende ácidos nucleicos de molde;
- b) proporcionar un conjunto de cebadores que, por ejemplo, puede ser cualquiera de los grupos de cebadores descritos más abajo en la presente en la sección "Conjunto de cebadores",
- c) proporcionar una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad de polimerasa a una temperatura de elongación que, por ejemplo, puede ser cualquiera de las polimerasas de ácido nucleico descritas más abajo en la presente en la sección "Reactivos de PCR";
- d) preparar reacciones de PCR divididas por ejemplo, como se describe más abajo en la presente en la sección "Reacciones de PCR divididas"
- e) llevar a cabo una reacción de polimerasa incremental asimétrica (AIPR) por ejemplo, como se describe más abajo en la presente en la sección "Reacción de polimerasa incremental asimétrica"
- f) llevar a cabo una reacción de cadena de la polimerasa (PCR), con preferencia, una reacción de PCR exponencial como se describe más abajo en la presente en la sección "PCR exponencial"
- g) detectar si el producto de PCR comprende la secuencia de ácidos nucleicos diana o la secuencia variante en la secuencia de ácidos nucleicos diana, en donde dicha detección se puede llevar a cabo, por ejemplo, como se describe más abajo en la presente en la sección "Detección".

Cada reacción de PCR dividida debe comprender al menos parte de la muestra, el conjunto de cebadores y suficientes reactivos de PCR para permitir una reacción de PCR. Los métodos y los reactivos de utilidad para llevar a cabo una reacción de PCR son bien conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, cada reacción de PCR dividida puede comprender cualquiera de las polimerasas de ácido nucleico y reactivos de PCR, descritas más abajo en la presente en la sección "reactivos de PCR".

Según el modo de detección de si el producto de PCR comprende la secuencia variante, cada reacción de PCR dividida también puede comprender reactivos de detección, como cualquiera de los reactivos de detección descritos más abajo en la sección "Detección".

Los métodos de la invención son de utilidad, por ejemplo, para aplicaciones que requieren una discriminación de alto rendimiento entre dos secuencias cualesquiera de un número de nucleótidos. Por ejemplo, los métodos de la invención son de utilidad para aplicaciones que requieren una discriminación de alto rendimiento entre dos secuencias cualesquiera que difiere en solo una o algunas bases de nucleótido y donde la tasa de error de incorporación de bases de polimerasa inherentes puede llevar a secuencias diana falso positivas de interés. Los métodos se pueden usar con discriminación a base de sondas de variantes de nucleótidos simples, por ejemplo, como se describe más abajo en la presente en la sección "Detección" o con discriminación a base de cebadores. El método se puede aplicar a cualquier tipo de secuencias no modificadas o modificadas de ácido desoxirribonucleico o ribonucleico (ADN/ARN) de interés en cualquier organismo y de cualquier longitud de una docena de nucleótidos de largo a muchos cientos a miles de nucleótidos de largo. El método se puede usar con cebadores no modificados o modificados, con o sin sondas no modificadas o modificadas. El método se puede llevar a cabo en múltiplex con muchas interrogaciones simultáneas de múltiples secuencias diana de interés.

En general, los métodos de la invención tienen un límite de detección muy bajo. Esto permite una detección de secuencia de ácidos nucleicos diana potencialmente presente en niveles muy bajos, y/o detección de la presencia de secuencias variantes potencialmente presentes en niveles muy bajos en mezclas que comprenden otras secuencias

de ácidos nucleicos diana. En general, una gran diferencia entre la temperatura de fusión de cebador H y cebador L puede permitir un límite muy bajo de detección. Las temperaturas de fusión de utilidad de cebador H y cebador L se describen en la presente más abajo. Además, una gran diferencia entre la alta temperatura de hibridación y la baja temperatura de hibridación aplicada puede permitir un límite de detección muy bajo. Las temperaturas de hibridación alta y baja de utilidad se describen en la presente más abajo.

El límite de detección se puede determinar de varias formas. Por ejemplo, el límite de detección se puede determinar mediante la determinación de la fracción de alelo mutante (MAF) mínima que se puede diferenciar confiablemente de un control negativo que contiene solo un molde de tipo silvestre. La fracción de alelo mutante es la fracción de alelos mutantes detectados en comparación con la cantidad total de alelos (tipo silvestre más mutante) detectada. En teoría, la MAF debería ser cero cuando el molde de entrada es solo de tipo silvestre, sin embargo, debido a falsos positivos, la fracción puede ser mayor que cero. Los falsos positivos llevan a un límite de detección más pobre para un método porque la MAF muy baja en un verdadero positivo no se puede distinguir de la MAF muy baja detectada en un verdadero negativo. Con preferencia, los métodos de la invención tienen un límite de detección MAF que es inferior al 0,01%, por ejemplo, puede ser inferior al 0,001%. La MAF se puede determinar, por ejemplo, como se describe más abajo en la presente en el Ejemplo 1.

Un kit de partes

La presente divulgación también proporciona un kit de partes que comprende:

- a) un conjunto de cebadores que, por ejemplo, pueden ser cualquiera de los grupos de cebadores descritos en la presente más abajo en la sección "Conjunto de cebadores",
- b) una sonda de detección que es capaz de hibridar en la secuencia de ácidos nucleicos diana, donde dicha sonda se liga con al menos un fluoróforo y al menos un desactivador, en donde dicha sonda de detección, por ejemplo, puede ser cualquiera de las sondas de detección descritas en la presente más abajo en la sección "Detección",
- c) una polimerasa de ácido nucleico que, por ejemplo, puede ser cualquiera de las polimerasas de ácido nucleico descritas en la presente más abajo en la sección "Reactivos de PCR";
- d) reactivos de PCR que, por ejemplo, pueden ser cualquiera de los reactivos descritos en la presente más abajo en la sección "Reactivos de PCR";
- e) reactivos para preparar gotas que contienen reacciones de PCR divididas que, por ejemplo, pueden ser cualquiera de los reactivos descritos en la presente más abajo en la sección "Reacciones de PCR divididas".

El kit de partes son particularmente útiles para llevar a cabo los métodos de la invención.

Secuencia variante y secuencia de ácidos nucleicos diana

Como se describió con anterioridad, los métodos de la invención son de utilidad para detectar la presencia de una secuencia variante en una secuencia de ácidos nucleicos diana.

Con frecuencia, dicha secuencia variante puede ser una secuencia mutada. Así, la secuencia de ácidos nucleicos diana puede ser una secuencia de ácidos nucleicos que puede estar presente ya sea como una secuencia de tipo silvestre o como una secuencia mutada.

También es posible que la secuencia variante sea un polimorfismo, y así, la secuencia de ácidos nucleicos diana puede estar presente como varios polimorfos diferentes. A fin de simplificar el análisis, la secuencia de ácidos nucleicos diana más común también se menciona en la presente como "secuencia de tipo silvestre" incluso a pesar de que, estrictamente, también la secuencia variante en ciertas circunstancias se pueda considerar una secuencia de tipo silvestre.

Así, los métodos de la invención pueden ser métodos para detectar la presencia de una secuencia variante en una secuencia de ácidos nucleicos diana, en donde dicha secuencia de ácidos nucleicos diana potencialmente puede estar presente como una secuencia de tipo silvestre o puede comprender la secuencia variante.

La secuencia variante puede diferir de la secuencia de tipo silvestre por sustituciones, supresiones y/o inserciones. Puede ser preferible que tanto la secuencia de tipo silvestre como la secuencia variante se pueden amplificar en una reacción de PCR por el par de cebadores específicamente capaces de amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Por consiguiente, se puede preferir que la secuencia de tipo silvestre y la secuencia variante no difieran demasiado de las otras en longitud. La secuencia variante puede diferir, por ejemplo, de la secuencia de tipo silvestre por la inserción en el intervalo de 1 a 1000 nucleótidos, como en el intervalo de 1 a 100 nucleótidos, por ejemplo, en el intervalo de 1 a 50 nucleótidos, como en el intervalo de 1 a 10 nucleótidos, por ejemplo, en el intervalo de 1 a 5 nucleótidos, como la inserción de 1 nucleótido. De modo similar, la secuencia variante puede diferir, por ejemplo, de la secuencia de tipo silvestre por supresión en el intervalo de 1 a 1000 nucleótidos, como en el intervalo de 1 a 100 nucleótidos, por ejemplo, en el intervalo de 1 a 50 nucleótidos, como en el intervalo de 1 a 10 nucleótidos, por ejemplo, en el intervalo de 1 a 5 nucleótidos, como la supresión de 1 nucleótido. La secuencia variante también

puede diferir de la secuencia de tipo silvestre por sustitución, por ejemplo, por sustitución en el intervalo de 1 a 1000 nucleótidos, como en el intervalo de 1 a 100 nucleótidos, por ejemplo, en el intervalo de 1 a 50 nucleótidos, como en el intervalo de 1 a 10 nucleótidos, por ejemplo, en el intervalo de 1 a 5 nucleótidos, como la sustitución de 1 nucleótido.

Así, en una forma de realización de la invención, la secuencia variante puede diferir de la secuencia de tipo silvestre solo por un nucleótido, por ejemplo, por supresión, inserción o sustitución de 1 nucleótido. De esta forma, la secuencia variante puede ser una variación de nucleótido simple o mutación de nucleótido simple. La secuencia variante también puede ser un polimorfismo, como un polimorfismo de nucleótido simple.

Como se explicó con anterioridad, puede preferirse que tanto la secuencia de tipo silvestre como la secuencia variante se puedan amplificar en una reacción de PCR usando el par de cebadores específicamente capaces de la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Dicho par de cebadores consiste en un cebador directo y un cebador inverso. Se prefiere que el cebador directo comprenda o incluso consista en una secuencia idéntica a una parte de la secuencia diana, que está presente tanto en la secuencia diana de tipo silvestre como en la secuencia diana que comprende la secuencia variante. Sin embargo, también es posible que el cebador directo comprenda o incluso consista en una secuencia idéntica a una parte de la secuencia diana esperada para algunas faltas de apareamiento, por ejemplo, excepto para hasta 10 faltas de apareamiento, como hasta 5 faltas de apareamiento, por ejemplo, hasta 2 faltas de apareamiento. De modo similar, se prefiere que el cebador inverso comprenda o incluso consista en una secuencia complementaria de una parte de la secuencia diana, que está presente tanto en la secuencia diana de tipo silvestre como en la secuencia diana que comprende la secuencia variante. Sin embargo, también es posible que el cebador inverso comprenda o incluso consista en una secuencia complementaria de una parte de la secuencia diana esperada para algunas faltas de apareamiento, por ejemplo, excepto por hasta 10 faltas de apareamiento, como hasta 5 faltas de apareamiento, por ejemplo, hasta 2 faltas de apareamiento. Los cebadores pueden contener faltas de apareamiento por varias razones, por ejemplo, a fin de ajustar un cebador a una T_m apropiada. De esa manera, los métodos de la invención darán como resultado la amplificación tanto de la secuencia diana de tipo silvestre como la secuencia diana que comprende la secuencia variante. De esta forma, el producto de PCR puede comprender tanto la secuencia de ácidos nucleicos diana que comprende la secuencia variante y la secuencia de ácidos nucleicos diana que no tiene la secuencia variante.

La presencia de la secuencia variante se puede determinar luego por cualquier método disponible para el experto en la técnica, por ejemplo, como se describe más abajo en la presente en la sección "Detección".

Como se describió con anterioridad en la presente, los métodos de la invención se pueden usar para discriminar entre dos secuencias muy similares y así detectar la presencia de una secuencia variante similar a una secuencia de tipo silvestre.

Hay muchas diferentes razones de por qué es deseable detectar una secuencia variante dada. Por ejemplo, la secuencia variante se puede asociar con una afección clínica o un riesgo de adquirir una afección clínica. La secuencia variante también puede proporcionar una huella o al menos contribuir con una huella de un individuo, ayudando así con la identificación de un individuo. Esto puede tener aplicaciones forenses.

Sin embargo, los métodos de la invención también se pueden usar simplemente para detectar la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana dada. Dicha secuencia de ácidos nucleicos diana puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos, que se desea detectar. Por ejemplo, puede ser deseable detectar la presencia de ácidos nucleicos a partir de un patógeno extraño. En general, se prefiere que la secuencia de ácidos nucleicos diana sea apropiada como un molde para polimerasas de ácido nucleico.

Conjunto de cebadores

Los métodos descritos en el presente documento implican el uso de un conjunto de cebadores. El conjunto de cebadores comprende al menos un par de cebadores específicamente capaces de la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana y el conjunto de cebadores comprenden al menos un cebador H y un cebador L.

Está comprendido dentro de la invención que el cebador H y el cebador L puede constituir un par de cebadores específicamente capaces de amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana. De esta forma, en algunas formas de realización de la invención, el conjunto de cebadores puede consistir en el cebador H y el cebador L.

En determinadas formas de realización de la divulgación, las reacciones de PCR en porciones solo contienen los siguientes ácidos nucleicos: ácidos nucleicos presentes en la muestra, cebador H, cebador L, nucleótidos libres y opcionalmente una o varias sondas de detección.

Sin embargo, también es posible que el par de cebadores específicamente capaces de amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana sea diferente del cebador H y el cebador L. También está comprendido dentro de la divulgación que el cebador L junto con un cebador, que no es el cebador H, constituye el par de cebadores específicamente capaces de amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

El par de cebadores específicamente capaces de amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana consiste en dos cebadores que se puede denotar como un cebador directo y un cebador inverso. El cebador directo es capaz, con preferencia, de alinearse con la cadena complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos diana en el extremo 5' o cerca del extremo 5' de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Con preferencia, el cebador directo comprende una secuencia idéntica al extremo 5' de la secuencia de ácidos nucleicos diana. El cebador directo puede consistir incluso en una secuencia idéntica al extremo 5' de la secuencia de ácidos nucleicos diana. En el caso de que el cebador directo comprenda una secuencia no idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos diana, se prefiere que el extremo 3' del cebador consista en una secuencia idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos diana.

El cebador inverso es capaz, con preferencia, de alinearse con la secuencia de ácidos nucleicos diana en el extremo 3' o cerca del extremo 3' de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Con preferencia, el cebador inverso comprende una secuencia complementaria del extremo 3' de la secuencia de ácidos nucleicos diana. El cebador inverso incluso puede consistir en una secuencia complementaria del extremo 3' de la secuencia de ácidos nucleicos diana. En el caso de que el cebador inverso comprenda una secuencia no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos diana, se prefiere entonces que el extremo 5' del cebador consista en una secuencia complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

Se contempla que el cebador directo pueda ser el cebador H y el cebador inverso pueda ser el cebador L.

También se contempla que el cebador directo pueda ser el cebador H y el cebador inverso pueda ser un cebador, que no es el cebador H ni el cebador L.

También se contempla que el cebador directo pueda ser el cebador L y el cebador inverso pueda ser el cebador H.

También se contempla que el cebador directo pueda ser el cebador L y el cebador inverso pueda ser un cebador, que no es el cebador H ni el cebador L.

En algunas divulgaciones en las que el cebador directo es el cebador H, se puede preferir que las reacciones de PCR solo comprendan cebadores inversos que tienen una temperatura de fusión, que es al menos 10 °C inferior, con preferencia, al menos 15 °C inferior, como al menos 20 °C inferior, por ejemplo, al menos 25 °C inferior, como al menos 30 °C, como en el intervalo de 15 a 50 °C, por ejemplo, en el intervalo de 15 a 40 °C inferior a la temperatura de fusión de cebador H. En formas de realización de la invención, en donde el conjunto de cebadores comprende varios pares de cebadores que consisten en un cebador H y un cebador inverso, cada cebador inverso tiene, con preferencia, la temperatura de fusión antes mencionada en relación con el cebador H del par de cebadores.

En algunas divulgaciones en las que el cebador inverso es el cebador H, se puede preferir que las reacciones de PCR solo comprendan cebadores directos con una temperatura de fusión, que es al menos 10 °C inferior, con preferencia, al menos 15 °C inferior como al menos 20 °C inferior, por ejemplo, al menos 25 °C inferior como al menos 30 °C, por ejemplo, en el intervalo de 15 a 50 °C inferior, por ejemplo, en el intervalo de 15 a 40 °C inferior a la temperatura de fusión del cebador H. En formas de realización de la invención, en donde el conjunto de cebadores comprende varios pares de cebadores que consisten en un cebador H y un cebador directo, entonces cada cebador directo tiene, con preferencia, la temperatura de fusión antes mencionada en relación con el cebador H del par de cebadores.

Los cebadores pueden ser cualquier oligonucleótido o ácido nucleico capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis de ADN en condiciones apropiadas. Estas condiciones pueden incluir aquellas de AIPR o PCR descritas en la presente más abajo en la sección "Reacción de cadena de la polimerasa incremental asimétrica" o "PCR exponencial".

En algunos casos, un cebador se puede rotular de modo detectable. En algunos casos, un cebador no se rotula de modo detectable.

El largo de los cebadores puede depender de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Como se explica en la presente en otra parte, el cebador H tiene una temperatura de fusión que es significativamente mayor que la temperatura de fusión del cebador L. Si el conjunto de cebadores contiene más cebadores que el cebador H y el cebador L, entonces se prefiere que los demás cebadores se diseñen para tener una temperatura de fusión similar a la temperatura de fusión del cebador L o menor que la temperatura de fusión del cebador L. Sin embargo, está comprendido dentro de la invención que el conjunto de cebadores pueda comprender más de un cebador H. En tales casos, se prefiere que cualquier cebador que, junto con cualquiera de los cebadores H que son capaces de la amplificación de un ácido nucleico diana, tengan una temperatura de fusión similar a la temperatura de fusión del cebador L o menor que la temperatura de fusión del cebador L.

De esta forma, el conjunto de cebadores comprende el cebador H y el cebador L, en donde el cebador H tiene una temperatura de fusión que es al menos 10 °C mayor que la temperatura de fusión de todos los otros cebadores en el conjunto de cebadores. Por ejemplo, el cebador H puede tener una temperatura de fusión que es de al menos 18 °C, por ejemplo, de al menos 20 °C mayor que la temperatura de fusión de todos los otros cebadores en el conjunto de

cebadores. El cebador H puede tener una temperatura de fusión incluso mayor, por ejemplo, una temperatura de fusión que es al menos 25 °C mayor, como al menos 30 °C mayor que la temperatura de fusión de todos los otros cebadores en el conjunto de cebadores. Si las reacciones de PCR divididas también comprenden una o varias sondas, estas sondas también pueden tener una temperatura de fusión, que es al menos 16 °C, como al menos 18 °C, por ejemplo, al menos 20 °C menor que la temperatura de fusión de cebador H. Sin embargo, las sondas también pueden tener mayores temperaturas de fusión.

En una forma de realización, el cebador H es el único cebador en el conjunto de cebadores que tiene una temperatura de fusión al menos 16 °C mayor que la temperatura de fusión del cebador L. En dicha forma de realización, todos los otros cebadores tienen una temperatura de fusión, que es a lo sumo 10 °C mayor que la temperatura de fusión del cebador L. Por ejemplo, todos los cebadores excepto el cebador H pueden tener una temperatura de fusión dentro del intervalo de +/- 10 °C de la temperatura de fusión del cebador L, como dentro del intervalo de +/- 8 °C de la temperatura de fusión del cebador L, por ejemplo, dentro del intervalo de +/- 6 °C de la temperatura de fusión del cebador L, como dentro del intervalo de +/- 4 °C de la temperatura de fusión del cebador L. Si las reacciones de PCR divididas también comprenden una o varias sondas, dichas sondas también pueden tener una temperatura de fusión dentro del intervalo de +/- 10 °C de la temperatura de fusión del cebador L, como dentro del intervalo de +/- 8 °C de la temperatura de fusión del cebador L, por ejemplo, dentro del intervalo de +/- 6 °C de la temperatura de fusión del cebador L, como dentro del intervalo de +/- 4 °C de la temperatura de fusión del cebador L. Sin embargo, también está comprendido dentro de la invención que las sondas tengan una mayor temperatura de fusión, por ejemplo, una temperatura de fusión de hasta 20 °C mayor que la temperatura de fusión del cebador L.

En una forma de realización de la invención, se prefiere que el conjunto de cebadores no comprenda cebadores:

- a) que tienen una temperatura de fusión que está en el intervalo de +/- 15 °C, con preferencia, en el intervalo de +/- 20 °C, como en el intervalo de +/- 25 °C, por ejemplo, en el intervalo de +/- 10 °C de la temperatura de fusión de cebador H, como dentro del intervalo de +/- 8 °C de la temperatura de fusión de cebador H, por ejemplo, dentro del intervalo de +/- 6 °C de la temperatura de fusión de cebador H, como dentro del intervalo de +/- 4 °C de la temperatura de fusión de cebador H; y
- b) que junto con el cebador H pueda constituir un par de cebadores específicamente capaces de la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

En una forma de realización de la invención, se prefiere que todos los cebadores dentro del conjunto de cebadores, que junto con el cebador H pueden constituir un par de cebadores específicamente capaces de la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana, tengan una temperatura de fusión de al menos 10 °C, con preferencia, de al menos 15 °C, como de al menos 20 °C, por ejemplo, al menos 25 °C, como de al menos 30 °C, por ejemplo, en el intervalo de 15 a 50 °C, como en el intervalo de 15 a 40 °C menor que la temperatura de fusión de cebador H.

De esta forma, el conjunto de cebadores comprende cebador H y cebador L, en donde el cebador H tiene una temperatura de fusión que es al menos 16 °C mayor que la temperatura de fusión de todos los otros cebadores en el conjunto de cebadores. Por ejemplo, el cebador H puede tener una temperatura de fusión que es al menos 18 °C, por ejemplo, al menos 20 °C mayor que la temperatura de fusión de todos los otros cebadores en el conjunto de cebadores. Si las reacciones de PCR divididas también comprenden una o varias sondas, estas sondas también pueden tener una temperatura de fusión, que es al menos 16 °C, como al menos 18 °C, por ejemplo, al menos 20 °C menor, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 45 °C menor que la temperatura de fusión de cebador H. Sin embargo, también está comprendido dentro de la invención que las sondas puedan tener una mayor temperatura de fusión, incluso una temperatura de fusión similar a la temperatura de fusión de cebador H.

El experto en la técnica será capaz de diseñar cebadores con una temperatura de fusión apropiada. En general, la temperatura de fusión de un cebador puede depender del largo del cebador, la secuencia del cebador y también de la presencia de análogos de nucleótidos. Hay algunas restricciones a la secuencia del cebador, porque debe ser capaz de alinearse con la secuencia de ácidos nucleicos diana y/o la secuencia complementaria. De esta forma, dentro de la restricción de la secuencia, el experto en la técnica puede diseñar un cebador con la temperatura de fusión deseada ajustando el largo del cebador. La temperatura de fusión (T_m) puede determinarse como se describió con anterioridad en la presente en la sección "Definiciones".

La temperatura de fusión también puede depender de la presencia de análogos de nucleótidos y, de esta manera, los cebadores que tienen una temperatura de fusión apropiada se pueden diseñar mediante el diseño de cebadores que comprenden uno o varios análogos de nucleótidos. La temperatura de fusión también puede depender de la presencia de faltas de apareamiento de nucleótido con el ácido nucleico diana y, de esta manera, los cebadores que tienen una temperatura de fusión apropiada se pueden diseñar para comprender una o varias faltas de apareamiento de nucleótidos.

Los cebadores pueden incorporar características adicionales que permiten la detección o inmovilización del cebador, pero no alterar una propiedad básica del cebador (por ejemplo, actuar como un punto de inicio de la síntesis de ADN). Por ejemplo, los cebadores pueden contener una secuencia de ácidos nucleicos adicionales en el extremo 5'

que no hibrida en la secuencia de ácidos nucleicos diana o la secuencia complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana, pero que facilita la clonación o la detección de un producto amplificado. Por ejemplo, la secuencia adicional puede comprender una escisión de la enzima de restricción y/o el sitio de reconocimiento. Una región del cebador que es suficientemente complementaria a un molde para hibridar se puede mencionar en la presente como una región hibridante. Los cebadores también se pueden ligar con rótulos, por ejemplo, rótulos fluorescentes, funcionalizados o de unión. Dichos rótulos se pueden ligar con sus extremos, azúcares o bases nitrogenadas. Los cebadores también pueden contener faltas de apareamiento en el extremo 3' en diseños en los que el cebador discrimina entre secuencias de ácidos nucleicos diana de tipo silvestre y variante, para disminuir o extinguir la elongación de la secuencia de molde no deseada.

El cebador puede ser un ADN monocatenario antes de la unión con un ácido nucleico de molde. En algunos casos, el cebador comprende inicialmente una secuencia bicatenaria, por ejemplo, el cebador puede formar un bucle de horquilla. De esta forma, en general un cebador es un polinucleótido u oligonucleótido y con frecuencia, los cebadores son ADN. Sin embargo, los cebadores de acuerdo con la invención pueden comprender uno o varios análogos de nucleótidos, así como pueden comprender ácido ribonucleico (ARN).

Los análogos de nucleótidos son bien conocidos en la técnica y los cebadores y las sondas desveladas en el presente documento pueden incorporar cualquier análogo de nucleótido de utilidad. Los análogos de nucleótidos pueden ser, por ejemplo, análogos de nucleótidos con un grupo de azúcar modificado, análogos de nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados (ANB), análogos de nucleótidos de ácidos nucleicos peptídicos (PNA), análogos de nucleótidos de ácidos nucleicos de glicol (GNA), análogos de nucleótidos de ácidos nucleicos de treosa (TNA), análogos de nucleósidos bicíclicos y tricíclicos, ácidos nucleicos de fosfonomonoéster que incorporan un grupo fósforo en la estructura o los compuestos heterocíclicos policíclicos que se pueden usar en vez de uno o varios de los restos de base heterocíclicos naturales.

En otra forma de realización, un cebador o una sonda utilizada en métodos y composiciones descritos en la presente pueden comprender uno o varios nucleósidos universal. Los ejemplos no limitantes de nucleósidos universales son 5- nitroindol e inosina.

Los cebadores se pueden diseñar de acuerdo con parámetros conocidos para evitar estructuras secundarias y autohibridación.

Los cebadores son asequibles en comercios de una cantidad de proveedores y se pueden preparar por medio de varios métodos, pero no se limitan a la clonación de las secuencias apropiadas y síntesis química directa usando métodos bien conocidos en la técnica (Narang *et al.*, Methods Enzymol. 68:90 (1979); Brown *et al.*, Methods Enzymol. 68:109 (1979)).

Cebador H y cebador L

Los métodos y kits de la invención implican el uso de un conjunto de cebadores que comprenden un cebador H y un cebador L, en donde la temperatura de fusión del cebador H es al menos 16 °C mayor que la temperatura de fusión del cebador L, y en donde el cebador L contiene una secuencia complementaria al producto de la elongación del cebador H. El conjunto de cebadores puede comprender otros cebadores, por ejemplo, como se describió anteriormente en la sección "Conjunto de cebadores", sin embargo, el conjunto de cebadores también puede consistir en el cebador H y el cebador L, en donde el cebador H y el cebador L son específicamente capaces de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana.

El cebador H está diseñado preferentemente como un cebador para la amplificación de la secuencia diana o de la secuencia complementaria a la secuencia diana. De este modo, el cebador H es preferentemente capaz de alinearse a sea la secuencia de ácido nucleico diana o con la secuencia complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana. Por ejemplo, el cebador H puede ser capaz de alinearse a la cadena complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana en el extremo 5' o cerca del extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico diana, o el cebador H puede ser capaz de alinearse a la secuencia de ácido nucleico diana en el extremo 3' o cerca del extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico diana. Por lo tanto, el cebador H puede comprender una secuencia idéntica al extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico diana. El cebador H puede consistir incluso en una secuencia idéntica al extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico diana. El cebador H también puede comprender una secuencia idéntica a la secuencia de ácido nucleico diana. De este modo, el cebador H puede comprender una secuencia complementaria al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico diana. El cebador H puede consistir incluso en una secuencia complementaria al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico diana.

De forma similar, el cebador L se diseña preferentemente como un cebador para la amplificación de la secuencia diana o de la secuencia complementaria de la secuencia diana. Si el cebador H está diseñado para la amplificación de la secuencia diana, el cebador L está diseñado preferentemente para la amplificación de la secuencia complementaria de la secuencia diana, y viceversa. Por lo tanto, el cebador L es preferentemente capaz de alinearse con la secuencia de ácido nucleico diana o con la secuencia complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana. Si el cebador H es capaz de alinearse con la secuencia de ácido nucleico diana, entonces el cebador L es preferentemente capaz de alinearse a la secuencia complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana, y

viceversa. Por ejemplo, el cebador L puede ser capaz de alinearse con la cadena complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana en el extremo 5' o cerca del extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico diana, o el cebador L puede ser capaz de alinearse a la secuencia de ácido nucleico diana en el extremo 3' o cerca del extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico diana. Por lo tanto, el cebador L puede comprender una secuencia idéntica al extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico diana. El cebador L puede consistir incluso en una secuencia idéntica al extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico diana. El cebador L también puede comprender una secuencia idéntica a la secuencia de ácido nucleico diana. Por lo tanto, el cebador L puede comprender una secuencia complementaria al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico diana. El cebador L puede consistir incluso en una secuencia complementaria al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico diana.

En una forma de realización de la invención, el cebador H comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos, que es idéntica a la secuencia en el extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico diana y el cebador L comprende o consiste en una secuencia idéntica a la secuencia complementaria del extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico diana.

En otra forma de realización de la invención, el cebador L comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos, que es idéntica a la secuencia en el extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico diana y el cebador H comprende o consiste en una secuencia idéntica a la secuencia complementaria del extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico diana.

Y en otra forma de realización más de la invención, el cebador L consta de dos partes, siendo una de las partes complementaria o idéntica a un fragmento de la secuencia de ácido nucleico diana y la otra parte no es complementaria ni idéntica a la secuencia de ácido nucleico diana. Tales cebadores también pueden denominarse "cebador L modificado por apareamiento fallido" en el presente documento. Dicha parte que es complementaria o idéntica a un fragmento de la secuencia de ácido nucleico diana puede tener una temperatura de fusión muy baja, y puede denominarse como la "parte no apareante del cebador L". La parte no apareante del cebador L puede consistir normalmente en el intervalo de 7 a 15, nucleótidos, por ejemplo en el intervalo de 7 a 12 nucleótidos. Dicha parte que no es complementaria ni idéntica a la secuencia de ácido nucleico diana puede contener una secuencia aleatoria y se puede denominar como la "parte no apareada del cebador L". La parte no apareada del cebador L puede consistir normalmente de 2 a 8 nucleótidos, tal como en el intervalo de 2 a 6 nucleótidos, pero podría ser de 1 nucleótido o superior a 8 nucleótidos. Esto puede ser, en particular, el caso en formas de realización de la invención que comprenden una etapa de PCR a baja temperatura como se describió con anterioridad en la sección "PCR a baja temperatura". El extremo 3' de dicho cebador L puede estar, por ejemplo, en una base que varía entre una secuencia de ácido nucleico diana verdadera y no diana estrechamente homóloga. La parte no apareada, al ser incorporada en ácidos nucleicos recién sintetizados y después de la síntesis de la segunda cadena complementaria, puede convertirse en una región de hibridación apropiada.

El cebador H y el cebador L están diseñados para tener las temperaturas de fusión como se indica en la presente. El experto en la técnica será capaz de diseñar un cebador H y un cebador L de manera que tengan las temperaturas de fusión deseadas mediante el ajuste de la secuencia de los cebadores, la longitud de los cebadores y opcionalmente la incorporación de análogos de nucleótidos como se describe con anterioridad en la sección "Conjunto de cebadores".

El cebador H está diseñado de manera que el cebador H tenga una temperatura de hibridación que sea significativamente mayor que la temperatura de hibridación del cebador L, al menos 16 °C más elevada. Por lo tanto, la temperatura de fusión del cebador H puede ser al menos 16 °C más elevada, por ejemplo al menos 18 °C más elevada, como por lo menos 20 °C más elevada que la temperatura de fusión del cebador L. En algunas formas de realización, se prefiere que la temperatura de fusión del cebador H sea al menos 30 ° más elevada, tal como en el intervalo de 30 a 50 °C.

Por lo general, se prefiere que la temperatura de fusión del cebador H sea tan elevada como sea posible, pero no superior a la temperatura de elongación funcional más elevada de al menos una polimerasa de ácido nucleico. Dicha temperatura de elongación no ha de ser necesariamente la temperatura óptima para dicha polimerasa de ácido nucleico, pero se prefiere que al menos una polimerasa de ácido nucleico tenga actividad a la temperatura de fusión del cebador H. Por lo tanto, la temperatura de fusión del cebador H puede acercarse o incluso superar los 80 °C.

El cebador H puede comprender uno o más análogos de nucleótidos, por ejemplo cualquiera de los análogos de nucleótidos descritos en la presente en la sección "Conjunto de cebadores". La incorporación de algunos análogos de nucleótidos puede aumentar la temperatura de fusión, y por consiguiente, el cebador H puede comprender, en particular, análogos de nucleótidos, en donde la incorporación de dichos análogos de nucleótidos aumenta la temperatura de fusión del cebador. Por lo tanto, el cebador H puede comprender uno o más ANB, PNA, GNA y/o TNA. Por ejemplo, el cebador H puede comprender en el intervalo de 1 a 20, tal como en el intervalo de 1 a 15, por ejemplo en el intervalo de 5 a 10 análogos de nucleótidos, por ejemplo ANB.

Dado que también se prefiere que la temperatura de fusión del cebador L sea suficientemente elevada para asegurar la hibridación específico del cebador L a la secuencia de ácido nucleico diana/la secuencia complementaria de la

secuencia de ácido nucleico diana, y que la temperatura de fusión del cebador H debería ser significativamente mayor que la temperatura de fusión del cebador H, en tal caso, con frecuencia, la temperatura de fusión del cebador H es de al menos 60 °C. La temperatura de fusión del cebador H también puede ser frecuentemente de al menos 70 °C. La temperatura de fusión del cebador H puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 60 a 90 °C, por ejemplo en el intervalo de 60 a 85 °C, tal como en el intervalo de 70 a 85 °C, por ejemplo en el intervalo de 70 a 80 °C.

Es preferible que la temperatura de fusión del cebador L sea suficientemente elevada para asegurar la hibridación específico del cebador L a la secuencia de ácido nucleico diana/la secuencia complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana, pero también significativamente menor que la temperatura de fusión del cebador H. Frecuentemente, la temperatura de fusión del cebador L se halla en el intervalo de 30 a 55 °C, tal como en el intervalo de 35 a 55 °C, preferentemente en el intervalo de 40 a 50 °C.

Reactivos de PCR

Los métodos de la invención incluyen etapas para llevar a cabo la PCR. El experto en la técnica es consciente de cómo llevar a cabo una PCR y qué reactivos pueden ser de utilidad para llevar a cabo una PCR. Estos reactivos se mencionan como reactivos de PCR en la presente. El kit de partes de la invención también comprende reactivos de PCR.

Para la mayoría de los fines, los reactivos de PCR comprenden nucleótidos. De esta forma, los reactivos de PCR pueden comprender desoxinucleósido trifosfatos (dNTPs), en particular todos los cuatro desoxinucleósido trifosfatos (dNTPs) naturales.

Los reactivos de PCR comprenden con frecuencia moléculas de desoxirribonucleósido trifosfato, incluyendo todos de dATP, dCTP, dGTP, dTTP. En algunos casos, se añade dUTP.

Los reactivos de PCR también comprenden compuestos útiles para asistir a la actividad de la polimerasa de ácido nucleico. De esta forma, el reactivo de PCR puede comprender un catión divalente, por ejemplo, iones magnesio. Dichos iones magnesio se pueden añadir en forma de, por ejemplo, cloruro de magnesio o acetato de magnesio (MgCl₂) o sulfato de magnesio.

Los reactivos de PCR también pueden comprender uno o varios de los siguientes:

- agentes bloqueantes no específicos como BSA o gelatina de piel bovina, betalactoglobulina, caseína, leche en polvo u otros agentes bloqueantes comunes,
- ácidos nucleicos de fondo no específicos/bloqueantes (por ejemplo, ADN de esperma de salmón),
- bioconservantes (por ejemplo, azida de sodio),
- potenciadores de la PCR (por ejemplo, Betaína, Trehalosa, etc.),
- inhibidores (por ejemplo, inhibidores de la ARNasa).

El reactivo de PCR también puede contener otros aditivos, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, betaína (mono)hidrato (N,N,N-trimetilglicina=[caroxi- metil]trimetilamonio), trehalosa, 7-Desaza-2'-desoxiguanosina trifosfato (dC7GTP o 7-desaza-2'-dGTP), formamida (metanamida), cloruro de tetrametilamonio (TMAC), otros derivados de tetraalquilamonio (por ejemplo, cloruro de tetraetiamonio (TEA-Cl) y cloruro de tetrapropilamonio (TPrA- Cl), detergente no iónico (por ejemplo, Triton X-100, Tween 20, Nonidet P-40 (NP-40)) o PREXCEL-Q.

Los reactivos de PCR pueden comprender un agente tamponante.

En algunos casos, se añade un copolímero de bloque no iónico de óxido de etileno/óxido de propileno a la fase acuosa en una concentración de aproximadamente el 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% o 1,0%. Los biotensioactivos comunes incluyen tensioactivos no iónicos comunes como Pluronic F-68, Tetronics, Zonyl FSN. Pluronic F- 68 puede estar presente en una concentración de aproximadamente el 0,5% p/v.

En algunos casos, se puede sustituir sulfato de magnesio por cloruro de magnesio, en concentraciones similares. Un amplio intervalo de tampones de PCR comunes comerciales de varios vendedores se puede sustituir para la solución tamponada.

Los métodos de la invención también implican el uso de una polimerasa de ácido nucleico y el kit de partes de la invención también comprenden una polimerasa de ácido nucleico. Dicha polimerasa de ácido nucleico puede ser cualquier polimerasa de ácidos nucleicos, como una ADN polimerasa. La polimerasa de ácido nucleico deberá tener actividad a la temperatura de elongación.

En algunas formas de realización, la polimerasa de ácido nucleico es una ADN polimerasa con actividad de exonucleasa 5' a 3'. Este puede ser el caso particular en las formas de realización de la invención, en las que los métodos o los conjuntos implican el uso de una sonda de detección, como una sonda de detección Taqman.

Se puede usar cualquier ADN polimerasa, por ejemplo, una ADN polimerasa con actividad de exonucleasa 5' a 3' que cataliza la extensión del cebador. Por ejemplo, se puede usar una ADN polimerasa termoestable.

En una forma de realización, la polimerasa de ácido nucleico es una polimerasa Taq.

5

Reacciones de PCR divididas

Los métodos de la invención comprenden una etapa de preparar reacciones de PCR divididas. La reacción de PCR dividida se puede someter luego a una etapa de AIPR seguida por una o varias PCR como se describió en la presente. La preparación de reacciones de PCR divididas implica la división de la muestra en múltiples fracciones más pequeñas que comprende cada una un conjunto de cebadores, polimerasa de ácido nucleico, reactivos de PCR y opcionalmente reactivos de detección.

Las reacciones de PCR divididas se pueden preparar por medio de una cantidad de métodos diferentes. En general, implica la división de las reacciones de PCR en compartimientos separados física y espacialmente. Dichos compartimientos se pueden obtener en una cantidad de modos, por ejemplo, las reacciones de PCR se pueden dividir en diferentes recipientes. Las reacciones de PCR divididas también se pueden preparar mediante la división de la reacción de PCR en cavidades de placas de microtitulación. Las reacciones de PCR divididas también se pueden preparar mediante la división de la reacción de PCR en microcavidades, cámaras microfluídicas, capilares, fase dispersa de una emulsión, una cámara (por ejemplo, una cámara en una disposición de cámaras miniaturizadas), una gota o una superficie de unión de ácido nucleico. Las reacciones de PCR divididas también se pueden preparar mediante la división de la reacción de PCR en manchas discretas en un soporte sólido.

Se prefiere que las reacciones de PCR se dividan de modo tal que cada reacción de PCR dividida solo comprenda una pequeña cantidad de ácidos nucleicos de molde que comprenden la secuencia de ácidos nucleicos diana. Si bien la muestra normalmente se distribuye de forma aleatoria en las reacciones de PCR divididas, es posible que algunas reacciones comprendan más ácidos nucleicos de molde que comprende la secuencia de ácidos nucleicos diana que otras. De hecho, algunas de las reacciones de PCR divididas pueden no comprender ácidos nucleicos de molde que comprenden la secuencia de ácidos nucleicos diana, mientras que otras pueden comprender varias copias. Si las copias del ácido nucleico de molde se distribuyen de forma aleatoria entre las divisiones, algunas divisiones no contienen copias, otras solo una copia y, si la cantidad de divisiones es suficientemente grande, aún otras deberán contener dos copias, tres copias e incluso mayores números de copias. La probabilidad de hallar exactamente 0, 1, 2, 3 o más copias en una división, basada en una concentración promedio dada del ácido nucleico de molde en las divisiones, se describe por una distribución de Poisson. Algunas muestras no comprenderán ácidos nucleicos de molde que comprenden la secuencia diana y en tal forma de realización tampoco ninguna de las reacciones de PCR divididas comprenderán ácidos nucleicos de molde que comprenden la secuencia diana.

En una forma de realización, las reacciones de PCR divididas comprenden cada una a lo sumo 10, como a lo sumo 5 ácidos nucleicos de molde que comprenden la secuencia de ácidos nucleicos diana.

40

Un método muy útil para preparar reacciones de PCR divididas es mediante la preparación de gotas de reacción encerradas, en donde cada gota contiene una reacción de PCR dividida. De esta forma, las reacciones de PCR divididas pueden estar contenidas en gotas preparadas usando un generador de gotas.

El tamaño de tales gotas puede variar, pero las reacciones de PCR divididas pueden estar contenidas, por ejemplo, cada una en una gota de un volumen en el intervalo de 1 a 10,000 picolitros, por ejemplo, aproximadamente 1000 picolitros.

Las gotas usadas en la presente pueden incluir composiciones en emulsión (o mezclas de dos o más fluidos no miscibles) por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N.º 7.622.280 o como se describe en los Ejemplos en la presente más abajo. Las gotas se pueden generar por dispositivos descritos en el documento WO/2010/036352. El término emulsión, como se usa en la presente, puede referirse a una mezcla de líquidos no miscibles (como aceite y agua).

Las emulsiones en fase oleosa y/o de agua en aceite permiten la compartimentalización de las mezclas de reacción dentro de gotas acuosas. Las emulsiones pueden comprender gotas acuosas dentro de una fase oleosa continua. Las emulsiones proporcionadas en la presente pueden ser emulsiones de aceite en agua, en donde las gotas son gotas de aceite dentro de una fase acuosa continua. Las gotas usadas en la presente se diseñan normalmente para evitar la mezcla entre los compartimientos, donde cada compartimiento protege sus contenidos de la evaporación y la coalescencia con los contenidos de otros compartimientos.

60

Las gotas se pueden generar para tener un diámetro promedio de aproximadamente, menos de aproximadamente o más de aproximadamente o al menos aproximadamente 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 180, 200, 300, 400 o 500 micrones. Las gotas pueden tener un diámetro medio de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 500, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 500, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 o aproximadamente 1 a aproximadamente 100 micrones. Los métodos microfluídicos

65

de producción de gotas en emulsión usando enfoque de flujo cruzado por microcanales o agitación física se conocen por producir ya sea emulsiones monodispersas o polidispersas. Las gotas pueden ser gotas monodispersas. Las gotas se pueden generar de modo tal que el tamaño de las gotas no varíe en más de más o menos el 5% del tamaño promedio de las gotas. En algunos casos, las gotas se generan de modo tal que el tamaño de las gotas no varíe en más de más o menos el 2% del tamaño medio de las gotas. Un generador de gotas puede generar una población de gotas a partir de una muestra simple, en donde ninguna de las gotas varía de tamaño en más de más o menos aproximadamente el 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5% o 10% del tamaño medio de la población total de gotas.

La mayor estabilidad mecánica puede ser de utilidad para manipulaciones microfluídicas y mayor procesamiento fluido por cizallamiento (por ejemplo, en capilares microfluídicos o por medio de giros de 90 grados, como válvulas, en vía fluidica). Las gotas o cápsulas tratadas pre- y postérmicamente pueden ser mecánicamente estables a las manipulaciones con pipeta estándar y centrifugación.

Las gotas pueden ser polidispersas o monodispersas, generadas por medio de agitación, sonicación o microfluídicamente por medio de una unión de canal T u otro medio por los familiarizados con la técnica.

Una gota se puede formar por flujo de una fase oleosa por medio de una muestra acuosa. La fase acuosa puede comprender una solución tamponada y reactivos para llevar a cabo una reacción de PCR, incluyendo nucleótidos, cebadores, sondas para la detección fluorescente, ácidos nucleicos de molde, enzima de ADN polimerasa y opcionalmente, enzima de transcriptasa inversa.

La fase acuosa en general comprende la muestra, los reactivos de PCR, la polimerasa de ácido nucleico, el conjunto de cebadores y opcionalmente los reactivos de detección.

La fase oleosa puede comprender un aceite de base fluorada que se puede estabilizar adicionalmente por combinación con un tensioactivo fluorado como un poliéter perfluorado. En algunos casos, el aceite de base puede ser uno o varios de HFE 7500, FC-40, FC-43, FC-70 u otro aceite fluorado común. En algunos casos, el tensioactivo aniónico es Ammonium Krytox (Krytox-AM), la sal de amonio de Krytox FSH o derivado de morfolino de Krytox-FSH.

La fase oleosa también puede comprender un aditivo para ajustar las propiedades del aceite, tales como presión del vapor o viscosidad o tensión superficial. Los ejemplos no limitantes incluyen perfluoro-octanol y 1H,1H,2H,2H-Perfluorodecanol.

La emulsión se puede formular para producir gotas altamente monodispersas con una película interfacial de tipo líquido que se puede convertir por calentamiento en microcápsulas con una película interfacial de tipo sólido; tales microcápsulas se pueden comportar como biorreactores capaces de retener sus contenidos a través del proceso de reacción como AIPR o amplificación por PCR. La conversión en forma de microcápsula se puede producir después del calentamiento. Por ejemplo, esta conversión se puede producir a una temperatura de más de aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90 o 95 grados Celsius. En algunos casos, este calentamiento se produce usando un termociclador. Durante el proceso de calentamiento, se puede usar una capa de fluido o aceite mineral para evitar la evaporación. Las cápsulas biocompatibles pueden ser resistentes a la coalescencia y/o la floculación a través de un amplio intervalo de procesamientos térmicos y mecánicos.

En algunos casos, la gota se genera usando un generador de gotas asequible en comercios, como generador de gotas Bio- Rad QX100™. AIPR y PCR se pueden llevar a cabo usando aparatos asequibles en comercios y las gotas se pueden analizar usando un lector de gotas asequible en comercios como generador, como lectora de gotas Bio-Rad QX100™.

50 Reacción de polimerasa incremental asimétrica

Los métodos de la invención comprenden una etapa de reacción de polimerasa incremental asimétrica (AIPR). Es importante que la AIPR se lleve a cabo antes de cualquier etapa de PCR exponencial. Por consiguiente, en la etapa general e) se lleva a cabo antes de la etapa f). La AIPR comprende las etapas de:

- i. incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de la desnaturalización, lo que desnaturaliza así el ADN en moléculas monocatenarias
- ii. incubar las reacciones de PCR divididas a una elevada temperatura de hibridación que permite la hibridación del cebador H, pero no del cebador L,
- iii. opcionalmente incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de elongación,
- iv. opcionalmente repetir las etapas i a iii.

En general, AIPR es una reacción asimétrica que da como resultado una amplificación de solo una cadena de la secuencia de ácidos nucleicos diana. De esta forma, con preferencia, la reacción de PCR no comprende otro cebador que, junto con el cebador H es capaz de la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana, en donde dicho otro cebador tiene una temperatura de fusión similar o mayor que la temperatura de fusión de cebador

H. En formas de realización de la invención, en donde el grupo de primer comprende múltiples cebadores H se prefiere que la reacción de PCR no comprende otros cebadores, que junto con cualquiera de los cebadores H son capaces de amplificación de cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos dianas en donde dichos otros cebadores tienen una temperatura de fusión similar o mayor que la temperatura de fusión de cebador H. Las temperaturas de fusión preferidas de los cebadores se describen en la sección "Conjunto de cebadores" y "el cebador L y el cebador H". De esta forma, a la elevada temperatura de hibridación solo el cebador H será alienado dando como resultado la polimerización solo del cebador H. De esta forma, varias rondas de AIPR llevan a amplificación de solo una cadena de la secuencia de ácidos nucleicos diana y AIPR es así en principio una amplificación lineal.

Con frecuencia, la polimerasa de ácido nucleico tiene una actividad de elongación a la elevada temperatura de hibridación. En tales formas de realización, la elevada temperatura de hibridación también se puede considerar la temperatura de elongación incluso si la elevada temperatura de hibridación no es la óptima temperatura para la polimerasa de ácido nucleico. De esta forma, la AIPR puede comprender solo dos etapas que se repiten, es decir, una etapa de desnaturalización por incubación en la temperatura de desnaturalización y una etapa combinada de hibridación y elongación de cebador H por incubación a la elevada temperatura de hibridación. En dichas formas de realización, el cebador H se diseña, con preferencia, para tener una temperatura de fusión, a una temperatura a la que la polimerasa de ácido nucleico tiene suficiente actividad para catalizar la elongación de cebador H.

Por consiguiente, la AIPR de la etapa e) puede comprender las etapas de:

- i. incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de la desnaturalización, lo que desnaturaliza así el ADN en moléculas monocatenarias
- ii. incubar las reacciones de PCR divididas a una elevada temperatura de hibridación que permite la hibridación del cebador H, pero no del cebador L, en donde la elevada temperatura de hibridación también es la temperatura de elongación, lo que permite así la extensión del cebador H alienado;
- iii. repetir las etapas i a ii,

En otras formas de realización de la invención, la temperatura de fusión de cebador H es diferente de la temperatura de elongación. En tales formas de realización, la AIPR de la etapa e) puede comprender las etapas de:

- i. incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de la desnaturalización, lo que desnaturaliza así el ADN en moléculas monocatenarias
- ii. incubar las reacciones de PCR divididas a una elevada temperatura de hibridación que permite la hibridación del cebador H, pero no del cebador L,
- iii. incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de elongación, lo que permite así la elongación del cebador H alienado,
- iv. repetir las etapas i a iii.

La etapa i. de incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de la desnaturalización, se lleva a cabo suficientemente largo tiempo para desnaturalizar el ADN en moléculas monocatenarias. Es posible que la etapa i. se lleve a cabo durante un período más largo durante el primer ciclo de la AIPR que en los ciclos posteriores. El experto en la técnica será capaz de seleccionar los tiempos apropiados para la incubación a la temperatura de desnaturalización. En el primer ciclo, la incubación a la temperatura de desnaturalización puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,5 a 10 min (por ejemplo, para ADN polimerasas de inicio en caliente), mientras que en los siguientes ciclos, la incubación a la temperatura de desnaturalización, por ejemplo, puede estar en el intervalo de 0,1 a 2 min.

De modo similar, el experto en la técnica será capaz de seleccionar los tiempos apropiados para incubación a la elevada temperatura de hibridación/temperatura de elongación. En el último ciclo, la incubación a la temperatura de elongación puede ser más larga que en los otros ciclos, por ejemplo, en el intervalo de 0,5 a 10 min, mientras que en los otros ciclos, la incubación a la temperatura de elongación puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a 2 min. Como se destacó con anterioridad, la elevada temperatura de hibridación puede ser la misma que la temperatura de elongación. En formas de realización en las que la elevada temperatura de hibridación es diferente de la temperatura de elongación, entonces la incubación a la temperatura de hibridación podría estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a 2 min.

Las etapas i a ii se pueden repetir una cantidad apropiada de veces. En general, las etapas i a ii se repiten una cantidad de veces suficientes para asegurar una ocurrencia muy baja o ninguna ocurrencia de señales falso positivas. Por ejemplo, las etapas i. a ii. se pueden repetir en el intervalo de 8 a 256 veces, con preferencia, en el intervalo de 16 a 128 veces, por ejemplo, en el intervalo de 32 a 128 veces, por ejemplo, aproximadamente 64 veces, como 64 veces.

En formas de realización de la invención, en donde la elevada temperatura de fusión y la temperatura de elongación son diferentes, las etapas i. a iii. se pueden repetir en el intervalo de 8 a 256 veces, con preferencia, en el intervalo de 16 a 128 veces, por ejemplo, en el intervalo de 32 a 128 veces, por ejemplo, aproximadamente 64 veces, como

64 veces.

Se prefiere que, durante la AIPR, se lleve a cabo solo un copiado incremental. En otras palabras, se prefiere que solo una cadena del ácido nucleico diana sirva como un molde para copiado durante la AIPR. Si el cebador H es alineado a una secuencia complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos diana, entonces se prefiere que solo la cadena que comprende la secuencia de ácidos nucleicos diana se sintetice durante la AIPR. Como la AIPR es monodireccional, dichas cadenas pueden tener diferente longitud, pero comprenden, con preferencia, al menos la secuencia de ácidos nucleicos diana. En esta forma de realización, la secuencia complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos diana, con preferencia, no se sintetiza durante la etapa de AIPR. De modo similar, si el cebador H se alinea con la secuencia de ácidos nucleicos diana, entonces se prefiere que solo la cadena que comprende la secuencia complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos diana se sintetice durante la AIPR. Si bien la AIPR es monodireccional, dichas cadenas pueden tener diferentes longitudes, pero comprenden, con preferencia, al menos la secuencia complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos diana. En esta forma de realización, la secuencia de ácidos nucleicos diana no se amplifica, con preferencia, durante la AIPR.

De esta forma, en una forma de realización de la invención, la etapa e) resulta en la elongación del cebador H, pero en ninguna elongación detectable del cebador L. Por ejemplo, la etapa e) puede dar como resultado una elongación de cebador H, pero ninguna elongación del cebador L.

En una forma de realización, la etapa e) resulta en la elongación del cebador H, pero en ninguna elongación detectable de cualquier otro cebador. Por ejemplo, la etapa e) puede resultar en una elongación de cebador H, pero ninguna elongación de cualquier otro cebador.

La alta temperatura de hibridación se selecciona para permitir la hibridación del cebador H, pero no del cebador L. Por consiguiente, se prefiere que la elevada temperatura de hibridación se fije significativamente más alta que la temperatura de fusión del cebador L. De esta forma, la elevada temperatura de hibridación en la etapa e) puede ser al menos 10 °C mayor, con preferencia, al menos 15 °C mayor, por ejemplo, al menos 20 °C, como al menos 25 °C mayor que la temperatura de fusión del cebador L.

La alta temperatura de hibridación se podría fijar, por ejemplo, para ser aproximadamente la temperatura de fusión del cebador H. Sin embargo, también podría ser un poco menor.

PCR de baja temperatura

En algunas formas de realización de la divulgación, los métodos comprenden una etapa de PCR de baja temperatura que se lleva a cabo después de completar la AIPR y antes de la PCR exponencial.

En tales formas de realización, el cebador L es normalmente un cebador L modificado por apareamiento fallido como se describió con anterioridad en la presente.

Este puede ser el caso en particular en objetos difíciles (por ejemplo, un objetivo con una secuencia muy homóloga en otra parte en el genoma, como un pseudogén), este cebador L modificado por apareamiento fallido puede permitir el uso de un cebador L más corto que es más específico para el objetivo real.

La PCR a baja temperatura normalmente implica las etapas de:

- 1) incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de la desnaturalización, lo que desnaturaliza así el ADN en moléculas monocatenarias
- 2) incubar la PCR a una muy baja temperatura de hibridación que permite la hibridación tanto del cebador H como de la parte no apareante del cebador L,
- 3) incubar la PCR a la temperatura de elongación lo que permite así la extensión de los cebadores alineados
- 4) opcionalmente repetir las etapas 1) a 3), obteniendo así un producto de PCR.

Esta etapa permitirá la amplificación de un producto que incorpora la parte apareante del cebador L. Una vez que haya disponible suficiente de dicho producto, entonces se puede llevar a cabo una PCR exponencial normal usando una baja temperatura de hibridación que, por ejemplo, puede ser aproximadamente la temperatura de fusión del cebador L.

En general la muy baja temperatura de hibridación es menor que la baja temperatura de hibridación. Normalmente, la muy baja temperatura de hibridación es al menos 5 °C, con preferencia, al menos 10 °C, con mayor preferencia, al menos 15 °C, como al menos 20 °C menor que la baja temperatura de hibridación. Por ejemplo, la muy baja temperatura de hibridación está en el intervalo de 5 a 30 °C menor que la baja temperatura de hibridación, por ejemplo, la muy baja temperatura de hibridación puede estar en el intervalo de 20 a 25 °C menor que la baja temperatura de hibridación. De esta forma, la muy baja temperatura de hibridación puede ser al menos 20 °C menor, por ejemplo, al menos 25 °C, como al menos 30 °C, por ejemplo, al menos 35 °C menor que la temperatura de fusión de cebador H.

Normalmente, las etapas 1) a 3) se pueden repetir más de una vez, por ejemplo, en el intervalo de 1 a 40. Por ejemplo, las etapas 1) a 3) se repiten en el intervalo de 2 a 10 veces, por ejemplo, 4 a 6 veces. Con frecuencia, se prefiere que la cantidad total de ciclos de PCR realizados durante la PCR a baja temperatura y la PCR exponencial estén en el intervalo de 20 a 40, como en el intervalo de 20 a 30. De esta forma, según cuántas veces se repiten las etapas I a III de la PCR exponencial, las etapas 1) a 3) de la PCR a baja temperatura se pueden repetir para alcanzar una cantidad total de ciclos en el intervalo de 20 a 40, como en el intervalo de 20 a 30.

PCR exponencial

Los métodos de la invención comprenden una etapa de llevar a cabo una reacción de cadena de la polimerasa (PCR). A fin de discriminar esta etapa de la AIPR, esta etapa también se puede referir como "PCR exponencial". En los métodos de la invención, la reacción de cadena de la polimerasa se lleva a cabo luego de la AIPR. La PCR exponencial puede comprender en general las etapas de:

- I. incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de la desnaturalización, lo que desnaturaliza así el ADN en moléculas monocatenarias
- II. incubar la PCR a una baja temperatura de hibridación que permite la hibridación tanto del cebador H como del cebador L,
- III. incubar la PCR a la temperatura de elongación lo que permite así la extensión de los cebadores alineados
- IV. opcionalmente repetir las etapas I a III, obteniendo así un producto de PCR.

La incubación a la baja temperatura de hibridación permite, con preferencia, la hibridación de ambos cebadores del par de cebadores específicamente capaces de amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Por consiguiente, la PCR exponencial resultará en la amplificación de ambas cadenas de la secuencia de ácidos nucleicos diana. En teoría, dicha amplificación será exponencial y así, se puede mencionar como "PCR exponencial", aunque en la práctica, también es posible que no sea completamente exponencial.

La PCR exponencial se puede llevar a cabo de cualquier manera, por ejemplo, de cualquier manera convencional para llevar a cabo la PCR conocida por el experto en la técnica.

La etapa I. para incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de la desnaturalización se lleva a cabo durante un tiempo suficiente para desnaturalizar el ADN en moléculas monocatenarias. Es posible que la etapa I. se lleve a cabo durante un período más largo durante el primer ciclo de la PCR que en los ciclos posteriores. El experto en la técnica será capaz de seleccionar tiempos apropiados para la incubación a la temperatura de desnaturalización. En el primer ciclo, la incubación a la temperatura de desnaturalización puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,5 a 10 min, mientras que en los siguientes ciclos, la incubación a la temperatura de desnaturalización puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a 2 min.

De modo similar, el experto en la técnica será capaz de seleccionar tiempos apropiados para la incubación a una temperatura de hibridación baja. Por ejemplo la incubación a baja temperatura de hibridación puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a 2 min.

De modo similar, el experto en la técnica será capaz de seleccionar tiempos apropiados para incubación a la temperatura de elongación. En el último ciclo, la incubación a la temperatura de elongación puede ser más larga que en otros ciclos, por ejemplo, en el intervalo de 0,5 a 10 min, mientras que en los otros ciclos, la incubación a la temperatura de elongación puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a 2 min.

Las etapas I a III se pueden repetir para una cantidad de veces apropiada. En general, se prefiere que etapas I a III no se repitan demasiadas veces para reducir el riesgo de señales falso positivas. Por ejemplo, la etapa f) puede comprender las etapas repetidas I. a III. en el intervalo de 15 a 60 veces, con preferencia, en el intervalo de 20 a 40 veces, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 30 veces, por ejemplo, en el intervalo de 25 a 30 veces.

En formas de realización de la invención, en donde el conjunto de cebadores comprende cebadores adicionales además del cebador H y el cebador L, entonces dichos cebadores adicionales en algunas formas de realización también pueden alinearse con su molde a la temperatura de hibridación baja.

De esta forma, en una forma de realización de la invención, la etapa f) resulta en la elongación del cebador H y el cebador L. En otra forma de realización de la invención, la etapa f) resulta en la elongación de todos los cebadores del conjunto de cebadores.

La baja temperatura de hibridación se selecciona de modo tal que el cebador L se pueda alinear a la secuencia de ácidos nucleicos diana. De esta forma, la temperatura de hibridación baja se podría fijar, por ejemplo, para ser de aproximadamente la temperatura de fusión del cebador L. Sin embargo, también podría ser un poco menor.

Los ejemplos de técnicas de PCR que se pueden usar para la PCR exponencial incluyen, pero sin limitación, PCR

cuantitativa, PCR fluorescente cuantitativa (QF-PCR), PCR fluorescente múltiple (MF-PCR), PCR en tiempo real (RT-PCR), PCR de células simples, PCR de polimorfismo de la longitud de fragmento de restricción (PCR-RFLP), PCR-RFLP/RT-PCR-RFLP, PCR de inicio en caliente, PCR anidada, PCR de colonia de polimerasa in situ, amplificación por círculo rodante in situ (RCA), PCR digital (dPCR), PCR digital en gotas (ddPCR), PCR en puente, PCR de picotítulo y PCR de emulsión.

Detección

Los métodos de la invención comprenden una etapa de detección, ya sea si el producto de PCR comprende la secuencia variante y/o la secuencia de ácidos nucleicos diana. Dicha detección se puede llevar a cabo de cualquier manera apropiada conocida por el experto en la técnica. Por ejemplo se conocen numerosos métodos de detección útiles conocidos en la técnica anterior, que se pueden emplear con los métodos de la invención.

En una forma de realización de la invención, dicha detección implica que las reacciones de PCR divididas contienen un reactivo de detección. Dicho reactivo de detección puede ser cualquier reactivo detectable, por ejemplo, puede ser un compuesto que comprende una etiqueta detectable, en donde dicha etiqueta detectable puede ser, por ejemplo, un colorante, una actividad radiactiva, un fluoróforo, un metal pesado o cualquier otra etiqueta detectable.

Con frecuencia, el reactivo de detección comprende un compuesto fluorescente.

En una forma de realización de la invención, el reactivo de detección comprende o consiste en sondas de detección. Las sondas de detección comprenden o consisten, con preferencia, en oligómeros o polímeros de nucleótido, que opcionalmente pueden comprender análogos de nucleótidos, como cualquiera de los análogos de nucleótidos descritos en la presente con anterioridad en la sección "Conjunto de cebadores". Con frecuencia, la sonda de detección puede ser un oligómero de ADN. Normalmente, la sonda de detección se liga con una etiqueta detectable, por ejemplo, por medio de un enlace covalente. La etiqueta detectable puede ser cualquiera de las etiquetas detectables antes mencionadas, pero frecuentemente es un fluoróforo. Se prefiere que la sonda no sea específicamente capaz de amplificación de un ácido nucleico diana junto con el cebador H. Por ejemplo, si el cebador H comprende una secuencia idéntica a un fragmento de la secuencia diana, entonces las sondas pueden comprender una secuencia idéntica a otro fragmento de la secuencia diana. Si el cebador H comprende una secuencia complementaria de un fragmento de la secuencia diana, entonces las sondas pueden comprender una secuencia complementaria de otro fragmento de la secuencia diana.

La sonda de detección es capaz en general de ligar específicamente la secuencia de ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, la sonda de detección puede ser capaz de ligar específicamente el ácido nucleico diana que comprende la secuencia variante. De esta forma, la sonda de detección puede ser capaz de alinearse con la secuencia de ácidos nucleicos diana o con la secuencia complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos diana. De esta forma, la sonda de detección puede comprender una secuencia idéntica a un fragmento de la secuencia de ácidos nucleicos diana o la secuencia complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos diana. En general, se prefiere que la sonda de detección comprenda una secuencia diferente de la secuencia de cualquiera de los cebadores del conjunto de cebadores.

Las sondas de detección se diseñan para tener una temperatura de fusión apropiada. En una forma de realización, la temperatura de fusión de al menos una sonda de detección es significativamente menor que la temperatura de fusión de cebador H. Por ejemplo, la temperatura de fusión de todas las sondas de detección es significativamente menor que la temperatura de fusión de cebador H. De esta forma, la temperatura de fusión de al menos una sonda de detección puede ser al menos 12 °C menor, con preferencia, al menos 14 °C menor, con mayor preferencia aún, al menos 16 °C menor, con mayor preferencia aún, 18 °C menor, como al menos 20 °C menor, por ejemplo, en el intervalo de 15 a 25 °C, como en el intervalo de 30 a 40 °C o incluso hasta 45 °C menor que la temperatura de fusión del cebador H. Por ejemplo, la temperatura de fusión de todas las sondas de detección puede ser al menos 12 °C menor, con preferencia, al menos 14 °C menor, con mayor preferencia aún, al menos 16 °C menor, con mayor preferencia aún, 18 °C menor, como al menos 20 °C menor, por ejemplo, en el intervalo de 15 a 45 °C menor que la temperatura de fusión del cebador H. Sin embargo, también se pueden aplicar sondas con una mayor temperatura de fusión.

La temperatura de fusión de las sondas de detección es, con preferencia, suficientemente alta para asegurar una hibridación específica de las sondas de detección, pero también significativamente menor que la temperatura de fusión de cebador H. Con frecuencia, la temperatura de fusión de las sondas de detección puede ser similar a la temperatura de fusión del cebador L. Por ejemplo, la temperatura de fusión de al menos una sonda de detección puede ser la misma que la temperatura de fusión del cebador L +/- 10 °C, como la misma que la temperatura de fusión del cebador L +/- 5 °C, por ejemplo, aproximadamente la misma que la temperatura de fusión del cebador L. En otras formas de realización, la temperatura de fusión de la sonda puede ser mayor que la temperatura de fusión del cebador L, por ejemplo, 15 a 20 °C mayor que la temperatura de fusión del cebador L. De esta forma, la sonda de detección puede tener, por ejemplo, una temperatura de fusión en el intervalo de 35 a 60 °C, como en el intervalo de 35 a 55 °C, con preferencia, en el intervalo de 40 a 50 °C.

Con frecuencia, se prefiere que la sonda de detección proporcione a diferentes señales detectables según la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Esto se puede lograr en una cantidad de modos diferentes.

En una forma de realización, la sonda de detección se liga con al menos un fluoróforo y al menos un desactivador, capaz de desactivar la señal del fluoróforo, cuando dicha sonda de detección no está ligada a su objetivo. Por consiguiente, la fluorescencia de dicho fluoróforo no será detectable. Sin embargo, si la sonda de detección se une con la secuencia de ácidos nucleicos diana/la secuencia complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos diana, esto puede llevar entonces a que el desactivador se remueva suficientemente del fluoróforo a fin de anular la desactivación lo que permite la detección de la fluorescencia del fluoróforo. La remoción del desactivador del fluoróforo se puede llevar a cabo en varias formas. Por ejemplo, la PCR puede emplear una polimerasa de ácido nucleico con actividad de exonucleasa 5' a 3'. Después de la elongación, cualquier sonda ligada se degradará por dicha actividad de exonucleasa 5' a 3' mientras se separa el fluoróforo del desactivador. También es posible que la sonda de detección cambie la conformación 3D después de la unión que lleva al desactivador que se remueve del fluoróforo.

En una forma de realización de la invención, las reacciones de PCR divididas contienen cada una un reactivo de detección, que es una sonda de detección variante. La sonda de detección variante es una sonda de detección como se describió con anterioridad que es capaz de hibridar en la secuencia de ácidos nucleicos diana que contiene la secuencia variante con una afinidad significativamente mayor que la secuencia de ácidos nucleicos diana que no contiene la secuencia variante.

En una forma de realización de la invención, las reacciones de PCR divididas contienen cada una un reactivo de detección que es una sonda de detección de tipo silvestre. La sonda de detección de tipo silvestre es una sonda de detección como se describió con anterioridad capaz de hibridar en la secuencia de ácidos nucleicos diana que no contiene la secuencia variante. Se puede preferir que la sonda de detección de tipo silvestre sea capaz de hibridar en la secuencia de ácidos nucleicos diana que no contiene la secuencia variante con una afinidad significativamente mayor que la secuencia de ácidos nucleicos diana que contiene la secuencia variante. En formas de realización que se refieren a la detección de la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana, entonces las reacciones de PCR divididas pueden contener cada una un reactivo de detección que es una sonda de detección de tipo silvestre. En tal forma de realización, puede ser suficiente que las reacciones de PCR divididas contengan solo un tipo de sonda de detección. Por ejemplo, las reacciones de PCR pueden contener una sonda de detección de tipo silvestre ya que la única sonda de detección o las reacciones de PCR pueden contener sonda de detección variante como la única sonda de detección.

En una forma de realización de la invención, cada reacción de PCR dividida contiene tanto una sonda de detección variante como una sonda de detección de tipo silvestre. Este puede ser en particular el caso en las formas de realización referidas a la detección de una secuencia variante en una secuencia de ácidos nucleicos diana.

La sonda de detección variante se puede ligar con al menos un fluoróforo y al menos un desactivador, en donde el desactivador es capaz de desactivar la fluorescencia del fluoróforo. Con preferencia, el desactivador y el fluoróforo se ligan con la sonda de detección variante de una forma tal que el desactivador sea capaz de desactivar la fluorescencia del fluoróforo, cuando la sonda está presente en este estado libre. De esta forma, con frecuencia, el fluoróforo y el desactivador se posicionan suficientemente cerca entre sí, como para que el desactivador sea capaz de desactivar la fluorescencia del fluoróforo. Con frecuencia, el fluoróforo y el desactivador se ligan con diferentes nucleótidos en la sonda de detección variante.

La sonda de detección de tipo silvestre se puede ligar con al menos un fluoróforo y al menos un desactivador, en donde el desactivador es capaz de desactivar la fluorescencia del fluoróforo. Con preferencia, el desactivador y el fluoróforo se ligan con la sonda de detección de tipo silvestre de una manera tal que el desactivador sea capaz de desactivar la fluorescencia del fluoróforo, cuando la sonda está presente en este estado libre. De esta forma, con frecuencia, el fluoróforo y el desactivador se posicionan suficientemente cerca entre sí, de modo que el desactivador sea capaz de desactivar la fluorescencia del fluoróforo. Con frecuencia, el fluoróforo y el desactivador se ligan con diferentes nucleótidos en la sonda de detección de tipo silvestre.

En formas de realización de la invención que emplean tanto una sonda de detección variante como una sonda de detección de tipo silvestre, la sonda de detección variante se puede ligar con un fluoróforo diferente de la sonda de detección de tipo silvestre. En particular, la sonda de detección variante se puede ligar con al menos un fluoróforo, que tiene fluorescencia, que se puede distinguir de la fluorescencia de todos los fluoróforos ligados con la sonda de detección de tipo silvestre. De modo similar, la sonda de detección variante de tipo silvestre se puede ligar con al menos un fluoróforo, que tiene fluorescencia, que se puede distinguir de la fluorescencia de todos los fluoróforos ligados con la sonda de detección variante.

La etapa g) de los métodos de la invención puede incluir la detección de fluorescencia de la sonda de detección variante. De esta forma, la etapa g) puede comprender la detección de la fluorescencia del fluoróforo ligado con la sonda de detección variante. Este puede ser el caso, por ejemplo, en formas de realización de la invención, en donde:

- la sonda variante se liga con al menos un fluoróforo y al menos un desactivador, capaz de desactivar la fluorescencia del fluoróforo;
- la polimerasa de ácido nucleico es una ADN polimerasa que tiene actividad de exonucleasa 5' a 3'; y/o
- el método es el método de detección de la presencia de una secuencia variante en una secuencia de ácidos nucleicos diana.

De modo similar, la etapa g) de los métodos de la invención puede implicar la detección de fluorescencia de la sonda de detección de tipo silvestre. De esta forma, la etapa g) puede comprender la detección de fluorescencia del fluoróforo ligada con la sonda de detección de tipo silvestre. Este puede ser el caso, por ejemplo, en las formas de realización de la invención, en donde:

- la sonda de detección de tipo silvestre se liga con al menos un fluoróforo y al menos un desactivador, capaz de desactivar la fluorescencia del fluoróforo;
- la polimerasa de ácido nucleico es una ADN polimerasa que tiene actividad de exonucleasa 5' a 3'; y/o
- el método es el método de detectar la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana.

En formas de realización de la invención, en donde la PCR se divide en reacciones de PCR contenidas en gotas, dicha fluorescencia se puede detectar, por ejemplo, usando el detector que tiene capacidades de manipulación para muestras de gotas, donde las gotas individuales ingresan en el detector, se someten a detección y luego salen del detector. Por ejemplo, un dispositivo de citometría de flujo se puede adaptar para usar en la detección de la fluorescencia de muestras de gotas. En algunos casos, un dispositivo microfluídico equipado con bombas para controlar el movimiento de las gotas se usa para detectar la fluorescencia de las gotas en fila única. En algunos casos, las gotas se disponen en una superficie bidimensional y un detector se mueve respecto de la superficie, detectando la fluorescencia en cada posición que contiene una gota única.

Después de la adquisición de datos de detección de fluorescencia, se puede usar una computadora para almacenar y procesar los datos. Se puede emplear una lógica ejecutable por computadora para llevar a cabo tales funciones como sustracción de fluorescencia de fondo, asignación de secuencias diana y/o secuencias de referencia y cuantificación de los datos. Una computadora puede ser de utilidad para mostrar, almacenar, recuperar o calcular resultados de diagnóstico del perfil molecular; mostrar, almacenar, recuperar o calcular datos en bruto de análisis de expresión genómica o de ácidos nucleicos; o mostrar, almacenar, recuperar o calcular cualquier información de muestra o de paciente útil en los métodos descritos en la presente.

Las señales de detección se pueden crear basándose en la luz detectada emitida por la sonda de detección de tipo silvestre y opcionalmente de la sonda de detección variante en las divisiones. Las sondas de detección variantes pueden informar si al menos una de dos o más reacciones particulares de amplificación representadas por la señal ocurrió en una división y, así, si al menos una copia de la secuencia variante está presente en la división. El nivel o la amplitud de la señal correspondiente a las sondas se puede analizar para determinar si al menos una de las reacciones particulares ocurrió o no y al menos una copia de uno de los objetivos particulares está presente. El nivel o la amplitud de la señal puede variar entre las divisiones de acuerdo con la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana está presente o ausente en cada división. Por ejemplo, una división positiva para un objetivo particular puede producir un nivel de señal o amplitud que está por encima de un umbral dado y/o dentro de un intervalo dado. Las divisiones se pueden analizar y las señales se pueden crear en cualquier momento apropiado. Los tiempos de ejemplo incluyen al final de un ensayo (ensayo de punto final), cuando las reacciones se corren hasta completar y los datos ya no se cambian o en cierto tiempo previo, siempre que los datos se separen de modo suficiente y confiable. En general, se puede preferir que la detección se realice después de llevar a cabo la cantidad de ciclos de PCR exponencial necesarios para las señales verdadero positivas para tener una amplitud suficientemente alta.

En un aspecto, se proporciona en la presente un método para detectar la presencia de una secuencia diana usando una sonda de detección única.

En algunos casos, la AIPR y la PCR exponencial se llevan a cabo en una configuración de dPCR, como ddPCR. Dos distintas poblaciones de gotas pueden ser detectables y se pueden contar para determinar la concentración de secuencias de ácidos nucleicos diana que comprende una secuencia variante (ver reseña en la Fig. 1A) versus que no comprende dicha secuencia variante (ver la Fig. 1B).

El fluoróforo como se usa en la presente puede significar un compuesto con emisión fluorescente, por ejemplo, con un máximo de emisión fluorescente entre aproximadamente 350 y aproximadamente 900 nm. Una variedad amplia de fluoróforos se puede usar, incluyen, pero sin limitación: 5-FAM (también mencionado como 5-carboxifluoresceína; también mencionado como espiro(isobenzofuran-1(3H), ácido 9'-(9H)xanten)-5-carboxílico, 3',6'-dihidroxi-3-oxo-6-carboxifluoresceína); 5-Hexacloro-Fluoresceína; (ácido [4,7,2',4',5',7'-hexacloro-(3',6'-dipivaloilfluoresceinil)-6-carboxílico]); 6-Hexacloro-Fluoresceína; (ácido [4,7,2',4',5',7'-hexacloro-(3',6'-dipivaloilfluoresceinil)-5-carboxílico]); 5-Tetracoloro-Fluoresceína; (ácido [4,7,2',7'-tetra-cloro-(3',6'-dipivaloilfluoresceinil)-5-carboxílico]); 6-Tetracoloro-Fluoresceína; (ácido [4,7,2',7'-tetra-cloro-(3',6'-

dipivaloilfluoresceinil)-6-carboxílico]); 5-TAMRA (5- carboxitetrametilrodamina); Xantilio, 9-(2,4-dicarboxifenil)- 3,6-bis(dimetilamino); 6-TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina); 9-(2,5-dicarboxifenil)-3,6-bis(dimetilamino); EDANS (ácido 5-((2-aminoetil)amino)naftalen-1-sulfónico); 1,5-IAEDANS (ácido 5-(((2-yodoacetil)amino)etil)amino)naftalen-1-sulfónico); Cy5 (Indodicarbocianina-5); Cy3 (Indo-dicarbocianina-3); y BODIPY FL (ácido 2,6-dibromo-4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora- 3a,4a-diaza-s-indacene-3-propiónico); colorante Quasar™-670 (Biosearch Technologies); colorante Cal Fluor™ Orange (Biosearch Technologies); colorantes Rox; colorantes Max (Integrated ADN Technologies), así como sus derivados apropiados.

El desactivador, como se usa en la presente, puede significar una molécula o parte de un compuesto que es capaz de reducir la fluorescencia de un fluoróforo cuando se une o está en proximidad de la sonda de detección. La desactivación puede ocurrir por cualquiera de varios mecanismos incluidos transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, transferencia de electrones fotoinducida, mejora paramagnética de cruza de intersistemas, acoplamiento de intercambio de Dexter y acoplamiento de excitones como la formación de complejos oscuros. La selección del desactivador puede depender del fluoróforo usado. Una cantidad de desactivadores asequibles en comercios se conocen en la técnica e incluyen, pero sin limitación, DABCYL, desactivadores Black Hole™ (BHQ-1, BHQ-2 y BHQ-3), Iowa Black™ FQ y Iowa Black™ RQ. Estos se denominan desactivadores oscuros. No tienen una fluorescencia nativa, que pueden eliminar un fondo visto con otros desactivadores como TAMRA, que es intrínsecamente fluorescente.

Hay una gran cantidad de guía práctica disponible en la literatura para seleccionar pares de reportero-desactivador apropiados para sondas particulares, como se ejemplifica por medio de las siguientes referencias: Clegg, Meth. Enzymol., 211: 353-388 (1992); Wo et al., Anal. Biochem., 218: 1-13 (1994); Pesce et al., editores, Fluorescence Spectroscopy (Marcel Dekker, New York, 1971); White et al., Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, New York, 1970); y similares. La literatura también incluye referencias que proporcionan listas exhaustivas de moléculas fluorescentes y cromogénicas y sus propiedades ópticas relevantes para seleccionar pares de reportero-desactivador, por ejemplo, Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2nd Edition (Academic Press, New York, 1971) ; Griffiths, Colour and Constitution of Organic Molecules (Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 1992) Pringsheim, Fluorescence and Phosphorescence (Interscience Publishers, New York, 1949); y similares. Además, hay una extensa guía en la literatura para derivar moléculas de reportero y desactivador para la unión covalente por medio de grupos reactivos comunes que se pueden añadir a un oligonucleótido, como se ejemplifica por medio de las siguientes referencias: Haugland (citado con anterioridad); Ullman *et al.*, patente de EE.UU. N.º 3.996.345; Khanna *et al.*, patente de EE.UU. N.º 4.351.760.

Tanto la etiqueta detectable (por ejemplo, el fluoróforo) y el desactivador se puede unir con la sonda usando métodos conocidos en la técnica. En algunos casos, uno de los pares de reportero/desactivador se une con la porción 5' de una sonda y 5' con el locus diana si la secuencia de sonda es complementaria del locus diana y el otro del par de reportero/desactivador se une con la porción 3' de la sonda.

Las etiquetas y los desactivadores detectables se pueden añadir durante la síntesis de oligonucleótidos por medio de química estándar de fosforamidita. También se pueden añadir después de la síntesis mediante la introducción de un ligador con un grupo funcional apropiado durante la oligosíntesis. Después de la síntesis, se puede acoplar una etiqueta detectable (por ejemplo, fluoróforo) con un grupo funcional de oligonucleótido. Para secuencias más largas, para permitir una desactivación eficaz, la secuencia inmediatamente 3' del fluoróforo y 5' del desactivador, se puede hacer complementaria a otra para permitir la formación de un tallo de una horquilla (por ejemplo, baliza molecular). De esta forma, durante la fase de hibridación de AIPR y/o la PCR exponencial, tal sonda hibridará en la secuencia diana amplificada, distanciando así físicamente la etiqueta detectable (por ejemplo, fluoróforo) del desactivador lo que permite la detección de una mayor fluorescencia. Sin embargo, en ausencia de una secuencia diana amplificada, la sonda crea una horquilla que causa que la etiqueta detectable (por ejemplo, fluoróforo) y desactivador estén cerca uno del otro, que limita la fluorescencia de la reacción. En estas reacciones, una polimerasa con actividad de exonucleasa 5'-3' no se requiere para escindir la sonda. El sitio apropiado de unión para la señal reportera (por ejemplo, fluoróforo) y desactivador y la distancia entre la señal reportera (por ejemplo, fluoróforo) y el desactivador es conocida en la técnica.

En algunos casos, la sonda de detección es una sonda TaqMan®.

Una sonda TaqMan® (Heyd *et al.*, 1996) puede usar la actividad de exonucleasa fluorogénica 5' de Taq polimerasa para medir la cantidad de secuencias diana en muestras de cADN. Las sondas TaqMan® pueden contener un fluoróforo usualmente en o cerca de la base 5' y un desactivador puede estar en o cerca de la base 3'. El desactivador puede ser un colorante como TAMRA o puede ser una molécula no fluorescente como ácido 4-(4-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL). Ver Tiagi *et al.*, Nature Biotechnology 16:49-53 (1998). Cuando se irradia, el colorante fluorescente excitada transfiere energía a la molécula de colorante casi desactivante más que fluorescente (esto se denomina FRET = transferencia de energía por resonancia de fluorescencia o Forster). De esta forma, la proximidad cercana del fluoróforo y desactivador puede evitar la emisión de cualquier fluorescencia mientras que la sonda está intacta. Las sondas TaqMan® se pueden diseñar para alinearse con una región interna

del producto de PCR. Cuando la polimerasa replica un molde en el que se une una sonda TaqMan®, su actividad de exonucleasa 5' puede escindir la sonda. Esta escisión puede terminar la actividad del desactivador (no FRET) y el colorante reportero comienza a emitir fluorescencia que puede incrementarse en cada ciclo proporcionalmente a la tasa de escisión de la sonda. La acumulación de productos de PCR se puede detectar mediante el control del incremento en la fluorescencia del fluoróforo. Como la escisión puede ocurrir si la sonda de detección hibrida en la secuencia de ácidos nucleicos diana, la fluorescencia detectada puede originarse de una amplificación específica. En algunos casos, el proceso de hibridación y escisión no interfiere con la PCR exponencial. En algunos casos, una sonda fluorogénica no tiene G en el extremo 5'. A y G adyacentes al colorante reportero puede desactivar la fluorescencia del reportero incluso después de la escisión.

En algunos casos, la sonda de detección es una baliza molecular. Las balizas moleculares (MBs) pueden ser oligonucleótidos diseñados para la detección y la cuantificación de ácidos nucleicos diana (por ejemplo, ADN diana). Los términos 5' y 3' de una MB pueden comprender colectivamente un par de restos que pueden conferir propiedades detectables en la MB. Uno de los términos se puede unir con un fluoróforo y el otro se puede unir con una molécula de desactivador capaz de desactivar una emisión fluorescente del fluoróforo. Por ejemplo, un par de fluoróforo/desactivador puede usar un fluoróforo como EDANS o fluoresceína, por ejemplo, en el término 5' y un desactivador como Dabcil, por ejemplo, en el extremo 3'.

Cuando una MB está presente libre en solución, es decir, no hibrida en un segundo ácido nucleico, el tallo de la MB se puede estabilizar por apareamiento de bases complementarias. Este apareamiento autocomplementario puede dar como resultado una estructura de "bucle de horquilla" para la MB en la que los restos de fluoróforo y los restos de desactivación son próximos entre sí. En esta confirmación, el resto fluorescente se puede desactivar por el fluoróforo.

El bucle de la baliza molecular puede ser complementario o idéntica a la parte de la secuencia de ácidos nucleicos diana, como la hibridación del bucle en su secuencia complementaria en disociación de las fuerzas diana del tallo, lo que distancia así el fluoróforo y desactivador entre sí. Esta distanciamiento puede dar como resultado una activación del fluoróforo, causando un incremento de la fluorescencia de la MB.

Otros detalles respecto de los métodos estándar de preparación y uso de MBs están bien establecidos en la literatura, por ejemplo, en Leone *et al.* (1995) "Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogenous real-time detection of RNA", *Nucleic Acids Res.* 26:2150-2155; Tiagi y Kramer (1996) "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization" *Nature Biotechnology* 14:303-308; Blok y Kramer (1997) y patente de EE.U.U N.º 6.548.254.

La sonda de detección también puede ser una sonda Scorpions™. Una sonda Scorpions™ puede proporcionar un mecanismo de detección de tallo-bucle a base de FRET similar a baliza molecular, excepto porque la sonda también tiene un segmento unido que sirve como un cebador de amplificación (ver, por ejemplo, Whitcombe *et al.* *Nat. Biotechnol.* 1999, August 17(8): 804-7; patente de EE.UU. N.º 6.326.145). En algunos casos, la sonda puede ser una sonda Sunrise™. Una sonda Sunrise™ puede comprender un cebador unido a una sonda de horquilla que se extiende durante la amplificación. Esta disposición puede separar la etiqueta de desactivador interna desde el fluoróforo 5' terminal (Nazarenko *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 1997, 25: 2516-2521).

El nucleótido 3' terminal de la sonda de oligonucleótido se puede bloquear o dejar incapaz de extenderse por una polimerasa de ácido nucleico. Este bloqueo se puede llevar a cabo convenientemente por la unión de una molécula reportera o desactivadora con el carbono terminal 3' de la sonda de oligonucleótido por un resto de unión.

En algunos casos, se puede incluir una sonda de referencia en las reacciones de PCR divididas. Una sonda de referencia puede ser una sonda de referencia no específica o una sonda de referencia específica. La sonda de referencia puede hibridar en un locus de referencia.

En una forma de realización, los métodos de la invención implican el uso de un par simple de cebadores que consiste en cebador H y cebador L combinados con una sonda de detección, como una sonda de detección variante o una sonda de detección de tipo silvestre. En otras formas de realización de la invención, los métodos implican el uso de un par simple de cebadores que consiste en cebador H y cebador L combinados con dos sondas de detección, que son una sonda de detección variante y una sonda de detección de tipo silvestre.

En una forma de realización, la detección se lleva a cabo con ayuda de un reactivo de detección, que es un colorante. El colorante puede ser, por ejemplo, un aglutinante de surco mayor, aglutinante de surco menor, un intercalador o un aglutinante externo, entre otros. Los colorantes de ejemplo que pueden ser apropiados incluyen cianinas luminiscentes, fenantridinas, acridinas, indoles, imidazoles y similares, como DAPI, colorante Hoechst® 33258, acridina naranja, etc. Los colorantes intercalantes de ejemplo que pueden ser apropiados incluyen bromuro de etidio, yoduro de propidio, colorante EvaGreen®, colorante SYBR® Green, colorante SYBR® Gold y 7-aminoactinomicina D (7-AAD), entre otros.

Como se usa en la presente, "una sonda capaz de detectar una mutación específica" es normalmente una sonda

que comprende una secuencia consecutiva de la secuencia diana que comprende dicha mutación o una de sus secuencias complementarias.

Método de predicción de la presencia de una afección clínica

Los métodos de la invención pueden tener una plétora de varias aplicaciones. De hecho, los métodos son de utilidad en cualquier aplicación, donde es deseable detectar la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana, y/o distinguir entre secuencias de ácidos nucleicos diana que comprenden o que no comprenden una secuencia variante.

Por ejemplo, los métodos pueden ser de utilidad para aplicación forense, cuando el análisis de ácidos nucleicos se hace a menudo en un material muy limitado. Los métodos se pueden usar, por ejemplo, en la preparación de huellas de material genético para determinar la presencia de polimorfismos particulares.

Una aplicación muy útil de los métodos de la invención es para predecir la presencia de una afección clínica en un individuo.

Se asocian muchas afecciones clínicas con la presencia de secuencias de ácidos nucleicos diana particulares. Algunas afecciones clínicas se caracterizan por medio de la presencia de una secuencia variante en un ácido nucleico diana. Otras afecciones clínicas se asocian con marcadores, por ejemplo, la presencia de una secuencia variante puede ser un indicador de las afecciones clínicas.

De esta forma, en el presente documento también se describen métodos para predecir la presencia de una afección clínica en un individuo, en donde dicha afección clínica se liga con la presencia de una secuencia variante en una secuencia de ácidos nucleicos diana, donde dicho método comprende las etapas de

- a) proporcionar una muestra de dicho individuo que comprende ácidos nucleicos de molde
- b) llevar a cabo los métodos de detección de una secuencia variante en una secuencia de ácidos nucleicos diana descritos en la presente,

en donde la presencia de dicha secuencia variante en dicho ácido nucleico diana es indicativa de la presencia de dicha afección clínica.

Muchas afecciones clínicas se asocian con la presencia de una o varias secuencias variantes. De esta forma, la afección clínica puede ser cualquier afección clínica ligada con la presencia de una secuencia variante en una secuencia de ácidos nucleicos diana.

La secuencia variante puede ser un biomarcador que se correlaciona, por ejemplo, con la presencia de una afección clínica, el riesgo de avance de una afección clínica, con la susceptibilidad de la afección clínica a un tratamiento dado o con riesgo de muerte. De esta forma, la secuencia variante se puede correlacionar con una predicción en relación con una afección clínica.

En una forma de realización, la afección clínica es cáncer. Dicho cáncer puede ser cualquier cáncer, por ejemplo, un cáncer seleccionado del grupo que consiste en carcinoma de mama, colorrectal, de páncreas, de estómago, GIST, hepatocelular, de pulmón, de pulmón de células pequeñas, de ovario, uterino, de cuello uterino, de vejiga, renal, de próstata, de testículos, carcinoma de tiroides, melanoma maligno, osteosarcoma, condrosarcoma, miosarcoma, glioblastoma u otros tumores de cerebro, tumores de cabeza/cuello, otros tumores gastrointestinales y tumores de células germinales y malignidades hematológicas.

La secuencia variante se puede ligar con dicho cáncer. Por ejemplo, la presencia de la secuencia variante puede ser indicativa de la presencia de dicho cáncer. Sin embargo, con frecuencia, la investigación adicional se puede requerir para determinar si dicho individuo sufre de dicho cáncer.

La tabla de abajo proporciona ejemplos no limitantes de mutaciones ligadas al cáncer, cuya presencia se puede detectar usando los métodos de la invención. Sin embargo, el experto en la técnica será consciente de otras numerosas mutaciones ligadas al cáncer que se pueden detectar usando los métodos de la invención.

Afección clínica	Proteína	N.º de acceso a UniProt	ID de RefSeq	ID de CCDS	Mutaciones
Cáncer de mama	PIK3CA	P42336	NM 006218	CCDS43171 (SEQ ID NO:69)	H1047R, E542K, E545K
Melanoma	BRAF	P15056	NM 004333	CCDS5863 (SEQ ID NO:70)	V600E
Cáncer de pulmón	EGFR	P00533	NM 005228	CCDS5514 (SEQ ID NO:71)	L858R, T790M

(continuación)

Afección clínica	Proteína	N.º de acceso a UniProt	ID de RefSeq	ID de CCDS	Mutaciones
Cáncer colorrectal	KRAS	P01116	NM 004985	CCDS8702 (SEQ ID NO:72)	G12D, G12V, G12C, G13D

Las mutaciones anteriores se indican a nivel de la proteína. La primera letra indica el aminoácido de tipo silvestre, la cantidad es la posición del aminoácido y la última letra, el aminoácido de reemplazo hallado en la mutante. De esta forma, a modo de ejemplo, H1047R indica que la histidina en el aminoácido número 1047 fue reemplazada por arginina. Los códigos de una letra IUPAC o los códigos de tres letras IUPAC para aminoácidos se usan en la presente.

La invención se puede referir así a métodos y kits de partes que comprenden (usan) un par de cebadores, en donde

- el cebador H comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 50 a 100 nucleótidos de SEQ ID NO:69, 70, 71 o 72 y el cebador L comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 10 a 20 nucleótidos de la secuencia complementaria de la SEQ ID NO:69, 70, 71 o 72; o
- el cebador H comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 50 a 100 nucleótidos de la secuencia complementaria de la SEQ ID NO:69, 70, 71 o 72 y el cebador L comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 10 a 20 nucleótidos de SEQ ID NO:69, 70, 71 o 72; y en donde el cebador H y el cebador L juntos son capaces de amplificar una secuencia diana que comprende al menos uno de los nucleótidos que codifican cualquiera de las mutaciones mencionadas en el presente documento.

Una divulgación proporciona métodos para predecir la presencia de una afección clínica en un individuo, en donde dicha afección clínica se liga con la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana, donde dicho método comprende las etapas de

- proporcionar una muestra de dicho individuo que comprende ácidos nucleicos de molde
- llevar a cabo los métodos de detección de una secuencia variante en una secuencia de ácidos nucleicos diana descritos en la presente, en donde la presencia de dicho ácido nucleico diana es indicativa de la presencia de dicha afección clínica.

La afección clínica es la infección por un patógeno infeccioso en cuyo caso el ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos del genoma de dicho patógeno.

La muestra puede ser cualquier muestra de dicho individuo. En particular, la muestra debería ser una muestra que comprende ácidos nucleicos de molde. En algunas divulgaciones, en donde la afección clínica es cáncer, se prefiere que la muestra comprenda ADN de células cancerosas. De esta forma, la muestra puede comprender células cancerosas que comprenden ADN y/o la muestra puede comprender ADN libre derivado de células cancerosas.

La muestra se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en muestras de sangre, biopsias, muestras de heces, muestras de saliva, muestras de orina, muestras de fluido vaginal, muestras de fluido de ascitis, muestras de fluido cerebroespinal y muestra de exudado celular. La muestra también puede ser una fracción de cualquiera de los antes mencionados. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de sangre o una de sus fracciones, como una muestra de plasma o una muestra sérica.

Los ácidos nucleicos de molde pueden ser cualquier ácido nucleico comprendido en la muestra, por ejemplo, ADN o ARN genómico. Los ácidos nucleicos de molde también pueden ser cADN preparado basado en el ARN presente en la muestra.

En una forma de realización, los ácidos nucleicos de molde se seleccionan del grupo que consiste en ADN libre de células, ADN nucleosomal y ADN de tumoral circulante (ctADN), que se pueden hallar en la circulación sanguínea y otros fluidos corporales

La muestra de acuerdo con la presente invención se puede extraer de un individuo y se puede usar para los métodos de la invención.

El individuo puede ser cualquier animal, como un mamífero, incluyendo seres humanos. En una forma de realización preferida, el individuo es un ser humano.

Ejemplos

La invención también se ilustra por medio de los siguientes ejemplos que, sin embargo, no se han de interpretar como limitantes de la invención.

Ejemplos

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos que, sin embargo, no deben interpretarse como limitantes de la invención.

Ejemplo 1

Métodos de IBSAFE (Incremental previa, simétrico posterior, de fidelidad reforzada)

El método IBSAFE es un método innovador para disminuir de manera fiable la consecuencia de cualquier potencial error de la ADN polimerasa, de modo que las reacciones verdaderas positivas tengan una ventaja de señal consistente sobre las reacciones falso positivas.

El presente ejemplo describe el método IBSAFE dentro de una configuración de PCR digital en gota utilizando pares de cebadores específicos diana y sondas fluorescentes que discriminan entre secuencias variantes (por ejemplo, mutantes) y secuencias de tipo silvestre (alelos). Sin embargo, los principios del método se pueden aplicar a muchos sistemas diferentes a base de polimerasa.

El ejemplo describe métodos para la detección de una única mutación de nucleótido en una muestra que puede contener tanto ADN de tipo silvestre como mutante.

Para los ensayos piloto, los cebadores de elevada T_m (cebador H) se diseñaron con una longitud de aproximadamente 60 pb y se ensayaron para operar de manera relativamente eficiente a temperaturas de hibridación de aproximadamente 72 °C o superiores. Las sondas se diseñaron para superponerse a la base de variante con una longitud de aproximadamente 1316 pb, con un equilibrio entre posicionar la base de variante centralmente mientras se intenta maximizar la T_m . Los cebadores de baja T_m (cebador L) están diseñados para ser lo más cortos posible con la T_m más baja posible (normalmente < 48 °C) sin dejar de lograr una adecuada especificidad de secuencia y por lo tanto una señal de fluorescencia de suficiente calidad independientemente del fluoróforo. Para las sondas desactivadas marcadas fluorescentemente, normalmente se usó FAM para el alelo mutante y HEX para el tipo silvestre; pero es posible utilizar cualquier fluoróforo. Las longitudes y las T_m de las sondas pueden ser similares a las del cebador L o algunos grados más elevadas. El número de ciclos de AIPR puede variar, pero normalmente puede ser 64 y el número de ciclos de PCR simétricos puede variar, pero normalmente puede ser 27. Como hay muchos ciclos térmicos, la polimerasa pierde actividad en función de la cantidad de tiempo total a temperaturas elevadas, en este ejemplo cada paso de desnaturalización se eligió para ser ejecutado durante 10 segundos (ver la Tabla 1 para el programa típico de ciclos térmicos).

Un ejemplo de un diseño de ensayo útil se muestra en la Figura 2. La Figura 2 muestra el cebador H y el cebador L, así como la sonda de detección de mutantes (sonda MUT) y la sonda de detección de tipo silvestre (sonda TS) para la detección de dos mutaciones en el oncogén PIK3CA, a saber, H1047R y E542K.

Los resultados típicos para IBSAFE comparados con un ensayo de la técnica anterior se muestran en la Figura 3. Más específicamente, la Figura 3 muestra el resultado de un ensayo de IBSAFE realizado como PCR digital en gota usando condiciones de ciclado térmico descritas en la Tabla 1, y los cebadores y sondas mostrados en la Figura 2, en comparación con los ensayos comerciales de Bio-Rad Laboratories (Ensayo de mutación PrimePCR™ de PIK3CA p.H1047R, Human, N.º de catálogo100-31246, y ensayo de mutación PrimePCR™ PIK3CA TS para p.H1047R, Human, N.º de catálogo100-31249) ejecutado de acuerdo con el protocolo estándar del fabricante (en lo sucesivo denominado "Ensayo comercial").

Para los ensayos tanto comerciales como de IBSAFE, la PCR digital en gota se llevó a cabo utilizando instrumentación de Bio-Rad Laboratories, incluido el generador de gotas QX100 (N.º de catálogo186-3002) y la Lectora de Gotitas QX100 (N.º de catálogo186-3001) y el software QuantaSoft (N.º de catálogo186-3003). Para los ensayos comerciales de Bio-Rad Laboratories, se siguió el protocolo del fabricante. Los ensayos de IBSAFE se realizaron de acuerdo con nuestros métodos en este documento.

La Figura 6 muestra la frecuencia de los alelos mutantes medidos frente a la frecuencia de los alelos mutantes previstos. Los experimentos se realizaron esencialmente como se describió anteriormente en la presente en relación con la Figura 3, excepto que los métodos se realizaron usando un molde que comprende una mezcla de ADN de tipo silvestre y mutante en diferentes proporciones como se indica en la figura. Si bien no se detectaron secuencias mutantes falso positivas en los controles negativos usando el método IBSAFE, el control negativo para el ensayo comercial mostró la misma cantidad de mutante (falso positivo) que la muestra con una frecuencia de alelo mutante esperada de 0,01%. Así, cuando se usa el método IBSAFE, la frecuencia prevista de los alelos mutantes se obtiene en todas las concentraciones ensayadas del molde mutante, mientras que el ensayo comercial da como resultado la misma frecuencia de alelos mutantes medidos para muestras que no comprenden ADN mutante, 0,001% y 0,01% de ADN mutante. Por lo tanto, el método IBSAFE detecta el % previsto de alelos mutantes incluso en una muestra que comprende solamente el 0,001% de ADN mutante (véase la figura 6, panel inferior).

Tabla 1. Condiciones típicas para el ciclado térmico en IBSAFE

Etapas	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Activación de enzima	1	95 °C	10 m
Desnaturalización	64	94 °C	10 s 45 s
Hibridación/elongación		Temp. alta	
Desnaturalización	27	94 °C	10 s
Hibridación		Temp. Baja	30 s
Elongación		72 °C	30 s
Desactivación de enzima	1	98 °C	10 m
Espera	1	4 °C	Infinito

La Figura 4 muestra dos cebadores H diferentes, un cebador L, así como una sonda de detección de mutantes (sonda MUT) y una sonda para la detección de tipo silvestre (sonda TS) para la detección de una mutación en el oncogén PIK3CA, concretamente H1047R.

El resultado de usar los cebadores y las sondas mostrados en la Figura 4 en diferentes métodos de reacción se muestra en la Figura 5. Más específicamente, en reacciones divididas que incluyen el cebador H beta 1 o beta 2 junto con el cebador L y sondas específicas para mutación y específicas para tipo silvestre como se muestra en la Figura 4 se ejecutaron con molde de ADN de mutación positiva (no se muestra, todos los ensayos detectaron la mutación) y molde de tipo silvestre sin AIPR (A), con AIPR a una temperatura inferior (67 °C) (B) y con AIPR a una temperatura más elevada (74 °C) (C). Se logra una reducción significativa de las señales falsas positivas en C.

La PCR digital en gotas y el IBSAFE se llevaron a cabo tal como se describe con anterioridad usando las condiciones de ciclado termociclado descritas en la Figura 5.

Se realizaron reacciones de IBSAFE similares usando una gama de cebadores diferentes. La Figura 5D muestra una señal específica para mutante y ninguna señal falsa positiva en un ensayo para la detección de la mutación PIK3CA E542K. Se usaron los siguientes cebadores y sondas:

Gen	Mutación AA	Mutación CDS	Tipo	Secuencia (5' a 3')
PIK3CA	E542K	c.1624G>A	Cebador H	T+AA+TA+AA+GA+AAAAGAAA+CAGAGAA +TC+TC+CATTTTAGCACTTACCTGTGAC*
PIK3CA	E542K	c.1624G>A	Cebador L	ATTTCTACACGAGATC
PIK3CA	E542K	c.1624G>A	Sonda TS	CTCTCTGAAATCACTGAG
PIK3CA	E542K	c.1624G>A	Sonda MUT	CTCTCTAAAATCACTGAG
*Bases de ANB indicadas por el símbolo "+" antes del nucleótido				

La Figura 5E muestra una señal específica para mutante y ninguna señal falso positivo en un ensayo para la detección de la mutación PIK3CA E545K. Se utilizaron los siguientes cebadores y sondas:

Gen	Mutación AA	Mutación CDS	Tipo	Secuencia (5' a 3')
PIK3CA	E545K	c.1633G>A	Cebador H	T+AA+TA+AA+GA+AAAAGAAA+CAGAGAA +TC+TC+CATTTTAGCACTTACCTGTGAC*
PIK3CA	E545K	c.1633G>A	Cebador L	ATTTCTACACGAGATC
PIK3CA	E545K	c.1633G>A	Sonda TS	TCACTGAGCAGGAG
PIK3CA	E545K	c.1633G>A	Sonda MUT	TCACTAAGCAGGAG
*Bases de ANB indicadas por el símbolo "+" antes del nucleótido				

El cebador H usado para las Figuras 5D y 5E comprendía varias bases de ANB, lo que resultaba en una elevada temperatura de fusión que proporcionaba una elevada diferencia de T_m entre el cebador H y el cebador L, de modo que la etapa AIPR fue puramente asimétrica (una dirección) que copiaba el molde de una sola cadena. Como se

muestra, no se detectaron falsos positivos.

La Figura 5F muestra una señal específica para mutante y ninguna señal falsa positiva en un ensayo para la detección de la mutación NRAS Q61R. Se usaron los siguientes cebadores y sondas:

5

Gen	Mutación AA	Mutación CDS	Tipo	Secuencia (5' a 3')
NRAS	Q61R	c.182A>G	Cebador H	CCAGGATTCTTACAGAAAACAAGTGGTTA TAGATGGTGAAACCTGTTTGTGGACATA CTGG
NRAS	Q61R	c.182A>G	Cebador L	GTATTGGTCTCTCATG
NRAS	Q61R	c.182A>G	Sonda TS	CTTCTGTCCAGCTG
NRAS	Q61R	c.182A>G	Sonda TS	CTTCTCGTCCAGCTG

Los cálculos teóricos que suponían una eficiencia del 100% para los números de copias de alelos mutantes por ciclo de AIPR IBSAFE y PCR simétrica versus PCR estándar se muestran en la Tabla 2. Como puede observarse, en un punto típico para la detección de señales usando el método IBSAFE después del ciclo 27, el escenario del peor caso de la introducción de una variante falso positiva en el ciclo 1 conduce a la generación de ácidos nucleicos falsos con una abundancia de aproximadamente el 2% en comparación con la reacción verdadera positiva. Por el contrario, en un ensayo PCR estándar, los ácidos nucleicos falsos positivos pueden estar presentes en aproximadamente el 25% de la abundancia de los verdaderos positivos en esencialmente cualquier ciclo (normalmente la detección se realiza a 40 ciclos), lo que contribuye a una señal significativamente falso positivo.

10

15

Tabla 2. Cálculos teóricos para copias de alelos mutantes.

REACCIONES DIVIDIDAS		TOTAL DE COPIAS MUT (DE UN MUTANTE DIPLOIDE)	TOTAL DE COPIAS MUT (DEL 1º CICLO TS -> MUT ERROR DE POLIMERASA)	TOTAL DE COPIAS MUT (DE UN MUTANTE DIPLOIDE)	TOTAL DE COPIAS MUT (DEL 1º CICLO TS -> MUT ERROR DE POLIMERASA)
	CICLO	AIPR/ PCR SIMÉTRICA	AIPR/ PCR SIMÉTRICA	PCR ESTÁNDAR	PCR ESTÁNDAR
COPIAS MUTANTES INICIALES	0	2	-	2	-
	1	3	1 (ERROR DE POLIMERASA)	nd	nd
	2	4	1	nd	nd
	6	8	1	nd	nd
ETAPA DE AIPR	14	16	1	nd	nd
	30	32	1	nd	nd
	62	64	1	nd	nd
	64	66	1	nd	nd
	1	132	2	4	1 (ERROR DE POLIMERASA)
	2	264	4	8	2
	3	528	8	16	4
	4	1.056	16	32	8
	5	2.112	32	64	16
	6	4.224	64	128	32
	7	8.448	128	256	64
	8	16.896	256	512	128
	9	33.792	512	1.024	256
	10	67.584	1.024	2.048	512
	11	135.168	2.048	4.096	1.024
PCR SIMÉTRICA	12	270.336	4.096	8.192	2.048
O	13	540.672	8.192	16.384	4.096
PCR ESTÁNDAR	14	1.081.344	16.384	32.768	8.192
	15	2.162.688	32.768	65.536	16.384
	16	4.325.376	65.536	131.072	32.768
	17	8.650.752	131.072	262.144	65.536
	18	17.301.504	262.144	524.288	131.072
	19	34.603.008	524.288	1.048.576	262.144
	20	69.206.016	1.048.576	2.097.152	524.288
	21	138.412.032	2.097.152	4.194.304	1.048.576
	22	276.824.064	4.194.304	8.388.608	2.097.152
	23	553.648.128	8.388.608	16.777.216	4.194.304
	24	1.107.296.256	16.777.216	33.554.432	8.388.608
	25	2.214.592.512	33.554.432	67.108.864	16.777.216
	26	4.429.185.024	67.108.864	134.217.728	33.554.432
PUNTO TÍPICO PARA LA DETECCIÓN DE LA SEÑAL	27	8.858.370.048	134.217.728	268.435.456	67.108.864
	28	17.716.740.096	268.435.456	536.870.912	134.217.728
	29	35.433.480.192	536.870.912	1.073.741.824	268.435.456
	30	70.866.960.384	1.073.741.824	2.147.483.648	536.870.912
	31	141.733.920.768	2.147.483.648	4.294.967.296	1.073.741.824
	32	283.467.841.536	4.294.967.296	8.589.934.592	2.147.483.648
	33	566.935.683.072	8.589.934.592	17.179.869.184	4.294.967.296
	34	1.133.871.366.144	17.179.869.184	34.359.738.368	8.589.934.592
	35	2.267.742.732.288	34.359.738.368	68.719.476.736	17.179.869.184
	36	4.535.485.464.576	68.719.476.736	137.438.953.472	34.359.738.368
	37	9.070.970.929.152	137.438.953.472	274.877.906.944	68.719.476.736
	38	18.141.941.858.304	274.877.906.944	549.755.813.888	137.438.953.472
	39	36.283.883.716.608	549.755.813.888	1.099.511.627.776	274.877.906.944
	40	72.567.767.433.216	1.099.511.627.776	2.199.023.255.552	549.755.813.888

El experto en la técnica será capaz de diseñar cebadores y sondas útiles para la detección de otras mutaciones de

acuerdo con el método IBSAFE descrito en la presente. En la Tabla 3 se resumen ejemplos no limitantes de cebadores H, cebadores L y sondas de detección útiles para la detección de una serie de diferentes mutaciones.

- 5 Cada una de las mutaciones señaladas en la Tabla 3 puede detectarse realizando el IBSAFE como se describe en la presente, en donde la reacción de IBSAFE contiene el cebador H, el cebador L, la sonda TS y la sonda MUT indicada para la mutación particular en la Tabla 3. El método de IBSAFE se puede implementar esencialmente como se describe en este ejemplo, por ejemplo, utilizando las condiciones de ciclado térmico descritas en la Tabla 1. La temperatura de hibridación elevada y baja pueden establecerse de acuerdo con la T_m indicada en la Tabla 3.

Tabla 3

Gen	Mutación AA	Mutación CDS	Tipo	Dirección	Tm (°C)	Longitud (pb)	Secuencia (5' a 3')
PIK3CA	H1047R	c.3140A>G	Cebador H	F	82	60	AAGACCCTAGCCTTAGATAAAA CTGAGCAAGAGGCTTTGGAGTA TTTCATGAAACAAATG
PIK3CA	H1047R	c.3140A>G	Cebador L	R	51,4	16	CATTTTGTGTCCAG
PIK3CA	H1047R	c.3140A>G	Sonda TS	R	54	14	CCACCATGATGTGC
PIK3CA	H1047R	c.3140A>G	Sonda MUT	R	57,7	14	CCACCATGACGTGC
PIK3CA	E542K	c.1624G>A	Cebador H	R	78,7	60	CTGTAATAAAGAAAAAGAAACA GAGAAATCTCCATTTTAGCACTTA CCTGTGACTCCATAG
PIK3CA	E542K	c.1624G>A	Cebador L	F	31,8	12	CTACACGAGATC
PIK3CA	E542K	c.1624G>A	Sonda TS	F	46,9	16	CTCTGAAATCACTGAG
PIK3CA	E542K	c.1624G>A	Sonda MUT	F	43,9	16	TCTCTAAATCACTGA
PIK3CA	E545K	c.1633G>A	Cebador H	R	78,7	60	CTGTAATAAAGAAAAAGAAACA GAGAAATCTCCATTTTAGCACTTA CCTGTGACTCCATAG
PIK3CA	E545K	c.1633G>A	Cebador L	F	31,8	12	CTACACGAGATC
PIK3CA	E545K	c.1633G>A	Sonda TS	F	49,2	14	TCACTGAGCAGGAG
PIK3CA	E545K	c.1633G>A	Sonda MUT	F	44,9	14	TCACTAAGCAGGAG
BRAF	V600E	c.1799T>A	Cebador H	R	89,6	60	TCTTACCATCCACAAAATGGATC CAGACAACTGTTCAAACTGATG GGACCCCACTCCATCG
BRAF	V600E	c.1799T>A	Cebador L	F	45,6	15	GATTTTGGTCTAGCT
BRAF	V600E	c.1799T>A	Sonda TS	F	44,2	14	ACAGTGAAATCTCG
BRAF	V600E	c.1799T>A	Sonda MUT	F	43,3	14	ACAGAGAAATCTCG
EGFR	L858R	c.2573T>G	Cebador H	R	89,5	60	AAGCCACCTCCTTACTTTGCCTC CTTCTGCATGGTATCTTTCTCTT CCGCACCCAGCAG

(continuación)

Gen	Mutación AA	Mutación CDS	Tipo	Dirección	Tm (°C)	Longitud (pb)	Secuencia (5' a 3')
EGFR	L858R	c.2573T>G	Cebador L	F	42	14	TGTC AAGATCACAG
EGFR	L858R	c.2573T>G	Sonda TS	F	60,7	13	TTTTGGGCTGGCG
EGFR	L858R	c.2573T>G	Sonda MUT	F	60,4	12	TTTTGGGCGGGC
EGFR	T790M	c.2369C>T	Cebador H	R	93	60	TGGAGCCCAATATTGCTTTGTG TTCCCGGACATAGTCCAGGAGG CAGCCGAAGGGCATG
EGFR	T790M	c.2369C>T	Cebador L	F	43,5	10	ACCGTGCAGC
EGFR	T790M	c.2369C>T	Sonda TS	F	51,2	13	TCATCACGCAGCT
EGFR	T790M	c.2369C>T	Sonda MUT	F	47	13	TCATCATGCAGCT
KRAS	G13D	c.38G>A	Cebador H	R	84,4	60	ATTGTTGGATCATATTCGTCCAC AAAATGATTCTGAATTAGCTGTA TCGTCAAGGCACTC
KRAS	G13D	c.38G>A	Cebador L	F	37,9	13	CTTGTTGGTAGTTG
KRAS	G13D	c.38G>A	Sonda TS	F	53,4	13	CTGGTGGCGTAGG
KRAS	G13D	c.38G>A	Sonda MUT	F	45,6	13	CTGGTGACGTAGG
KRAS	G12C	c.34G>T	Cebador H	R	84,4	60	ATTGTTGGATCATATTCGTCCAC AAAATGATTCTGAATTAGCTGTA TCGTCAAGGCACTC
KRAS	G12C	c.34G>T	Cebador L	F	37,9	13	CTTGTTGGT AGTTG
KRAS	G12C	c.34G>T	Sonda MUT	F	50,3	13	AGCTTGTGGCGTA
KRAS	G12C	c.34G>T	Sonda TS	F	53,6	13	AGCTGGTGGCGTA
KRAS	G12R	c.34G>C	Cebador H	R	84,4	60	ATTGTTGGATCATATTCGTCCAC AAAATGATTCTGAATTAGCTGTA TCGTCAAGGCACTC
KRAS	G12R	c.34G>C	Cebador L	F	37,9	13	CTTGTTGGTAGTTG
KRAS	G12R	c.34G>C	Sonda MUT	F	53,8	13	AGCTCGTGGCGTA

(continuación)

Gen	Mutación AA	Mutación CDS	Tipo	Dirección	T _m (°C)	Longitud (pb)	Secuencia (5' a 3')
KRAS	G12R	c.34G>C	Sonda TS	F	53,6	13	AGCTGGTGGCGTA
KRAS	G12S	c.34G>A	Cebador H	R	84,4	60	ATTGTTGGATCATATTCGTCCAC AAAATGATTCTGAAATTAGCTGTA TCGTCAAGGCACTC
KRAS	G12S	c.34G>A	Cebador L	F	37,9	13	CTTGTGGTAGTTG
KRAS	G12S	c.34G>A	Sonda MUT	F	45,7	13	AGCTAGTGGCGTA
KRAS	G12S	c.34G>A	Sonda TS	F	53,6	13	AGCTGGTGGCGTA
KRAS	G12V	c.35G>T	Cebador H	R	84,4	60	ATTGTTGGATCATATTCGTCCAC AAAATGATTCTGAAATTAGCTGTA TCGTCAAGGCACTC
KRAS	G12V	c.35G>T	Cebador L	F	37,9	13	CTTGTGGTAGTTG
KRAS	G12V	c.35G>T	Sonda MUT	F	50,3	13	AGCTGTTGGCGTA
KRAS	G12V	c.35G>T	Sonda TS	F	53,6	13	AGCTGGTGGCGTA
KRAS	G12A	c.35G>C	Cebador H	R	84,4	60	ATTGTTGGATCATATTCGTCCAC AAAATGATTCTGAAATTAGCTGTA TCGTCAAGGCACTC
KRAS	G12A	c.35G>C	Cebador L	F	37,9	13	CTTGTGGTAGTTG
KRAS	G12A	c.35G>C	Sonda MUT	F	54,1	13	AGCTGCTGGCGTA
KRAS	G12A	c.35G>C	Sonda TS	F	53,6	13	AGCTGGTGGCGTA
KRAS	G12D	c.35G>A	Cebador H	R	84,4	60	ATTGTTGGATCATATTCGTCCAC AAAATGATTCTGAAATTAGCTGTA TCGTCAAGGCACTC
KRAS	G12D	c.35G>A	Cebador L	F	37,9	13	CTTGTGGTAGTTG
KRAS	G12D	c.35G>A	Sonda MUT	F	50,1	13	AGCTGATGGCGTA
KRAS	G12D	c.35G>A	Sonda TS	F	53,6	13	AGCTGGTGGCGTA

Ejemplo 2

Los métodos IBSAFE se realizaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 1, excepto que también se usó una etapa extra de PCR a baja temperatura. En este ejemplo de un método de IBSAFE, se utiliza una secuencia de no apareamiento para el cebador L. Esto da como resultado una brecha adicional en la diferencia efectiva de temperaturas de fusión entre el cebador H y el cebador L durante la etapa de AIPR.

El diseño del ensayo utilizado en este ejemplo se muestra en la figura 7A e incluye un cebador H, una sonda de detección de tipo silvestre (sonda TS) y una sonda de detección de variantes (sonda MUT). Además, el ensayo incluye el uso de un cebador L que comprende 4 nucleótidos no concordantes. El método utilizado en este ejemplo comprende una etapa de AIPR, una etapa de PCR a baja temperatura seguida de una PCR exponencial. El programa exacto del termociclador usado se muestra en la Figura 7B.

Este ejemplo es un ensayo IBSAFE para la mutación KRAS G13D. En el extremo 5' del cebador L se incluye una secuencia de falta de concordancia de 4 bases y la secuencia de cebador complementaria a la diana es corta. Por lo tanto, el cebador L tiene una temperatura de fusión muy baja y no se alineará a la elevada temperatura de fusión durante la etapa de AIPR (73 °C en este ejemplo). En la etapa simétrica, la temperatura de hibridación utilizada es muy baja (de 30 °C en este ejemplo). Después de algunos ciclos (en este ejemplo, 5 ciclos), la secuencia complementaria a la longitud completa del cebador L se incorpora en el producto sintetizado y la PCR simétrica se puede continuar a una temperatura de hibridación más elevada (53 °C en este ejemplo), en donde ahora la longitud completa del cebador L es una concordancia perfecta.

El resultado se muestra en la Figura 7B que muestra una señal específica para mutante y ningún falso positivo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Saga Diagnostics AB

<120> Detección de ácidos nucleicos

<130> P3800PC00

<160> 72

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador H

<400> 1

aagaccctag ccttagataa aactgagcaa gaggccttgg agtatttcat gaaacaaatg 60

<210> 2

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador L

<400> 2

cattttgtt gtccag 16

<210> 3

<211> 14

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda TS

	<400> 3 ccaccatgat gtgc	14	
5	<210> 4 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Sonda MUT		
	<400> 4 ccaccatgac gtgc	14	
15	<210> 5 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Cebador H		
25	<400> 5 ctgtaataaa gaaaaagaaa cagagaatct ccattttagc acttacctgt gactccatag	60	
30	<210> 6 <211> 12 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Cebador L		
35	<400> 6 ctacacgaga tc 12		
40	<210> 7 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Sonda TS		
45	<400> 7 ctctgaaatc actgag	16	
50	<210> 8 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Sonda MUT		
55	<400> 8 tctctaaaat cactga	16	
60	<210> 9 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
65	<220> <223> Cebador H		

ES 2 775 551 T3

	<400> 9 ctgtaataaa gaaaaagaaa cagagaatct ccatttagc acttacctgt gactccatag	60
5	<210> 10 <211> 12 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador L	
	<400> 10 ctacacgaga tc 12	
15	<210> 11 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sonda TS	
25	<400> 11 tcactgagca ggag 14	
30	<210> 12 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial Sonda MUT	
	<220> <223> Sonda MUT	
35	<400> 12 tcactaagca ggag 14	
40	<210> 13 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador H	
45	<400> 13 tcttaccatc cacaaaatgg atccagacaa ctgttcaaac tgatgggacc cactccatcg	60
50	<210> 14 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador L	
55	<400> 14 gattttggtc tagct 15	
60	<210> 15 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sonda TS	

<400> 15
 acagtgaat ctcg 14

 5 <210> 16
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial Sonda MUT

 10 <220>
 <223> Sonda MUT

 <400> 16
 acagagaaat ctcg 14

 15 <210> 17
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Cebador H

 <400> 17
 aagccacctc ctactttgc ctcttctgc atggtattct ttctttccg caccacagcag 60
 25 <210> 18
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Cebador L

 <400> 18
 35 tgtcaagatc acag 14

 <210> 19
 <211> 13
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda TS

 45 <400> 19
 ttttgggctg gcg 13

 <210> 20
 <211> 12
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda MUT
 55 <400> 20
 ttttgggcgg gc 12

 <210> 21
 60 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> Cebador H

	<400> 21 tgggagccaa tattgtctt gtgtcccgg acatagtcca ggaggcagcc gaagggcatg	60
5	<210> 22 <211> 10 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador L	
15	<400> 22 accgtgcagc 10	
20	<210> 23 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Sonda TS	
30	<400> 23 tcatcacgca get 13	
35	<210> 24 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sonda MUT	
45	<400> 24 tcatcatgca get 13	
50	<210> 25 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador H	
60	<400> 25 attgttgat catattcgtc cacaaaatga ttctgaatta gctgtatcgt caaggcactc	60
65	<210> 26 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador L	
	<400> 26 cttgtgtag ttg 13	
	<210> 27 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sonda TS	

	<400> 27	
	ctggtggcgt agg	13
5	<210> 28	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Sonda MUT	
	<400> 28	
	ctggtgacgt agg	13
15	<210> 29	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador H	
25	<400> 29	
	attgttggat catattcgtc cacaaaatga ttctgaatta gctgtatcgt caaggcactc	60
	<210> 30	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador L	
35	<400> 30	
	cttgtgtag ttg	13
	<210> 31	
	<211> 13	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda MUT	
45	<400> 31	
	agcttggtgc gta	13
	<210> 32	
	<211> 13	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda TS	
55	<400> 32	
	agcttggtgc gta	13
	<210> 33	
60	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Cebador H	

<400> 33
 attgttggat catattcgtc cacaaaatga ttctgaatta gctgtatcgt caaggcactc 60

5 <210> 34
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador L

<400> 34
 cttgtggttag ttg 13

15 <210> 35
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sonda MUT

25 <400> 35
 agctcgtggc gta 13

<210> 36
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sonda TS

35 <400> 36
 agctggtggc gta 13

<210> 37
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador H

45 <400> 37
 attgttggat catattcgtc cacaaaatga ttctgaatta gctgtatcgt caaggcactc 60

50 <210> 38
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador L

<400> 38
 cttgtggttag ttg 13

60 <210> 39
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda MUT

	<400> 39	
	agctagtggc gta	13
5	<210> 40 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sonda TS	
	<400> 40	
	agctggtggc gta	13
15	<210> 41 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador H	
	<400> 41	
25	attgttggat catattcgtc cacaaaatga ttctgaatta gctgtatcgt caaggcactc	60
	<210> 42 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador L	
	<400> 42	
35	cttgtggttag ttg	13
	<210> 43 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sonda MUT	
45	<400> 43	
	agctgttggc gta	13
	<210> 44 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sonda TS	
55	<400> 44	
	agctggtggc gta	13
60	<210> 45 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Cebador H	

<400> 45
 attgttggat catattcgtc cacaaaatga ttctgaatta gctgtatcgt caaggcactc 60

 5 <210> 46
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Cebador L

 <400> 46
 cttgtggtag ttg 13

 15 <210> 47
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Sonda MUT

 <400> 47
 agctgctggc gta 13
 25
 <210> 48
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Sonda TS

 <400> 48
 agctggtggc gta 13
 35
 <210> 49
 <211> 60
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador H

 45 <400> 49
 attgttggat catattcgtc cacaaaatga ttctgaatta gctgtatcgt caaggcactc 60

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

 <220>
 <223> Cebador L
 55
 <400> 50
 cttgtggtag ttg 13

 <210> 51
 <211> 13
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> Sonda MUT

	<400> 51 agctgatggc gta	13	
5	<210> 52 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Sonda TS		
	<400> 52 agctggtggc gta	13	
15	<210> 53 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Cebador H		
25	<400> 53 aagaccctag ccttagataa aactgagcaa gaggccttgg agtatttcac gaaacaaatg	60	
30	<210> 54 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Sequence fragment of PIK3CA		
35	<400> 54 gaaagaccct agccttagat aaaactgagc aagaggcttt ggagtatttc atgaaacaaa	60	
	tgaatgatgc acatcatggt ggctggacaa caaaaatgga	100	
40	<210> 55 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> MUT-probe		
	<400> 55 ccaccatgac gtgc	14	
50	<210> 56 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220> <223> Cebador L		
	<400> 56 cattttgtt gtccag	16	
60	<210> 57 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial		

<220>
<223> Sonda TS

5 <400> 57
ccaccatgat gtgc 14

10 <210> 58
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sonda TS

<400> 58
ctctgaaatc actgag 16

20 <210> 59
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador L

<400> 59
ctacacgaga tc 12

30 <210> 60
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda MUT

<400> 60
tctctaaaat cactga 16

40 <210> 61
<211> 111
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Fragmento de PIK3CA

<400> 61

50 **ttctacacga gatcctctct ctgaaatcac tgagcaggag aaagattttc tatggagtca 60**
caggtaagtg ctaaaatgga gattctctgt ttctttttct ttattacaga a 111

55 <210> 62
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Cebador L

<400> 62
ctgtaataaa gaaaaagaaa cagagaatct ccattttagc acttacctgt gactccatag60

<210> 63
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial Cebador H
 5
 <220>
 <223> Cebador H (beta-1)
 <400> 63
 10 ctgagcaaga ggctttggag tatttcatga aacaaatg 38
 <210> 64
 <211> 60
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador H (beta-2)
 20 <400> 64
 tagccttaga taaaactgag caagaggctt tggagtattt catgaaacaa atgaatgatg60
 <210> 65
 <211> 100
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de PIK3CA
 30 <400> 65
 cctagcctta gataaaactg agcaagagggc tttggagtat ttcattgaaac aaatgaatga 60
 tgcacatcat ggtggctgga caacaaaaat ggattggatc 100
 35 <210> 66
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda MUT
 <400> 66
 45 ccaccatgac gtgca 15
 <210> 67
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador L
 <400> 67
 55 tccaatccat tttgttg 18
 <210> 68
 <211> 15
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda TS

<400> 68
 ccaccatgat gtgca 15

5 <210> 69
 <211> 3207
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*

10 <400> 69

atgcctccac gaccatcatc aggtgaactg tggggcatcc acttgatgcc cccaagaatc	60
ctagtagaat gtttactacc aaatggaatg atagtgaactt tagaatgcct ccgtgaggct	120
acattaataa ccataaagca tgaactatctt aaagaagcaa gaaaataccc cctccatcaa	180
cttcttcaag atgaatcttc ttacattttc gtaagtgtta ctcaagaagc agaaaggga	240
gaattttttg atgaaacaag acgactttgt gaccttcggc tttttcaacc ctttttaaaa	300
gtaattgaac cagtaggcaa ccgtgaagaa aagatcctca atcgagaaat tgggttttgct	360
atcggcacgc cagtgtgtga atttgatatg gttaaagatc cagaagtaca ggacttccga	420
agaaatattc tgaacgtttg taaagaagct gtggatctta gggacctcaa ttcacctcat	480
agtagagcaa tgtatgtcta tcctccaaat gtagaatctt caccagaatt gccaaagcac	540
atatataata aattagataa agggcaaata atagtgggtga tctgggtaat agtttctcca	600
aataatgaca agcagaagta tactctgaaa atcaaccatg actgtgtacc agaacaagta	660
attgctgaag caatcaggaa aaaaactcga agtatgttgc tatectctga acaactaaaa	720
ctctgtgttt tagaatatca gggcaagtat attttaaaag tgtgtggatg tgatgaatac	780
ttcctagaaa aatatcctct gagtcagtat aagtatataa gaagctgtat aatgcttggg	840
aggatgccca atttgatgtt gatggctaaa gaaagccttt attctcaact gccaatggac	900
tgtttttaca tgccatctta ttccagacgc atttccacag ctacaccata tatgaatgga	960
gaaacatcta caaaatccct ttgggttata aatagtgcac tcagaataaa aattctttgt	1020
gcaacctacg tgaatgtaaa tattcgagac attgataaga tctatgttcg aacagggtatc	1080
taccatggag gagaaccctt atgtgacaat gtgaacactc aaagagtacc ttgttccaat	1140
cccagggtgga atgaatggct gaattatgat atatacatc ctgatcttcc tcgtgctgct	1200
cgactttgcc tttccatttg ctctgttaaa ggccgaaagg gtgctaaaga ggaacactgt	1260

ccattggcat	ggggaaatat	aaacttgttt	gattacacag	acactctagt	atctggaaaa	1320
atggctttga	atctttggcc	agtacctcat	ggattagaag	atttgctgaa	ccctattggt	1380
gttactggat	caaatccaaa	taaagaaact	ccatgcttag	agttggagtt	tgactggttc	1440
agcagtgtgg	taaagttccc	agatatgtca	gtgattgaag	agcatgccaa	ttggtctgta	1500
tcccgagaag	caggatttag	ctattcccac	gcaggactga	gtaacagact	agctagagac	1560
aatgaattaa	gggaaaatga	caaagaacag	ctcaaagcaa	ttctacacg	agatcctctc	1620
tctgaaatca	ctgagcagga	gaaagatttt	ctatggagtc	acagacacta	ttgtgtaact	1680
atccccgaaa	ttctacccaa	attgcttctg	tctgttaaata	ggaattctag	agatgaagta	1740
gccagatgt	attgcttggt	aaaagattgg	cctccaatca	aacctgaaca	ggctatggaa	1800
cttctggact	gtaattaccc	agatcctatg	gttcgagggt	ttgctgttcg	gtgcttggaa	1860
aaatatttaa	cagatgacaa	actttctcag	tatttaattc	agctagtaca	ggtcctaaaa	1920
tatgaacaat	atttgataa	cttgcttggt	agatctttac	tgaagaaagc	attgactaat	1980
caaaggattg	ggcacttttt	cttttggcat	ttaaaatctg	agatgcacaa	taaaacagtt	2040
agccagaggt	ttggcctgct	tttgaggtcc	tattgtcgtg	catgtgggat	gtatttgaag	2100
cacctgaata	ggcaagtcca	ggcaatggaa	aagctcatta	acttaactga	cattctcaaa	2160
caggagaaga	aggatgaaac	acaaaaggta	cagatgaagt	ttttagttga	gcaaagagg	2220
cgaccagatt	tcatggatgc	tctacagggc	tttctgtctc	ctctaaaacc	tgctcatcaa	2280
ctaggaaacc	tcaggcttga	agagtgtcga	attatgtcct	ctgcaaaaag	gccactgtgg	2340
ttgaattggg	agaaccacga	catcatgtca	gagttactgt	ttcagaacaa	tgagatcatc	2400
tttaaaaatg	gggatgattt	acggcaagat	atgctaacac	ttcaaattat	togtattatg	2460
gaaaatatct	ggcaaaatca	aggtcttgat	cttcgaatgt	taccttatgg	ttgtctgtca	2520
atcggtgact	gtgtgggact	tattgaggtg	gtgcgaaatt	ctcacactat	tatgcaaatt	2580
cagtgc aaaag	gcggcttgaa	aggtgcactg	cagttcaaca	gccacacact	acatcagtgg	2640
ctcaaagaca	agaacaaagg	agaaatatat	gatgcagcca	ttgacctgtt	tacacgttca	2700
tgtgctggat	actgtgtagc	taccttcatt	ttgggaattg	gagatcgtca	caatagtaac	2760
atcatggtga	aagacgatgg	acaactgttt	catatagatt	ttggacactt	tttggatcac	2820
aagaagaaaa	aatttggtta	taaacgagaa	cgtgtgccat	ttgttttgac	acaggatttc	2880
ttaatagtga	ttagtaaagg	agcccaagaa	tgacacaaaga	caagagaatt	tgagaggttt	2940
caggagatgt	gttacaaggc	ttatctagct	attcgacagc	atgccaatct	cttcataaat	3000
cttttctcaa	tgatgcttgg	ctctggaatg	ccagaactac	aatcttttga	tgacattgca	3060
tacattcgaa	agaccctagc	cttagataaa	actgagcaag	aggctttgga	gtatttcatg	3120
aaacaaatga	atgatgcaca	tcatggtggc	tggaacaaca	aatggattg	gatcttccac	3180

acaattaaac agcatgcatt gaactga

3207

<210> 70
<211> 2301
<212> ADN
<213> *Homo Sapiens*
<400> 70

5

atggcggcgc tgagcgggtgg cgggtggtggc ggcgcgggagc cgggccaggc tctgttcaac	60
ggggacatgg agcccgaggc cggcgccggc gccggcgccg cggcctcttc ggctgcggac	120
cctgccattc cggaggaggt gtggaatatc aaacaaatga ttaagttgac acaggaacat	180
atagaggccc tattggacaa atttggtggg gagcataatc caccatcaat atatctggag	240
gcctatgaag aatacaccag caagctagat gcactccaac aaagagaaca acagttattg	300
gaatctctgg ggaacggaac tgatttttct gtttctagct ctgcatcaat ggataccgtt	360
acatcttctt cctcttctag cctttcagtg ctaccttcac ctctttcagt ttttcaaaat	420
cccacagatg tggcacggag caaccccaag tcaccacaaa aacctatcgt tagagtcttc	480
ctgcccacaa aacagaggac agtggtagct gcaagggtgtg gagttacagt ccgagacagt	540
ctaaagaaag cactgatgat gagaggtcta atcccagagt gctgtgctgt ttacagaatt	600
caggatggag agaagaaacc aattggttgg gacactgata tttcctggct tactggagaa	660
gaattgcatg tggaagtgtt ggagaatgtt ccacttacia cacacaactt tgtacgaaaa	720
acgtttttca ccttagcatt ttgtgacttt tgtcgaaagc tgcttttcca gggtttccgc	780
tgtcaaacat gtggttataa atttcaccag cgttgtagta cagaagttcc actgatgtgt	840
gttaattatg accaacttga tttgctgttt gtctccaagt tctttgaaca ccaccaata	900
ccacaggaag aggcgtcctt agcagagact gccctaacat ctggatcatc cccttccgca	960
cccgctcgg actctattgg gcccacaaat ctaccagtc cgtctccttc aaaatccatt	1020
ccaattcac agcccttcgg accagcagat gaagatcatc gaaatcaatt tgggcaacga	1080
gaccgatcct catcagctcc caatgtgcat ataaacacaa tagaacctgt caatattgat	1140
gacttgatta gagaccaagg atttcgtggt gatggaggat caaccacagg tttgtctgct	1200
acccccctg cctcattacc tggctcacta actaacgtga aagccttaca gaaatctcca	1260
ggacctcagc gagaaaggaa gtcatcttca tcctcagaag acaggaatcg aatgaaaaca	1320
cttggttagac gggactcgag tgatgattgg gagattcctg atgggcagat tacagtggga	1380
caaagaattg gatctggatc atttggacaa gtctacaagg gaaagtggca tggatgatgtg	1440
gcagtgaaaa tgttgaaatgt gacagcacct acacctcagc agttacaagc cttcaaaaat	1500
gaagtaggag tactcaggaa aacacgacat gtgaatatcc tactcttcat gggctattcc	1560
acaaagccac aactggctat tgttaccagc tgggtgtgagg gctccagctt gtatcaccat	1620

ctccatatca ttgagaccaa atttgagatg atcaaaactta tagatattgc acgacagact	1680
gcacagggca tggattactt acacgccaag tcaatcatcc acagagacct caagagtaat	1740
aatatatttc ttcacgaaga cctcacagta aaaataggtg attttgggtct agctacagtg	1800
aaatctcgat ggagtgggtc ccatcagttt gaacagttgt ctggatccat tttgtggatg	1860
gcaccagaag tcatcagaat gcaagataaa aatccatata gctttcagtc agatgtatat	1920
gcatttgga ttgttctgta tgaattgatg actggacagt taccttattc aaacatcaac	1980
aacagggacc agataatttt tatggtggga cgaggatacc tgtctccaga tctcagtaag	2040
gtacggagta actgtccaaa agccatgaag agattaatgg cagagtgcct caaaaagaaa	2100
agagatgaga gaccactctt tccccaaatt ctgcctcta ttgagctgct ggcccgcctca	2160
ttgccaaaaa ttcaccgcag tgcacagaa cctccttga atcgggctgg tttccaaaca	2220
gaggatttta gtctatatgc ttgtgcttct ccaaaaacac ccatccaggc agggggatat	2280
ggtgcgtttc ctgtccactg a	2301

<210> 71
 <211> 3633
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*

 <400> 71

atgcgaccct cggggacggc cggggcagcg ctccctggcg tgctggctgc gctctgccc	60
gcgagtcggg ctctggagga aaagaaagtt tgccaaggca cgagtaacaa gctcacgcag	120
ttgggcactt ttgaagatca ttttctcagc ctccagagga tgttcaataa ctgtgaggtg	180
gtccttggga atttggaat tacctatgtg cagaggaatt atgatcttc cttcttaaag	240
accatccagg aggtggctgg ttatgtcctc attgccctca acacagtga gcaattcct	300
ttggaaaacc tgcagatcat cagaggaaat atgtactacg aaaattccta tgccttagca	360
gtcttatcta actatgatgc aaataaaacc ggactgaagg agctgccat gagaaattta	420
caggaaatcc tgcattggcg cgtgcggttc agcaacaacc ctgccctgtg caacgtggag	480
agcatccagt ggcgggacat agtcagcagt gactttctca gcaacatgtc gatggacttc	540
cagaaccacc tgggcagctg ccaaaaagtgt gatccaagct gtccaatgg gagctgctgg	600
ggtgcaggag aggagaactg ccagaaaactg accaaaatca tctgtgcca gcagtgtcc	660
gggcgctgcc gtggcaagtc cccagtgac tgctgccaca accagtgtgc tgcaggctgc	720
acaggccccc gggagagcga ctgcctggtc tgccgcaaatt tccgagacga agccacgtgc	780
aaggacacct gccccccact catgctctac aacccccacca cgtaccagat ggatgtgaac	840
cccgagggca aatacagctt tgggtgccacc tgcgtgaaga agtgtccccg taattatgtg	900
gtgacagatc acggctcgtg cgtccgagcc tgtggggccg acagctatga gatggaggaa	960

gacggcgctcc gcaagtgtaa gaagtgcgaa gggccttgcc gcaaagtgtg taacggaata	1020
ggtattggtg aatttaaaga ctcaactctcc ataaatgcta cgaatattaa acacttcaaa	1080
aactgcacct ccatcagtgg cgatctccac atcctgccgg tggcatttag gggtgactcc	1140
ttcacacata ctctcctctt ggatccacag gaactggata ttctgaaaac cgtaaaggaa	1200
atcacaggggt ttttgctgat tcaggccttg cctgaaaaca ggacggacct ccatgccttt	1260
gagaacctag aaatcatagc cggcaggacc aagcaacatg gtcagttttc tcttgcatc	1320
gtcagcctga acataacatc cttgggatta cgctccctca aggagataag tgatggagat	1380
gtgataattt caggaaacaa aaatttgtgc tatgcaaata caataaactg gaaaaaactg	1440
tttgggacct ccggtcagaa aacccaaaatt ataagcaaca gaggtgaaaa cagctgcaag	1500
gccacaggcc aggtctgcca tgccttgtgc tccccgagg gctgctgggg cccggagccc	1560
agggactgcg tctcttgccg gaatgtcagc cgaggcaggg aatgcgtgga caagtgcac	1620
cttctggagg gtgagccaag ggagtttgtg gagaactctg agtgcataca gtgccacca	1680
gagtgcctgc ctcaggccat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga caactgtatc	1740
cagtgtgccc actacattga cggcccccac tgcgtcaaga cctgcccggc aggagtcag	1800
ggagaaaaca acaccctggt ctggaagtac gcagacgccg gccatgtgtg ccacctgtgc	1860
catccaaact gcacctacgg atgcactggg ccaggctctg aaggctgtcc aacgaatggg	1920
cctaagatcc cgtccatcgc cactgggatg gtggggggccc tctcttgcg gctggtggtg	1980
gccctgggga tcggcctctt catgcgaagg cgccacatcg ttcggaagcg cacgctgcgg	2040
aggctgctgc aggagaggga gcttgtggag cctcttacac ccagtggaga agctcccaac	2100
caagctctct tgaggatctt gaaggaaact gaattcaaaa agatcaaagt gctgggctcc	2160
ggtgcgttcg gcacgggtga taagggaact tggatcccag aagggtgagaa agttaaatt	2220
cccgtcgcta tcaaggaatt aagagaagca acatctccga aagccaacaa ggaaatcctc	2280
gatgaagcct acgtgatggc cagcgtggac aacccccacg tgtgcgcct gctgggcatc	2340
tgcctcacct ccaccgtgca gctcatcacg cagctcatgc ccttcggctg cctcctggac	2400
tatgtccggg aacacaaaga caatattggc tcccagtacc tgctcaactg gtgtgtgcag	2460
atcgcaaagg gcatgaacta cttggaggac cgctcgcttg tgcaaccgca cctggcagcc	2520
aggaacgtac tgggtgaaaac accgcagcat gtcaagatca cagattttgg gctggccaaa	2580
ctgctgggtg cggaagagaa agaataccat gcagaaggag gcaaagtgcc tatcaagtgg	2640
atggcattgg aatcaatttt acacagaatc tatacccacc agagtgatgt ctggagctac	2700
ggggtgactg tttgggagtt gatgacctt ggatccaagc catatgacgg aatccctgcc	2760
agcgagatct cctccatcct ggagaaagga gaacgcctcc ctgagccacc catatgtacc	2820

atcgatgtct acatgatcat ggtcaagtgc tggatgatag acgcagatag tgcgccaaag	2880
ttccgtgagt tgatcatcga attctccaaa atggcccagag acccccagcg ctaccttgtc	2940
attcaggggg atgaaagaat gcatttgcca agtcctacag actccaactt ctaccgtgcc	3000
ctgatggatg aagaagacat ggacgacgtg gtggatgccg acgagtacct catcccacag	3060
cagggcttct tcagcagccc ctccacgtca cggactcccc tctgagctc tctgagtgca	3120
accagcaaca attccaccgt ggcttgcatt gatagaaatg ggctgcaaag ctgtcccatc	3180
aaggaagaca gcttcttgca gcgatacagc tcagacccca caggcgcctt gactgaggac	3240
agcatagacg acaccttcct cccagtgcct gaatacataa accagtccgt tccccaaagg	3300
cccgtgggt ctgtgcagaa tcctgtctat cacaatcagc ctctgaacct cgcgccagc	3360
agagaccac actaccagga cccccacagc actgcagtgg gcaaccccg gtatctcaac	3420
actgtccagc ccacctgtgt caacagcaca ttgcacagcc ctgccactg ggcccagaaa	3480
ggcagccacc aaattagcct ggacaacct gactaccagc aggacttctt tccccaggaa	3540
gccaaagcaa atggcatctt taagggctcc acagctgaaa atgcagaata cctaagggtc	3600
gcgccacaaa gcagtgaatt tattggagca tga	3633

<210> 72
 <211> 567
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*

5

<400> 72

atgactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctggtggcg taggcaagag tgccttgacg	60
atacagctaa ttcagaatca ttttgtggac gaatatgac caacaataga ggattcctac	120
aggaagcaag tagtaattga tggagaaacc tgtctcttgg atattctoga cacagcaggt	180
caagaggagt acagtgcaat gagggaccag tacatgagga ctggggaggg ctttctttgt	240
gtatttgcca taaataatac taaatcattt gaagatatcc accattatag agaacaaatt	300
aaaagagtta aggactctga agatgtacct atggctctag taggaaataa atgtgatttg	360
ccttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tggaattcct	420
tttattgaaa catcagcaaa gacaagacag ggtgttgatg atgccttcta tacattagtt	480
cgagaaattc gaaaacataa agaaaagatg agcaaagatg gtaaaaagaa gaaaaagaag	540
tcaaagacaa agtgtgtaatt tatgtaa	567

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana o la detección de la presencia de una secuencia variante en una secuencia de ácidos nucleicos diana en una muestra, que comprende las etapas de
 - a) proporcionar una muestra que comprende ácidos nucleicos de molde
 - b) proporcionar un conjunto de cebadores que comprende al menos un par de cebadores específicamente capaces de la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana, en donde el conjunto de cebadores al menos comprende un cebador H y un cebador L, en donde la temperatura de fusión de cebador H es al menos 16 °C mayor, tal como al menos 20 °C mayor, que la temperatura de fusión del cebador L y en donde el cebador L contiene una secuencia complementaria de un fragmento del producto de elongación de cebador H,
 - c) proporcionar una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad de polimerasa a una temperatura de elongación,
 - d) preparar reacciones de PCR divididas que comprenden cada una de ellas una parte de la muestra, el conjunto de cebadores, la polimerasa de ácido nucleico, reactivos de PCR y opcionalmente reactivos de detección
 - e) llevar a cabo una reacción de polimerasa incremental asimétrica (AIPR) que comprende las etapas de:
 - i. incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de desnaturalización, lo que desnaturaliza así el ADN en moléculas monocatenarias
 - ii. incubar las reacciones de PCR divididas a una elevada temperatura de hibridación que permite la hibridación del cebador H, pero no del cebador L,
 - iii. opcionalmente incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de elongación,
 - iv. opcionalmente repetir las etapas i a iii,
 - v. amplificar así solo una cadena de la secuencia de ácidos nucleicos diana
 - f) llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que comprende las etapas de:
 - 1) incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de la desnaturalización, lo que desnaturaliza así el ADN en moléculas monocatenarias
 - 2) incubar la PCR a una baja temperatura de hibridación que permite la hibridación tanto del cebador H como del cebador L,
 - 3) incubar la PCR a la temperatura de elongación, lo que permite así la extensión de los cebadores alineados
 - 4) opcionalmente repetir las etapas II a IV,
 - 5) amplificar así ambas cadenas de la secuencia de ácidos nucleicos diana para obtener un producto de PCR
 - g) detectar si el producto de PCR comprende la secuencia de ácidos nucleicos diana o la secuencia variante en la secuencia de ácidos nucleicos diana.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia variante es una mutación de nucleótidos simples.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la AIPR de la etapa e) comprende las etapas de:
 - i. incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de la desnaturalización, lo que desnaturaliza así el ADN en moléculas monocatenarias
 - ii. incubar las reacciones de PCR divididas a una elevada temperatura de hibridación que permite la hibridación del cebador H, pero no del cebador L, en donde la elevada temperatura de hibridación también es la temperatura de elongación, lo que permite así la extensión del cebador H alineado;
 - iii. repetir las etapas i a ii,
 - iv. amplificar así sólo una cadena de la secuencia de ácidos nucleicos diana.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cebador H es el único cebador en el conjunto de cebadores que tiene una temperatura de fusión al menos 16 °C mayor que la temperatura de fusión del cebador L.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el conjunto de cebadores comprende más de un par de cebadores capaces de la amplificación de diferentes secuencias de ácidos nucleicos diana.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cebador H tiene una temperatura de fusión al menos 16 °C mayor que la temperatura de fusión de cualquier otro cebador dentro del conjunto de cebadores, que junto con el cebador H es capaz de la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el conjunto de cebadores no comprende ningún cebador:

- a) que tenga una temperatura de fusión que está en el intervalo de ± 15 °C, con preferencia, en el intervalo de ± 20 °C, tal como en el intervalo de ± 25 °C de la temperatura de fusión del cebador H; y
- b) que, junto con el cebador H, pueda constituir un par de cebadores específicamente capaces de la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la elevada temperatura de hibridación en la etapa e) es al menos 10 °C mayor, con preferencia al menos 15 °C mayor, por ejemplo, al menos 20 °C mayor que la temperatura de fusión del cebador L.

9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa e) da como resultado la elongación del cebador H, pero en ninguna elongación detectable de cualquier otro cebador.

10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cebador L es un cebador L modificado por apareamiento fallido y el método comprende una etapa de PCR a baja temperatura entre las etapas e) y f), en donde la PCR a baja temperatura comprende las etapas de:

- 1) incubar las reacciones de PCR divididas a la temperatura de desnaturalización, lo que desnaturaliza así el ADN en moléculas monocatenarias
- 2) incubar la PCR a una muy baja temperatura de hibridación que permite la hibridación tanto del cebador H como de la parte no apareante del cebador L,
- 3) incubar la PCR a la temperatura de elongación, lo que permite así la extensión de los cebadores alineados
- 4) opcionalmente repetir las etapas 1) a 3), obteniendo así un producto de PCR.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la muy baja temperatura de hibridación es al menos 5 °C menor que la baja temperatura de hibridación.

12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en donde el cebador L es un oligonucleótido que consiste en:

- a) una secuencia 5' de 1 a 10 nucleótidos; y
- b) una secuencia consecutiva en el rango de 7 a 15 nucleótidos, que es idéntica o complementaria de un fragmento de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las reacciones de PCR divididas contienen cada una un reactivo de detección, que es una sonda de detección variante, siendo dicha sonda de detección variante capaz de hibridar en la secuencia de ácidos nucleicos diana que contiene la secuencia variante con una afinidad significativamente mayor que la secuencia de ácidos nucleicos diana que no contiene la secuencia variante y/o las reacciones de PCR divididas contienen cada una un reactivo de detección que es una sonda de detección de tipo silvestre, siendo dicha sonda de detección de tipo silvestre capaz de hibridar en la secuencia de ácidos nucleicos diana que no contiene la secuencia variante.

14. Un método de predicción de la presencia de una afección clínica en un individuo, en donde dicha afección clínica está ligada a la presencia de una secuencia variante en una secuencia de ácidos nucleicos diana o dicha afección clínica está ligada a la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana, comprendiendo dicho método las etapas de

- a) proporcionar una muestra de dicho individuo que comprende ácidos nucleicos de molde
- b) llevar a cabo el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13,

en donde la presencia de dicha secuencia variante en dicho ácido nucleico diana o la presencia de dicha secuencia de ácidos nucleicos diana son indicativas de la presencia de dicha afección clínica.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la afección clínica es cáncer.

16. Un kit de partes que comprende:

- a) un conjunto de cebadores que comprende al menos un par de cebadores específicamente capaces de la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos diana, en donde el conjunto de cebadores al menos comprende un cebador H y un cebador L, en donde la temperatura de fusión de cebador H es al menos 16 °C mayor que la temperatura de fusión del cebador L y en donde el cebador L contiene una secuencia complementaria del producto de elongación de cebador H,
- b) una sonda de detección que es capaz de hibridar en la secuencia de ácidos nucleicos diana, estando dicha sonda ligada a al menos un fluoróforo y al menos un desactivador

- c) una polimerasa de ácido nucleico;
- d) reactivos de PCR;
- e) reactivos para preparar gotas que contienen reacciones de PCR divididas.

5 17. El kit de partes de acuerdo con la reivindicación 16, en donde

- a) el cebador H comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 50 a 100 nucleótidos de SEQ ID NO:69 y el cebador L comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 10 a 20 nucleótidos de la secuencia complementaria de la SEQ ID NO:69; o
- 10 b) el cebador H comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 50 a 100 nucleótidos de la secuencia complementaria de la SEQ ID NO:69 y el cebador L comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 10 a 20 nucleótidos de la SEQ ID NO:69;

15 y en donde el cebador H y el cebador L juntos son capaces de amplificar una secuencia diana que comprende al menos uno de los nucleótidos 3140, 1624 o 1633 de la SEQ ID NO:69.

18. El kit de partes de acuerdo con la reivindicación 16, en donde

- 20 a) el cebador H comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 50 a 100 nucleótidos de la SEQ ID NO:70 y el cebador L comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 10 a 20 nucleótidos de la secuencia complementaria de la SEQ ID NO:70; o
- b) el cebador H comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 50 a 100 nucleótidos de la secuencia complementaria de la SEQ ID NO:70 y el cebador L comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 10 a 20 nucleótidos de la SEQ ID NO:70;

25 y en donde el cebador H y el cebador L juntos son capaces de amplificar una secuencia diana que comprende nucleótido 1799 de la SEQ ID NO:70.

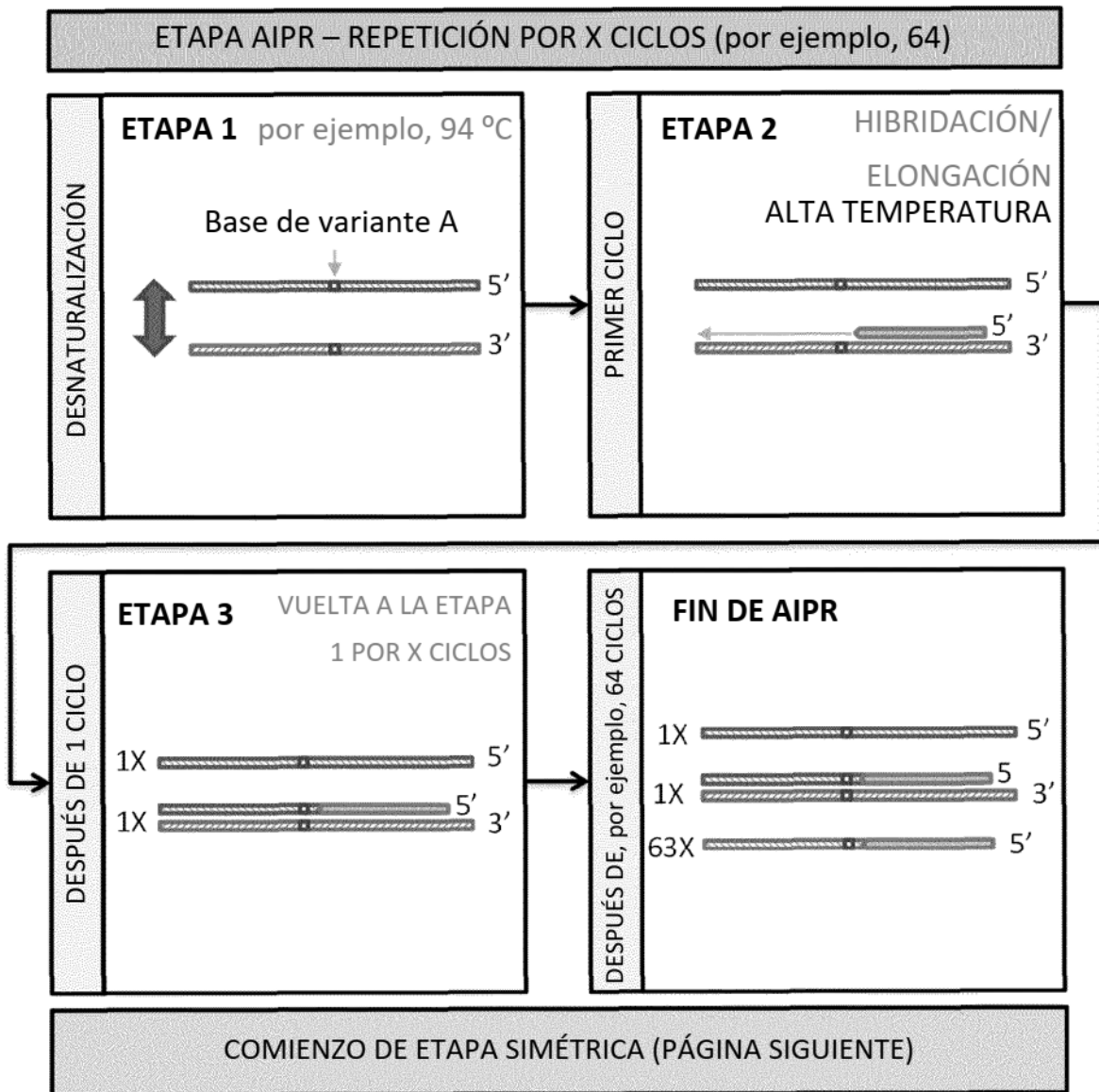
30 19. El kit de partes de acuerdo con la reivindicación 16, en donde

- a) el cebador H comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 50 a 100 nucleótidos de la SEQ ID NO:71 y el cebador L comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 10 a 20 nucleótidos de la secuencia complementaria de la SEQ ID NO:71; o
 - 35 b) el cebador H comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 50 a 100 nucleótidos de la secuencia complementaria de la SEQ ID NO:71 y el cebador L comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 10 a 20 nucleótidos de SEQ ID NO:71;
- y en donde el cebador H y el cebador L juntos son capaces de amplificar una secuencia diana que comprende al menos uno de los nucleótidos 2573 o 2369 de la SEQ ID NO:71.

40 20. El kit de partes de acuerdo con la reivindicación 16, en donde

- a) el cebador H comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 50 a 100 nucleótidos de la SEQ ID NO:72 y el cebador L comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 10 a 20 nucleótidos de la secuencia complementaria de la SEQ ID NO:72; o
- 45 b) el cebador H comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 50 a 100 nucleótidos de la secuencia complementaria de la SEQ ID NO:72 y el cebador L comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 10 a 20 nucleótidos de la SEQ ID NO:72;

50 y en donde el cebador H y el cebador L juntos son capaces de amplificar una secuencia diana que comprende al menos los nucleótidos 34, 35 o 38 de la SEQ ID NO:72.



LEYENDA:

Base de variante A	Cebador H	Secuencia diana (cadena positiva)	Secuencia diana (cadena negativa)
■	— 5'	3' — 5'	5' — 3'

Fig. 1A

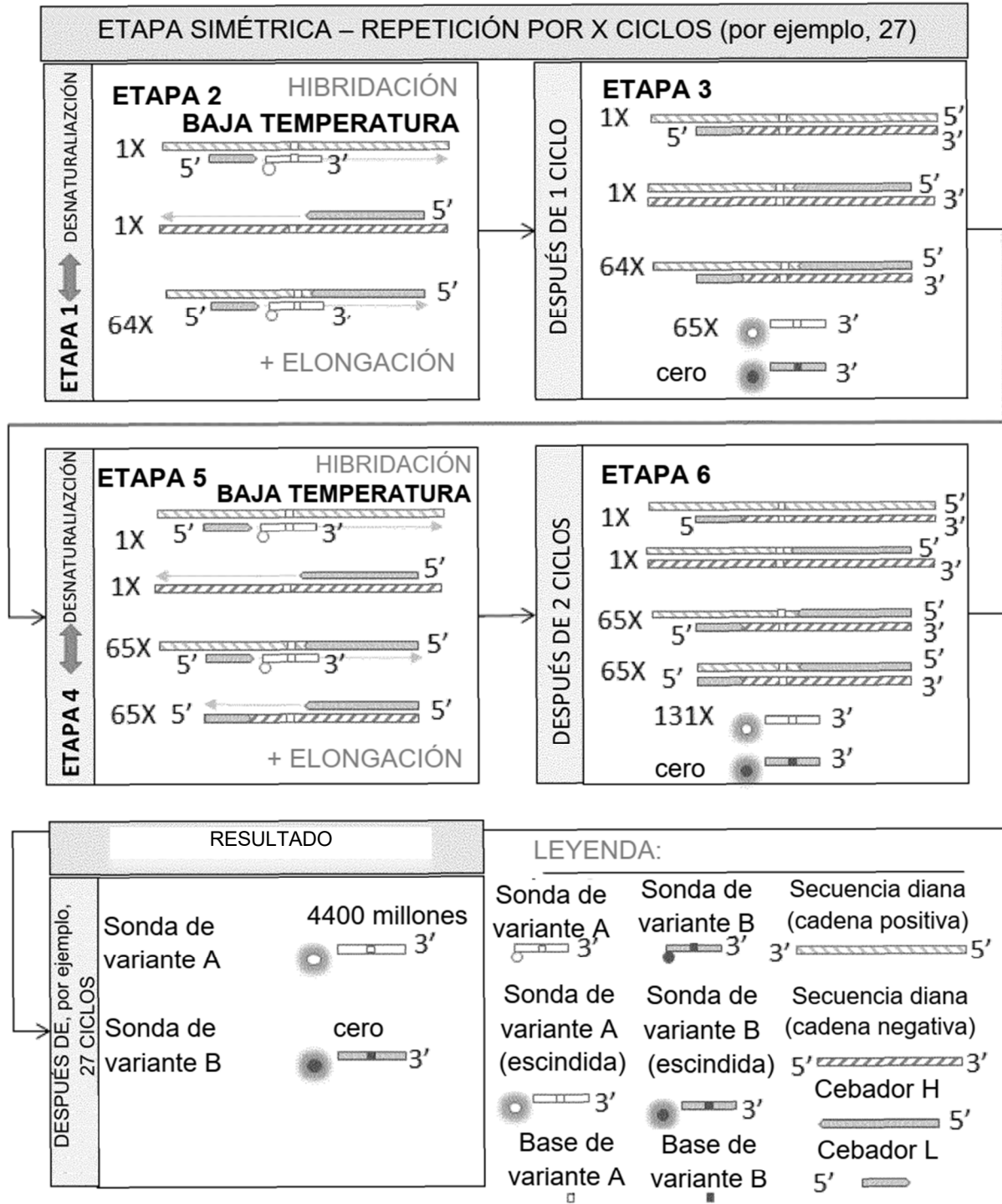
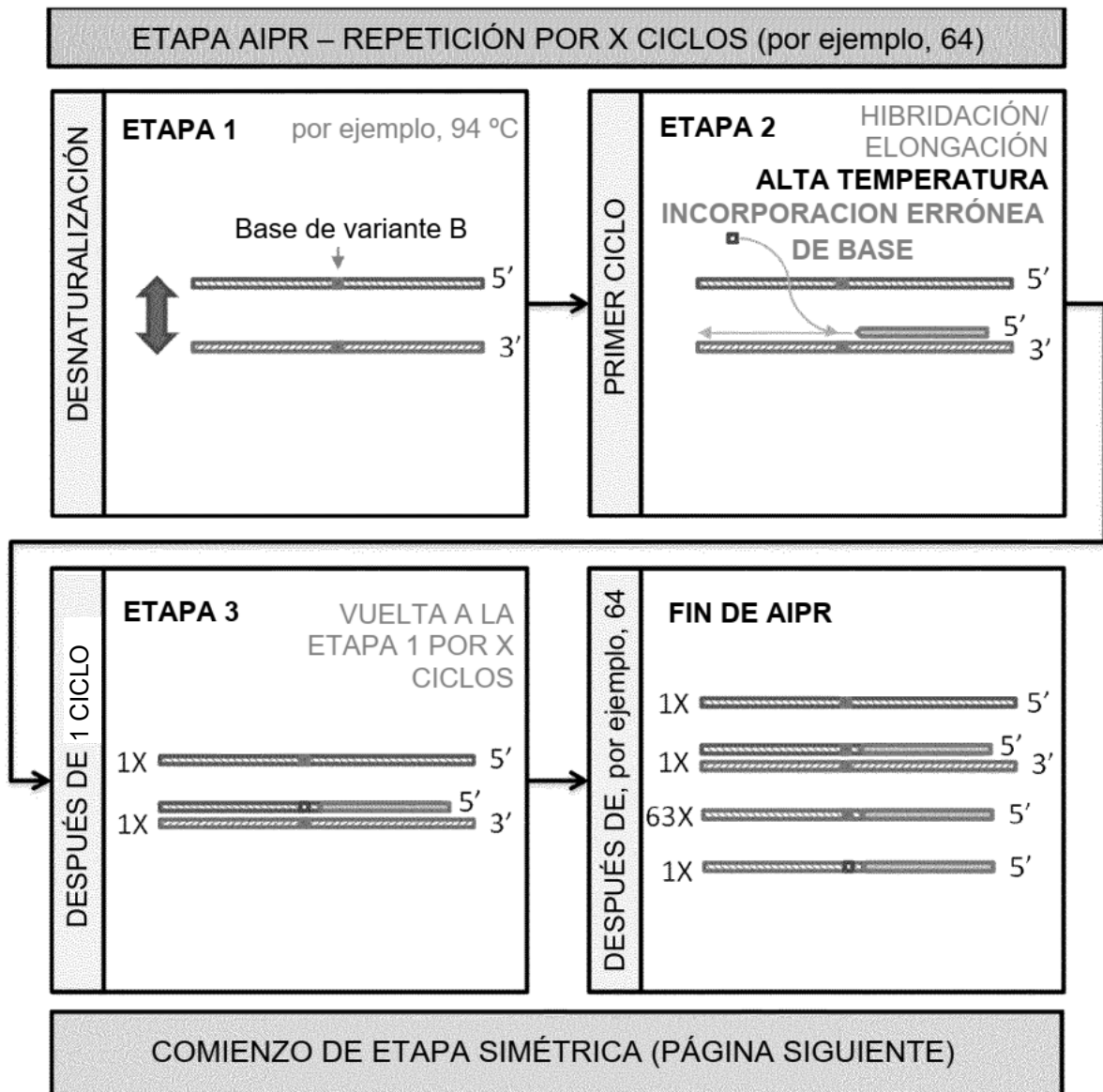


Fig. 1A continuación



LEYENDA:

Sonda de variante A	Sonda de variante B	Cebador H	Secuencia diana (cadena positiva)
			Secuencia diana (cadena negativa)

Fig. 1B

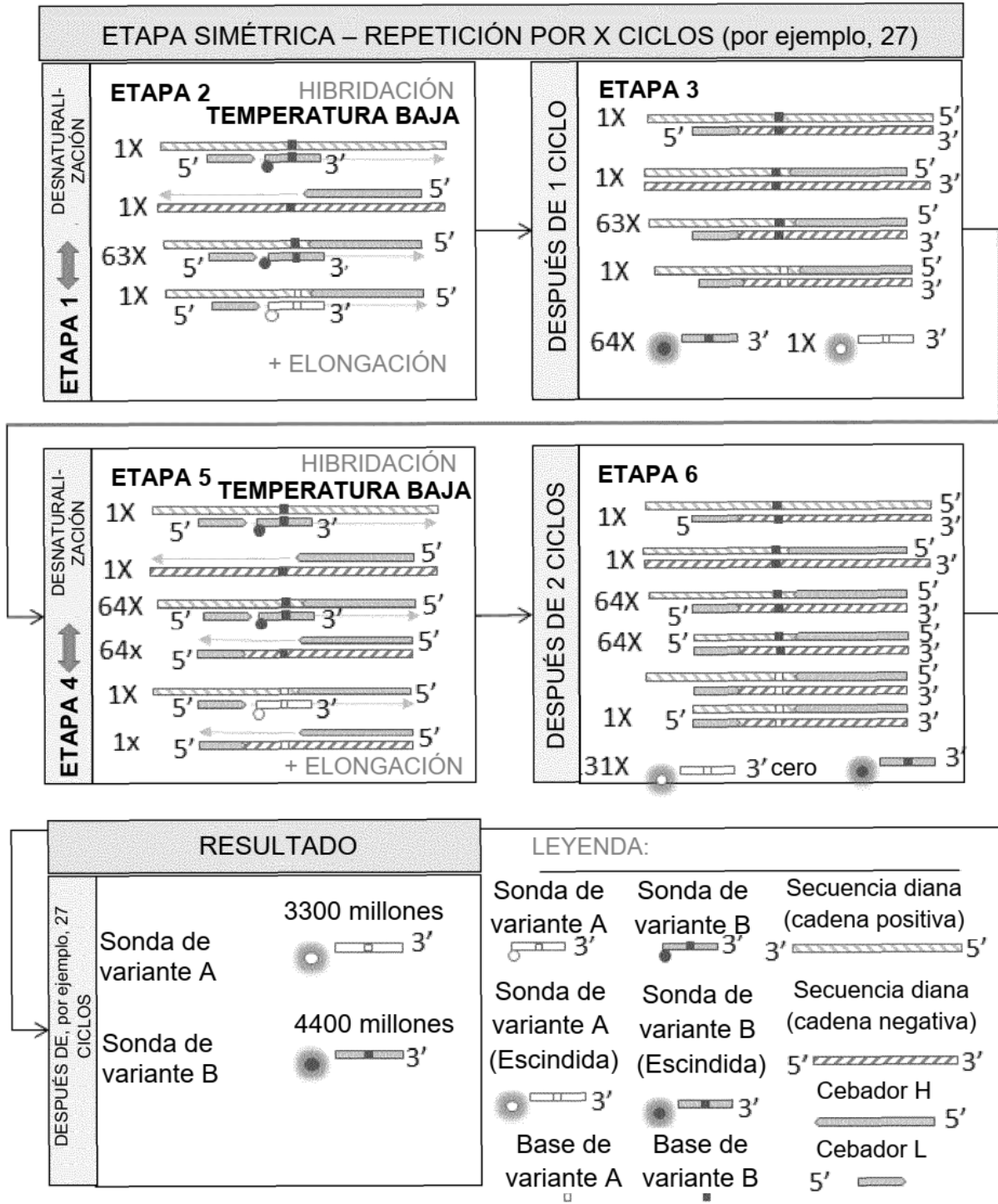


Fig. 1B continuación

PIK3CA c.3140A>G (H1047R)



Fig. 2

PIK3CA c.1624G>A (E542K)



Fig. 2 - Continuación

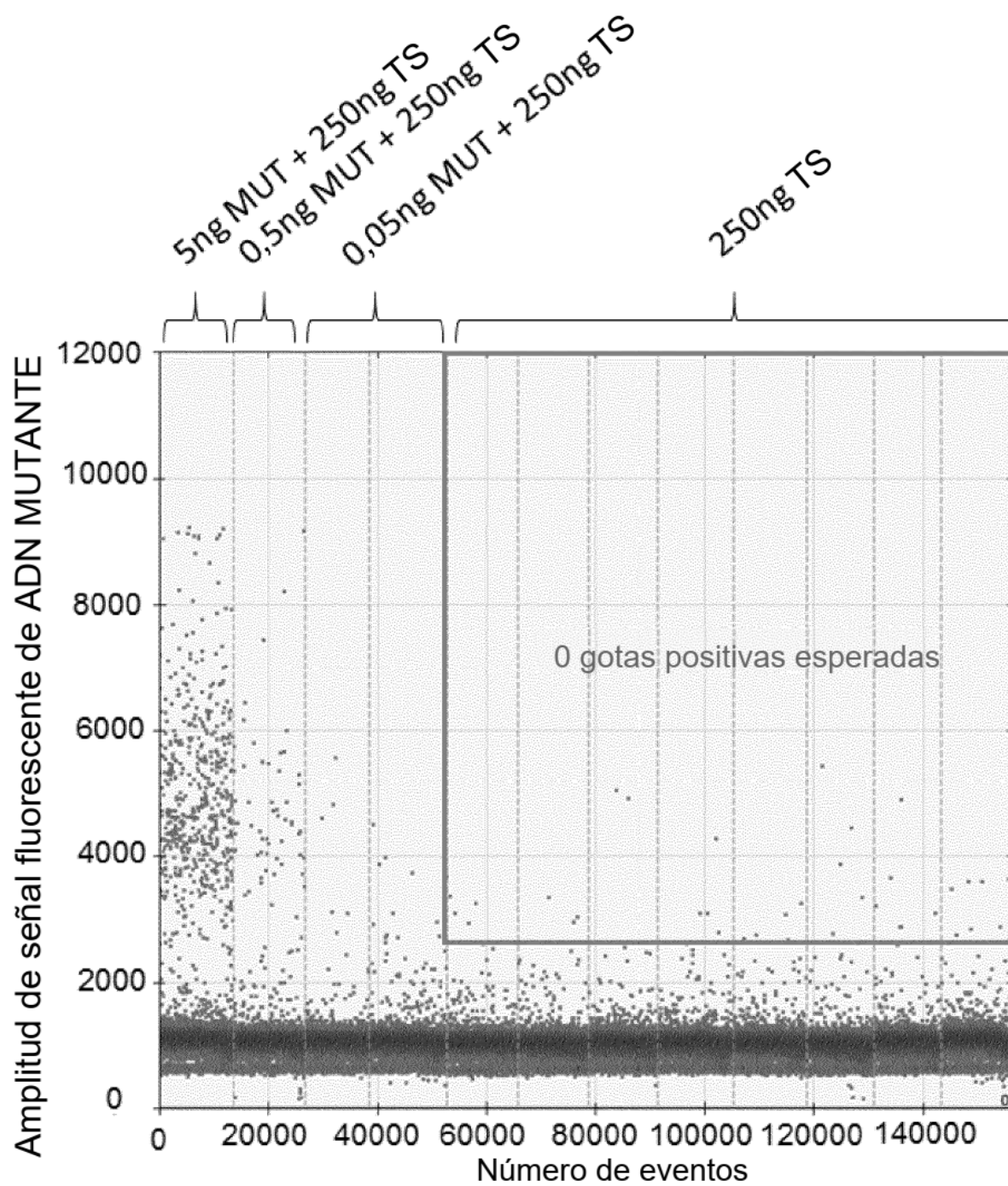


Fig. 3A

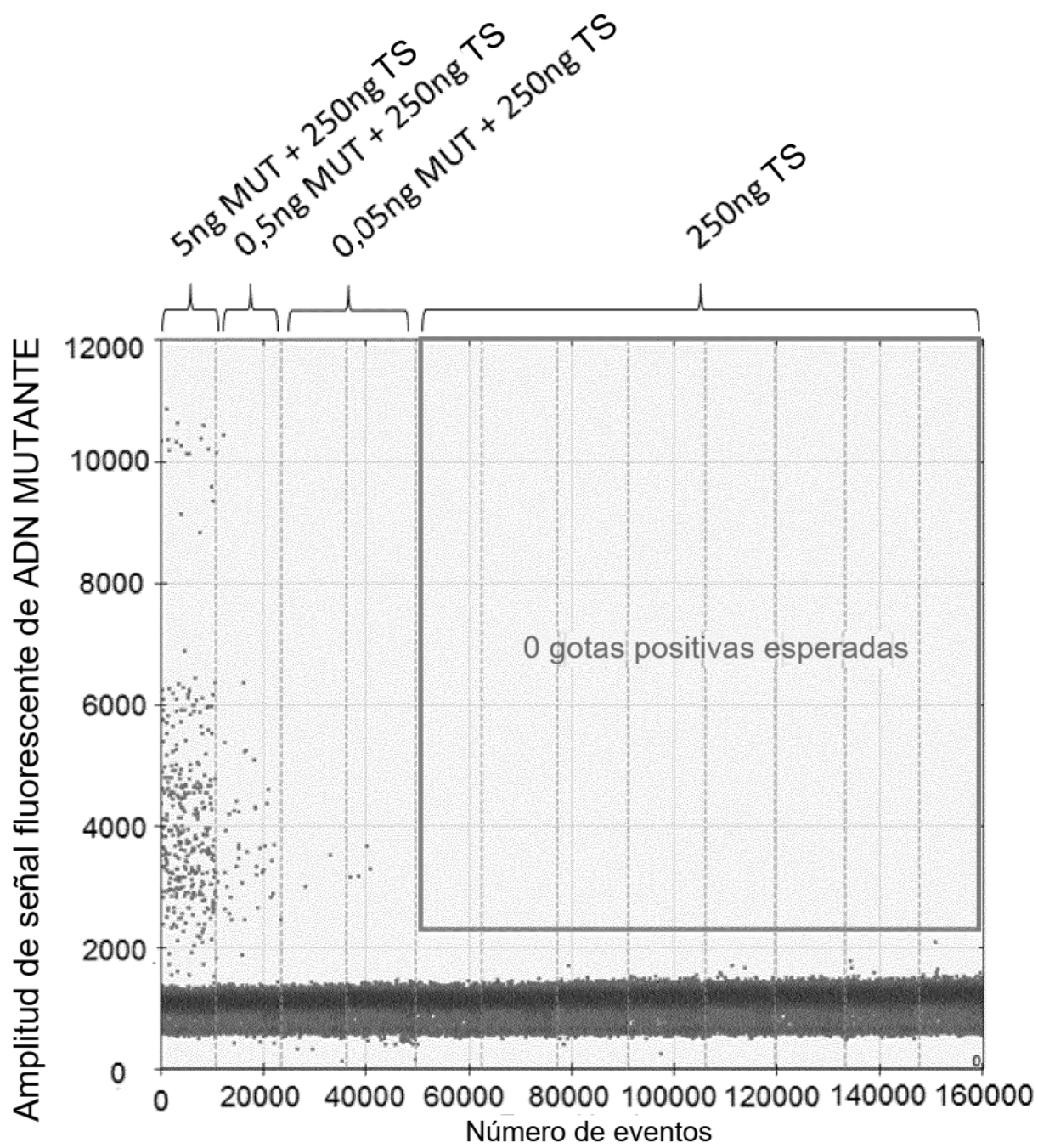


Fig. 3B

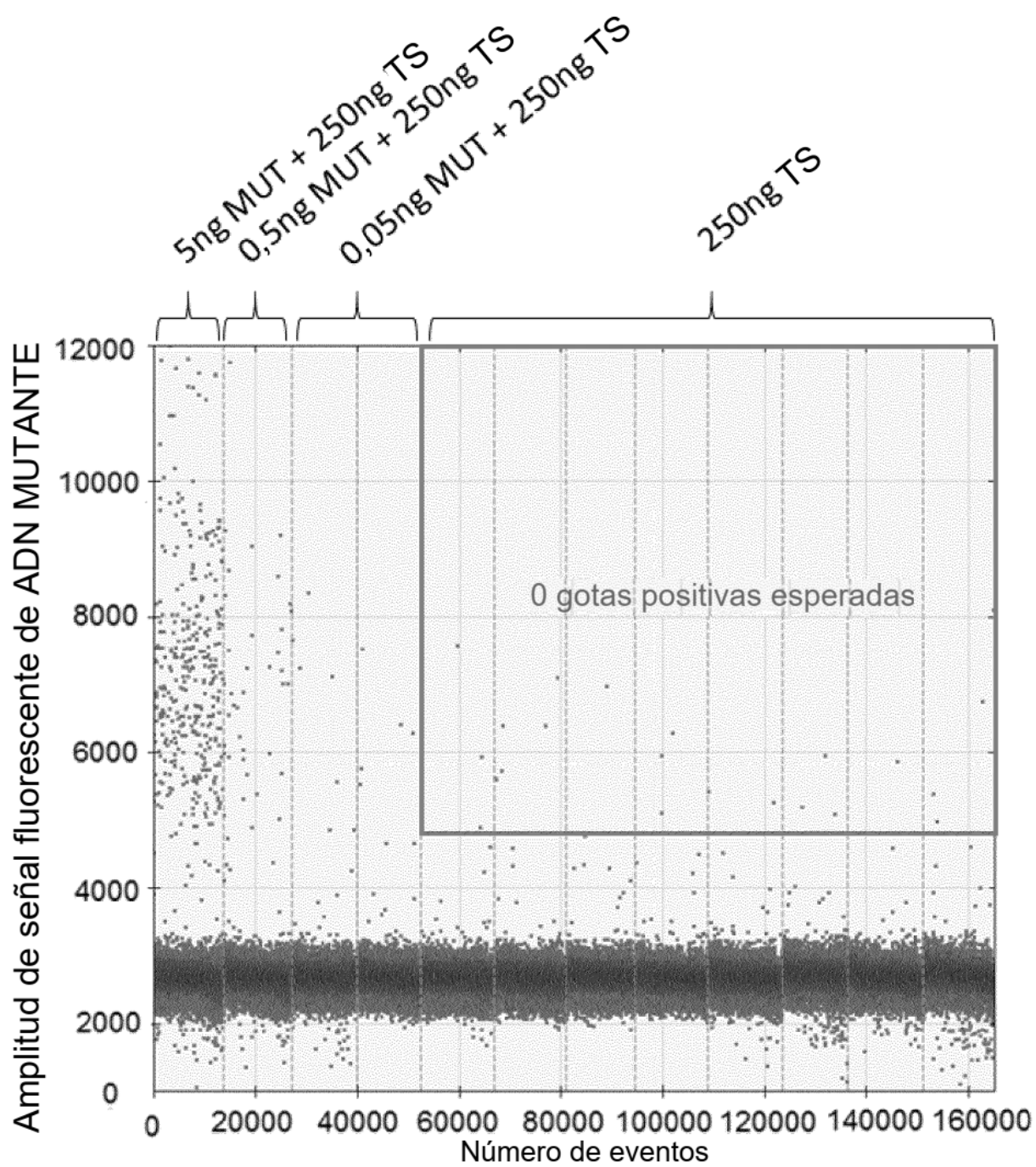


Fig. 3C

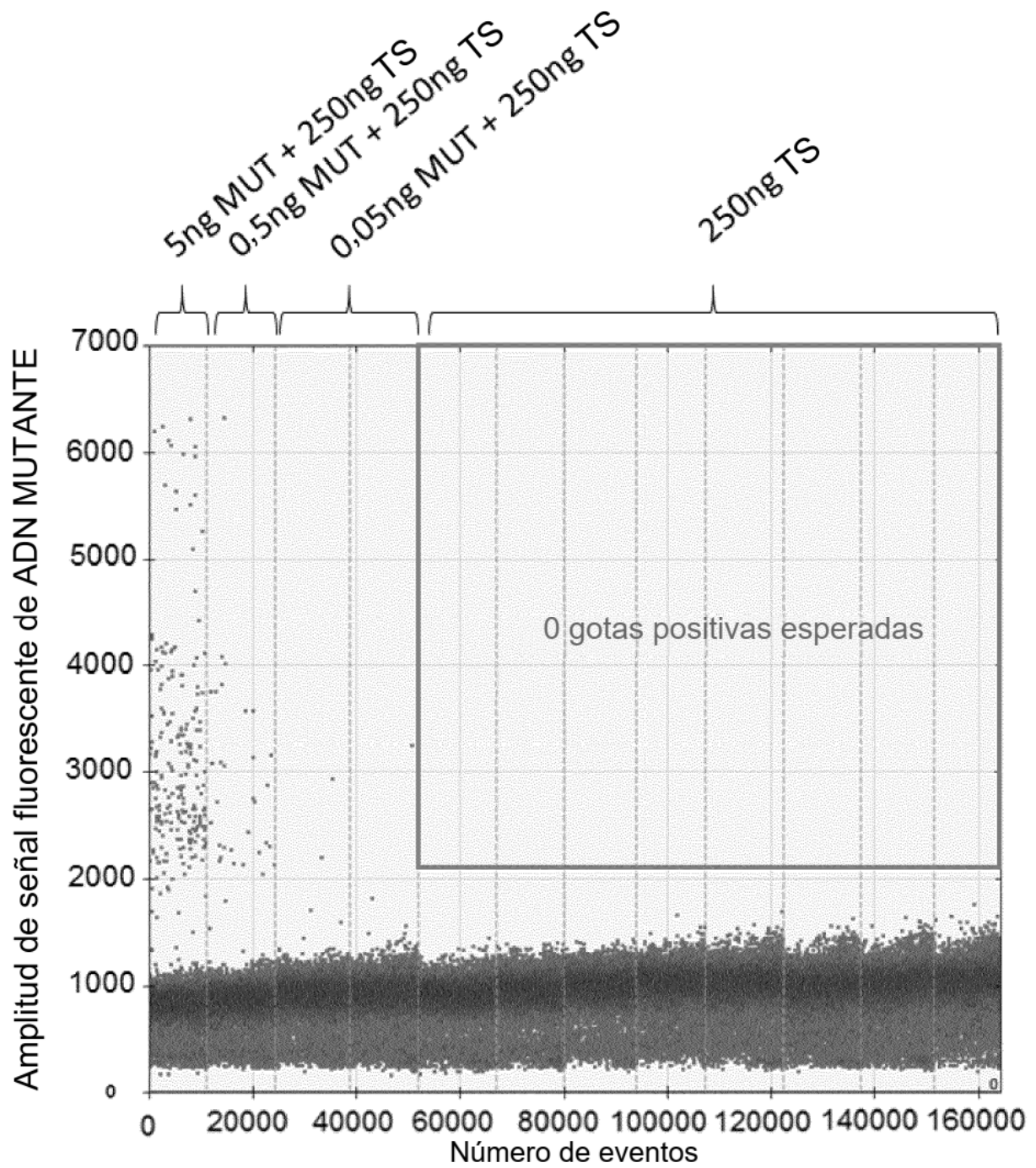


Fig. 3D

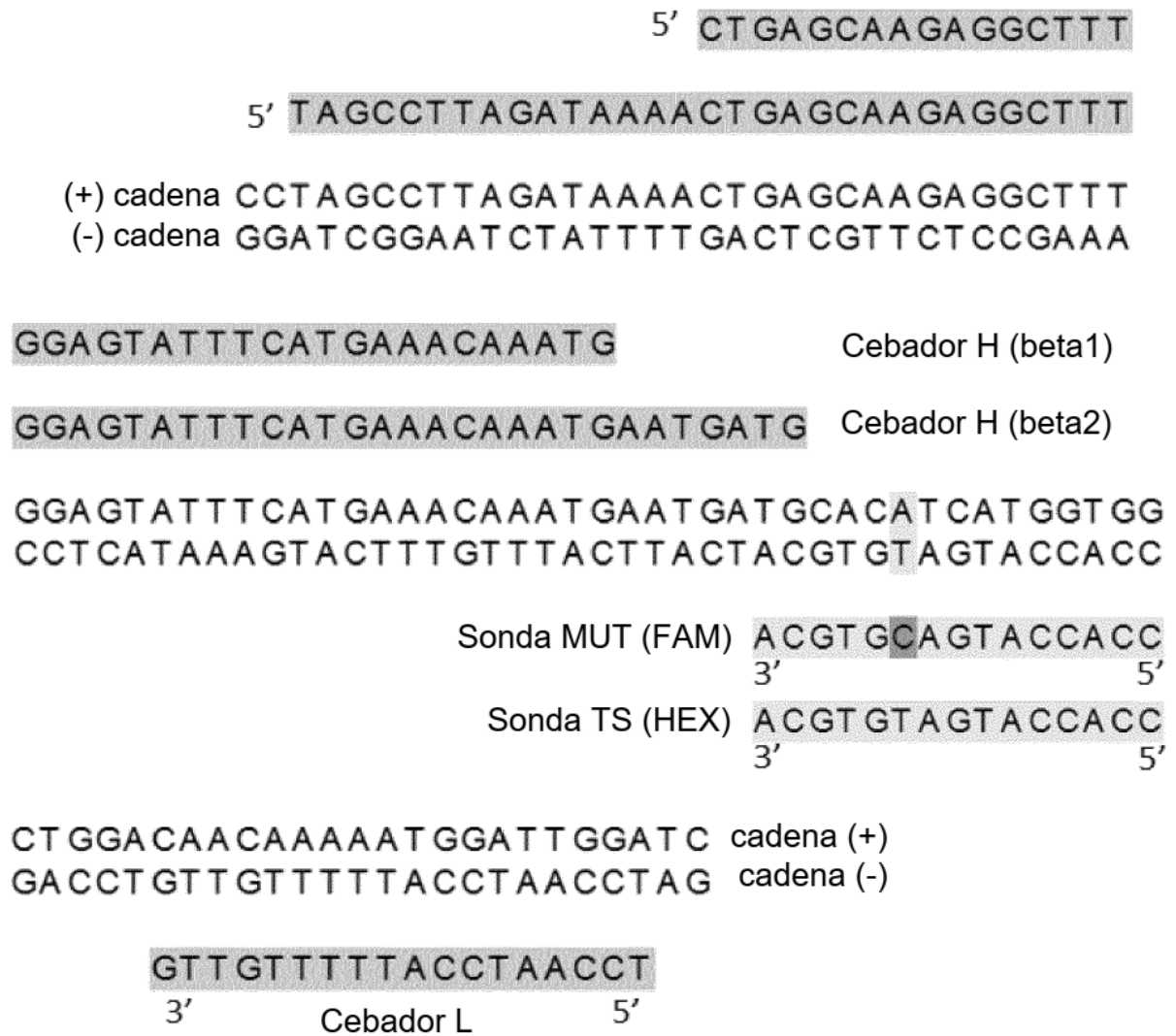
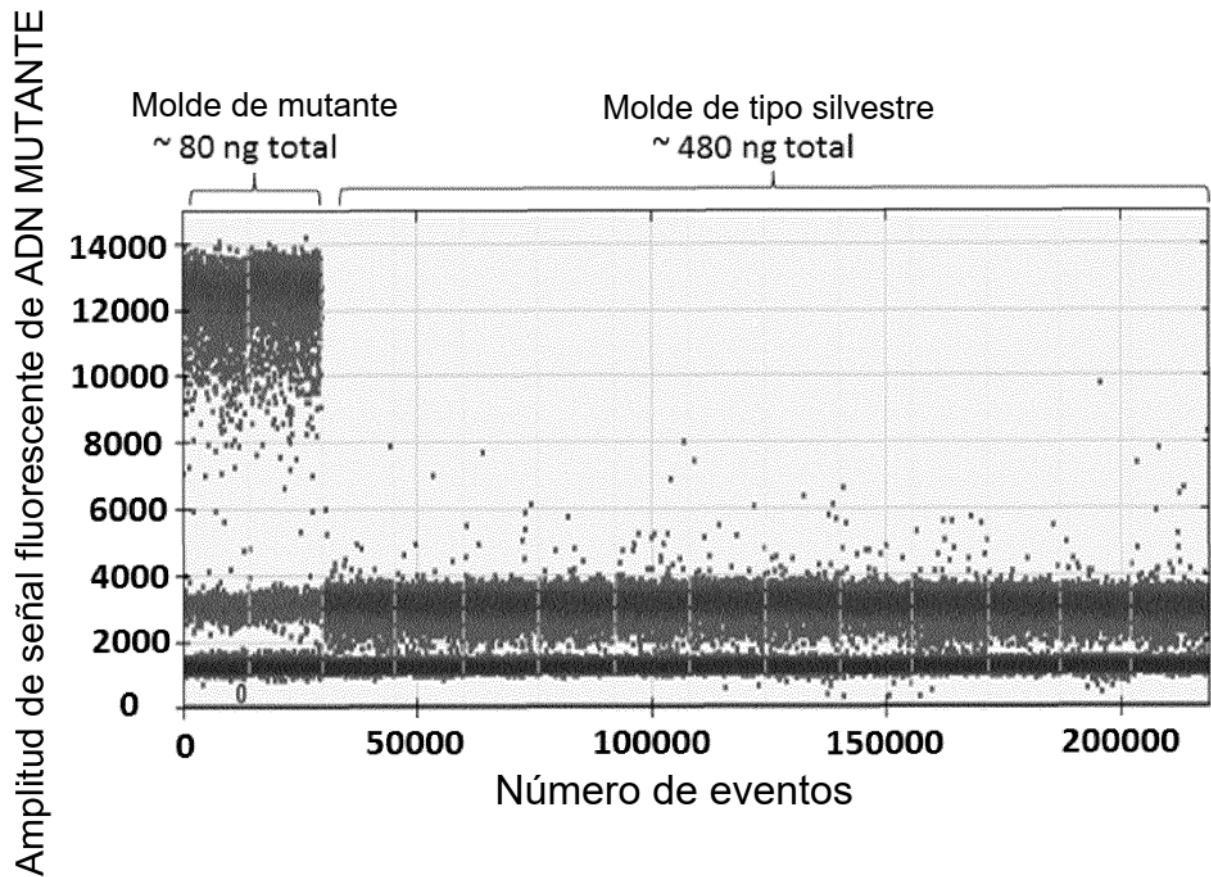


Fig. 4



PROGRAMA DEL TERMOCICLADOR:

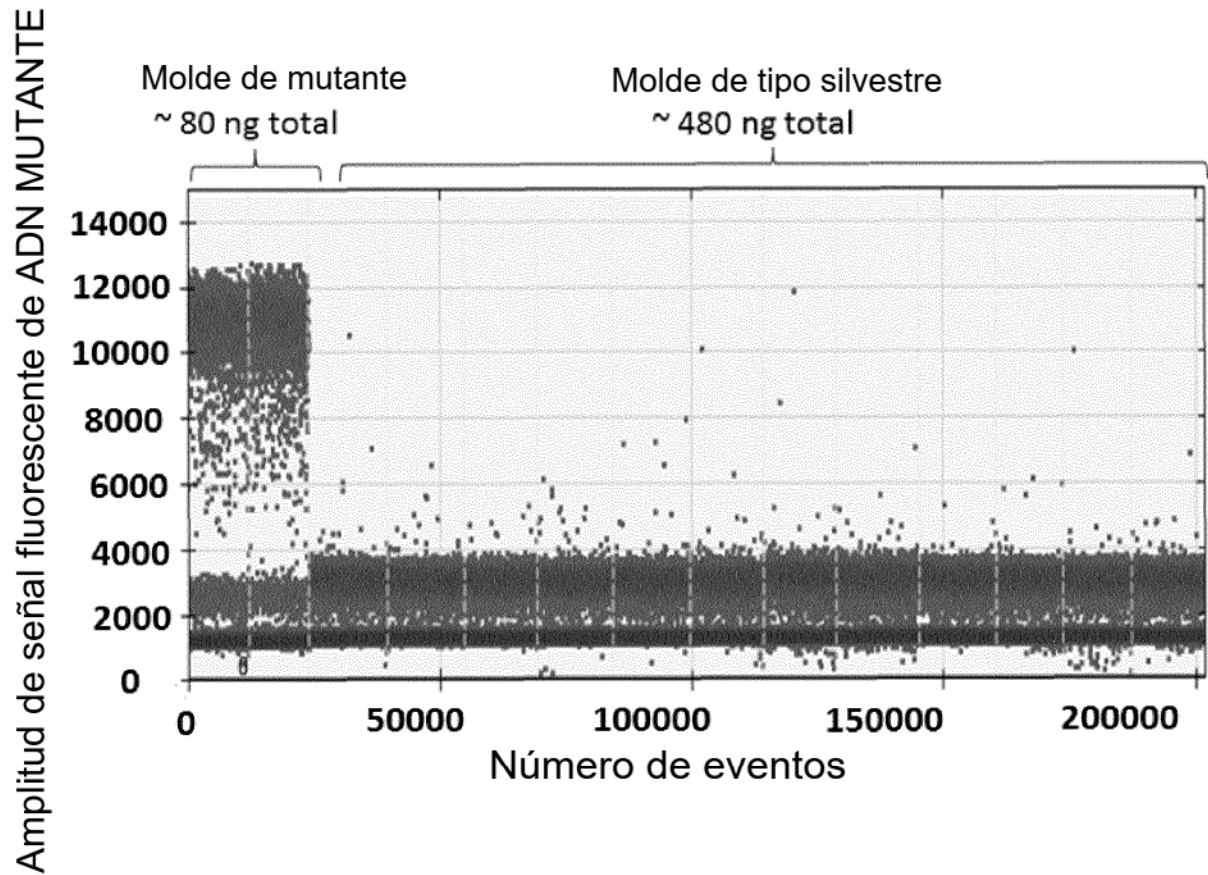
95° C – 10 min

SIN AIPR

Repetición de 35 ciclos:

94° C – 10 seg	}	PCR SIMÉTRICA EXPONENCIAL
52° C – 30 seg		
72° C – 30 seg		
98° C – 10 min		

Fig. 5A



PROGRAMA DEL TERMOCICLADOR:

95° C – 10 min

Repetición de 64 ciclos:

94° C – 10 seg

67° C – 45 seg

AIPR

Repetición de 25 ciclos:

94° C – 10 seg

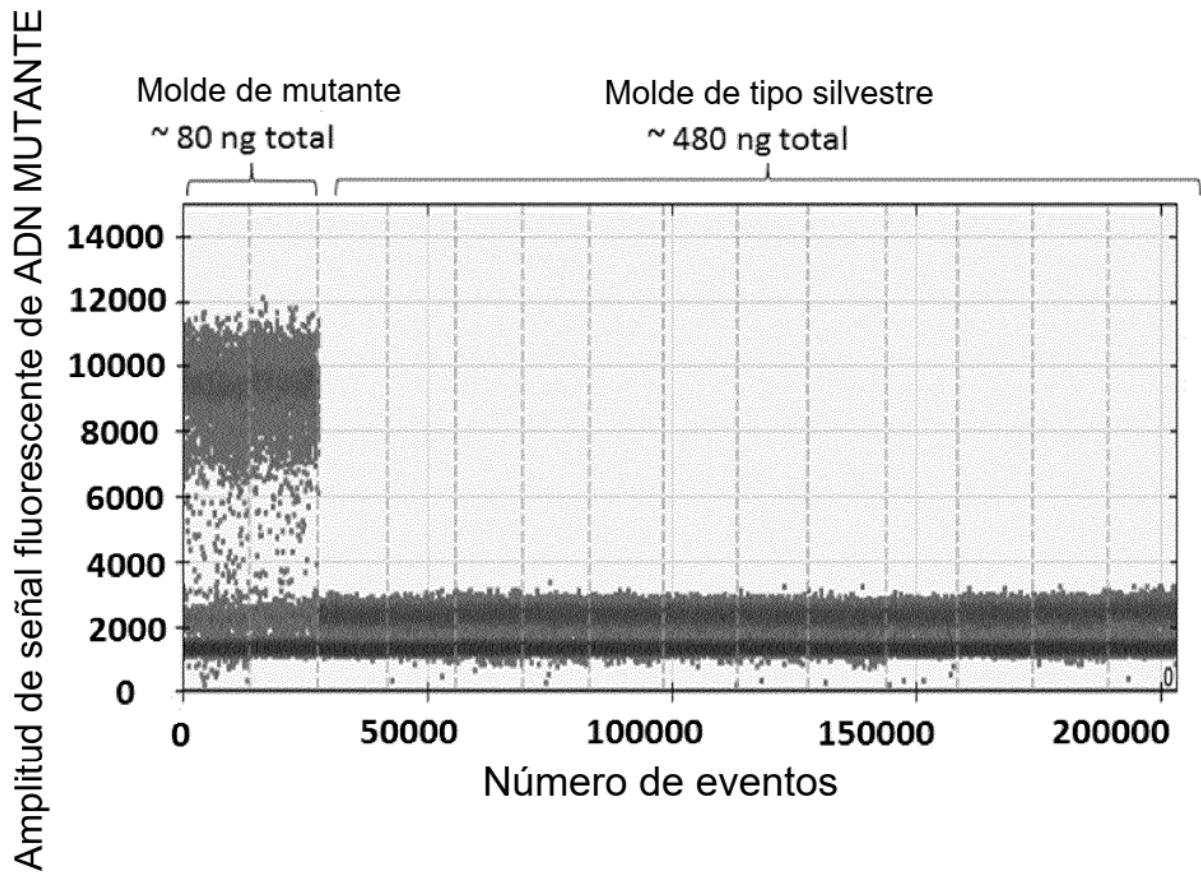
52° C – 30 seg

72° C – 30 seg

98° C – 10 min

**PCR SIMÉTRICA
EXPONENCIAL**

Fig. 5B



PROGRAMA DEL TERMOCICLADOR:

95° C – 10 min

Repetición de 64 ciclos:

94° C – 10 seg

74° C – 45 seg

AIPR

Repetición de 25 ciclos:

94° C – 10 seg

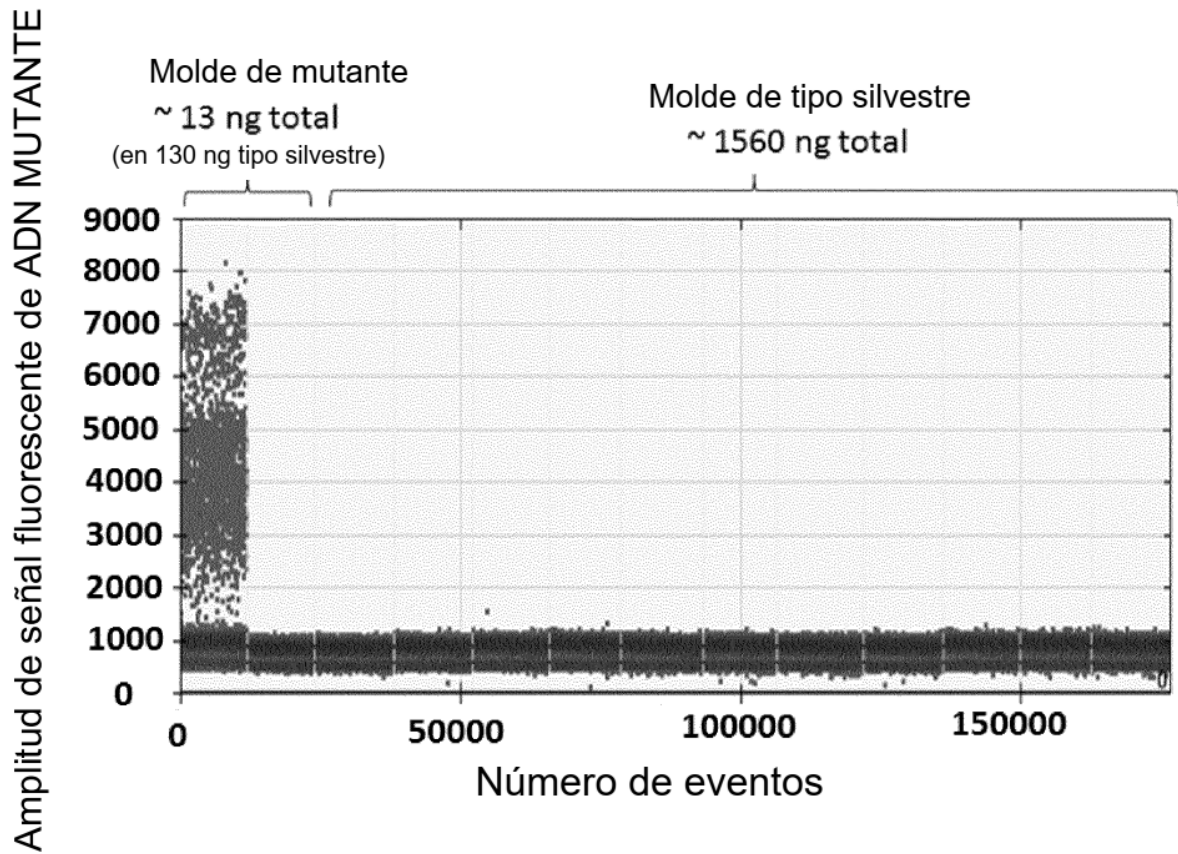
52° C – 30 seg

72° C – 30 seg

98° C – 10 min

**PCR SIMÉTRICA
EXPONENCIAL**

Fig. 5C



PROGRAMA DEL TERMOCICLADOR:

95°C – 10 min

Repetición de 64 ciclos:

- 94°C – 10 seg
- 75° C – 45 seg

} **AIPR**

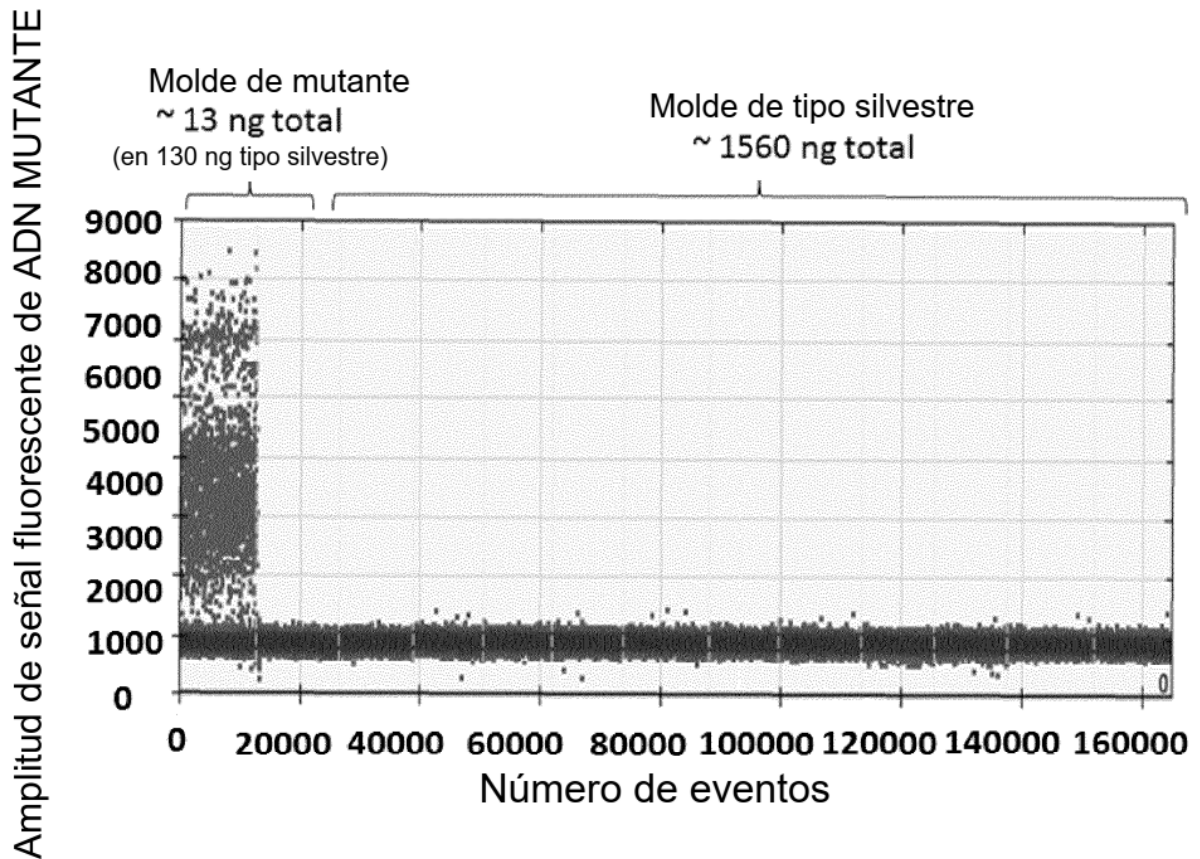
Repetición de 25 ciclos:

- 94°C – 10 seg
- 48° C – 30 seg
- 72°C – 30 seg

} **PCR SIMÉTRICA EXPONENCIAL**

98°C – 10 min

Fig. 5D



PROGRAMA DEL TERMOCICLADOR:

95°C – 10 min

Repetición de 64 ciclos:

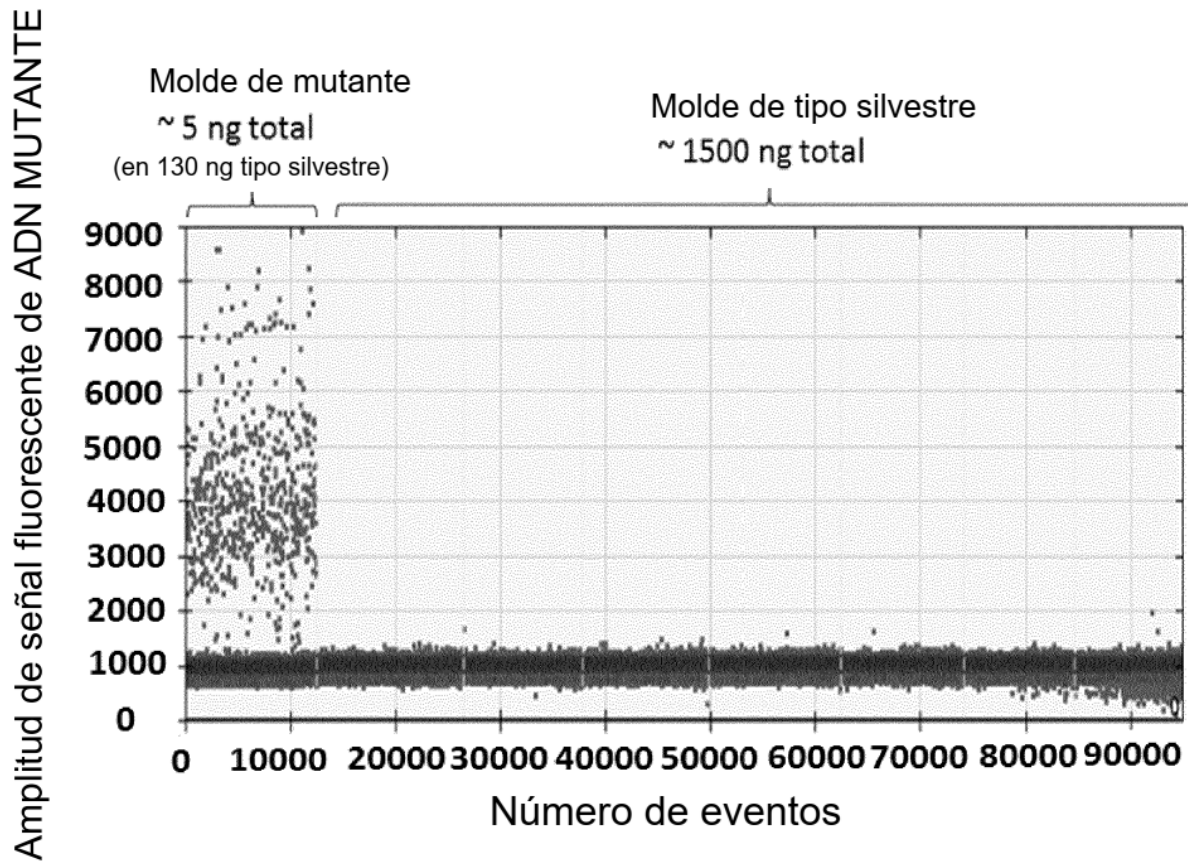
94°C – 10 seg	}	AIPR
75°C – 45 seg		

Repetición de 27 ciclos:

94°C – 10 seg	}	PCR SIMÉTRICA EXPONENCIAL
46°C – 30 seg		
72°C – 30 seg		

98°C – 10 min

Fig. 5E



PROGRAMA DEL TERMOCICLADOR:

95°C – 10 min

Repetición de 64 ciclos:

- 94°C – 10 seg
- 73°C – 45 seg

} **AIPR**

Repetición de 27 ciclos:

- 94°C – 10 seg
- 48°C – 30 seg
- 72°C – 30 seg
- 98°C – 10 min

} **PCR SIMÉTRICA
EXPONENCIAL**

Fig. 5F

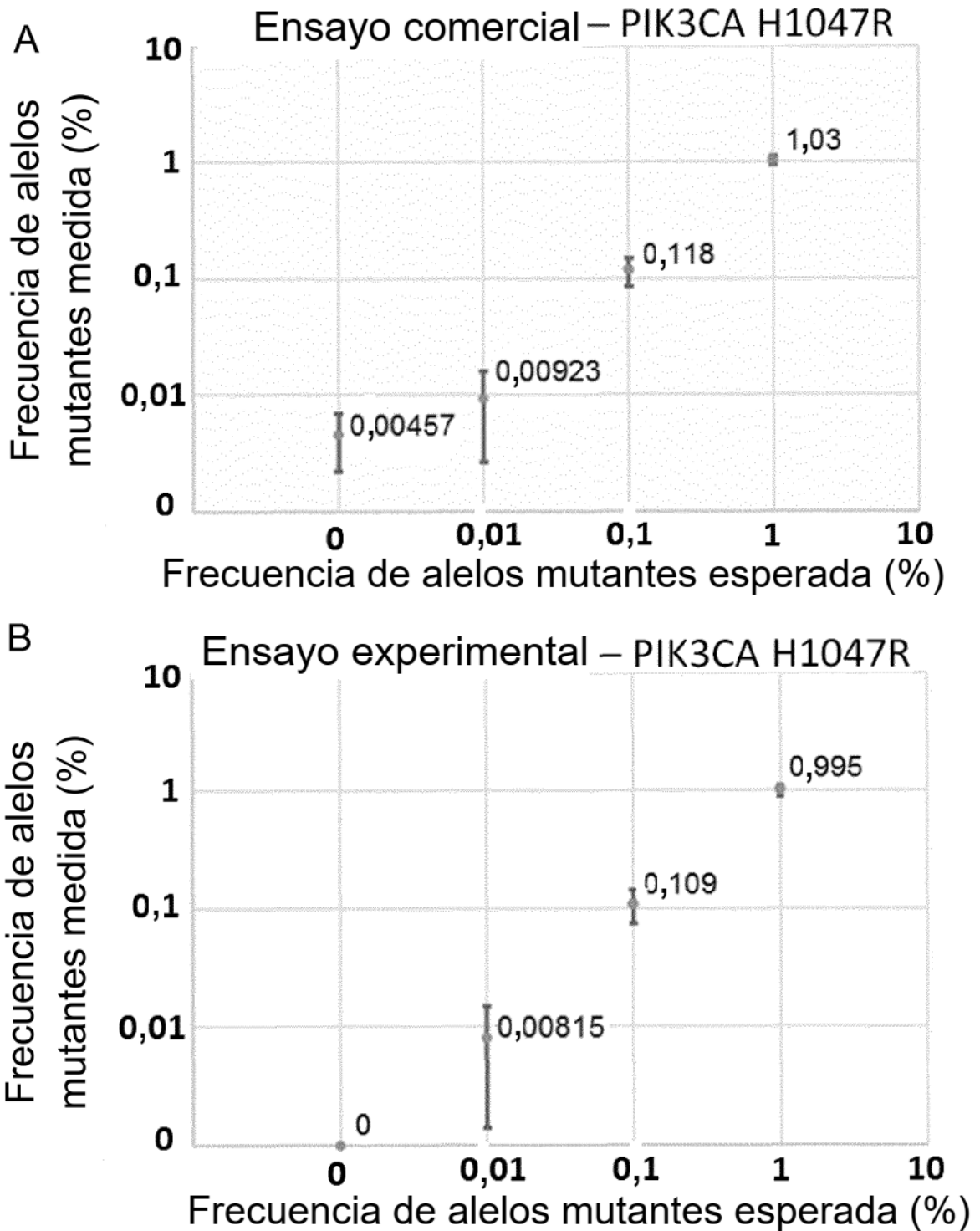


Fig. 6A-B

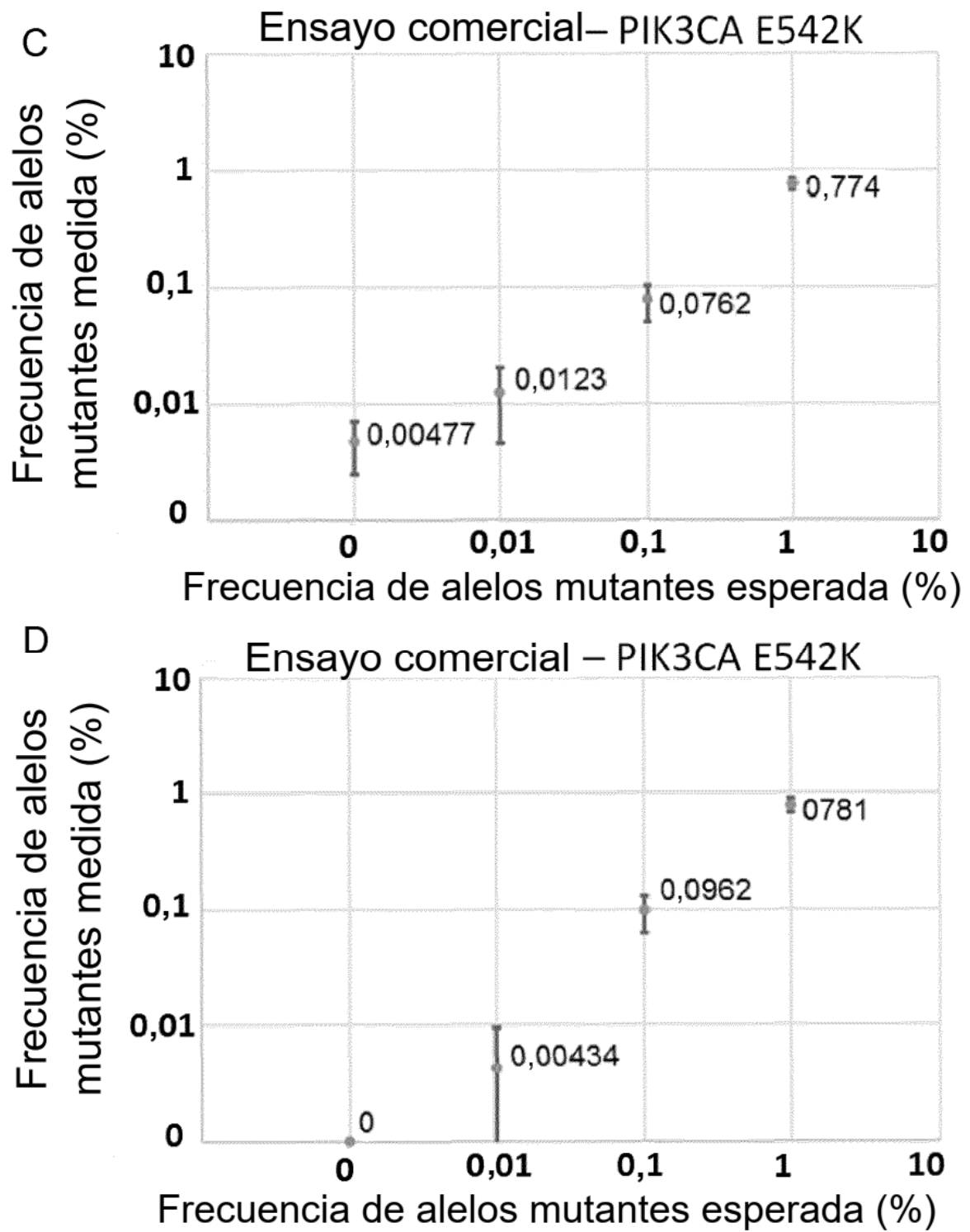


Fig. 6C-D

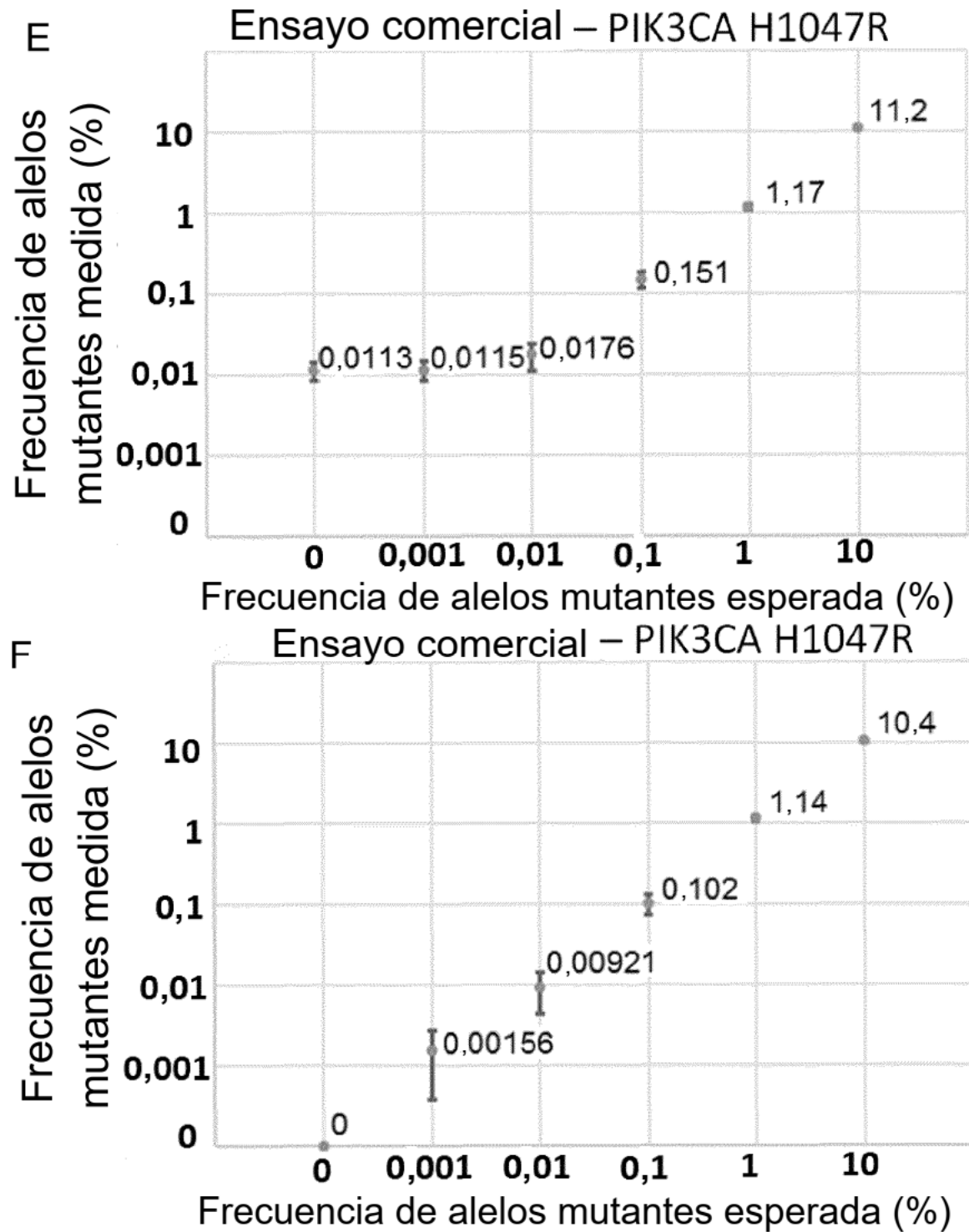


Fig. 6E-F

"cebador L modificado por no apareamiento"

nucleótidos. nucleótidos
no apareados apareados

5' CCTCAAACCTTGTGGTAG 3'

cadena (+) ATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAG

cadena (-) TACTGACTTATATTGAACACCATCAACCTC

5' CTGGTGGCGTAGG 3' Sonda TS (HEX)

5' CTGGTGACGTAGGCAA 3' Sonda MUT (FAM)

CTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAA

GACCACCGCATCCGTTCTCACGGAAGTCTATGTGCGATT

CTCGCGGAAGTCTATGTGCGATT

3'

Cebador H

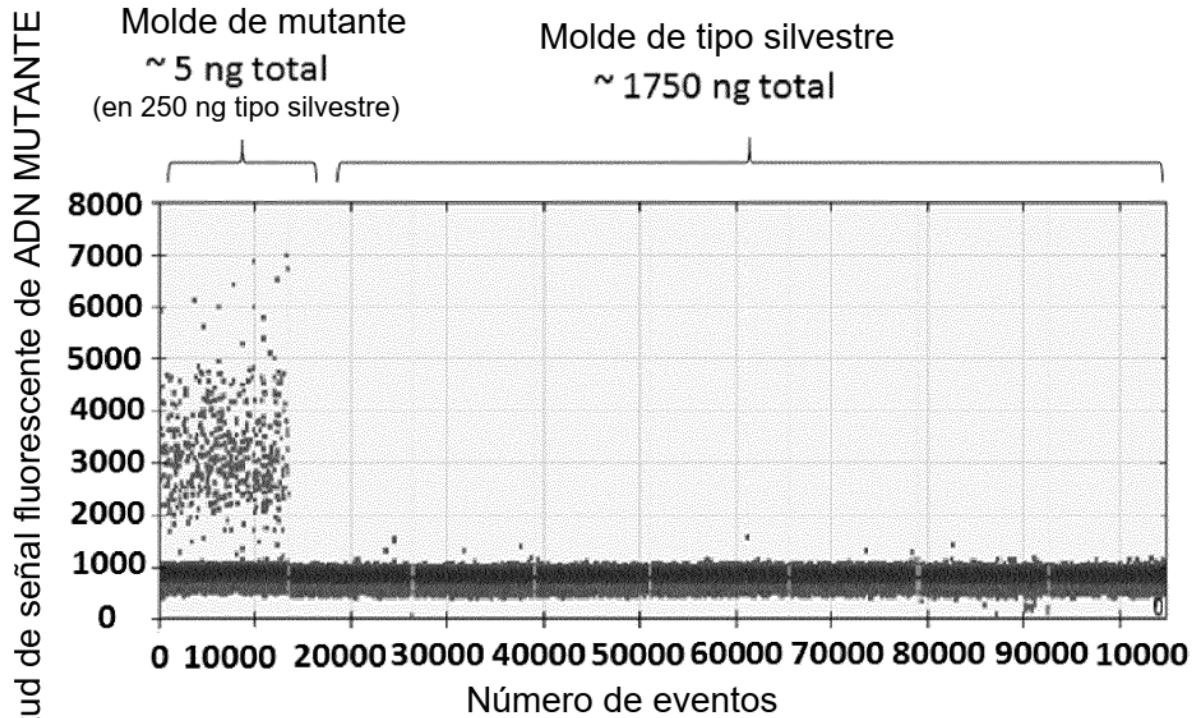
TTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAAT
AAGTCTTAGTAAACACCTGCTTATACTAGGTTGTTA|

AAGTCTTAGTAAACACCTGCTTATACTAGGTTGTTA

Cebador H

5'

Fig. 7A



PROGRAMA DEL TERMOCICLADOR:

95°C – 10 min

Repetición de 64 ciclos:

94°C – 10 seg

73°C – 45 seg

AIPR

Repetición de 5 ciclos:

94°C – 10 seg

30°C – 30 seg

72°C – 30 seg

**PCR A BAJA
TEMPERATURA**

Repetición de 22 ciclos:

94°C – 10 seg

53°C – 30 seg

72°C – 30 seg

98°C – 10 min

**PCR SIMÉTRICA
EXPONENCIAL**

Fig. 7B