

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 989 461**

(51) Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2008.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2017 PCT/US2017/034289**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2018 WO18190894**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2017 E 17728370 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024 EP 3610030**

---

(54) Título: **Métodos de detección de variantes**

(30) Prioridad:

**13.04.2017 US 201715487401**

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

**26.11.2024**

(73) Titular/es:

**INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES, INC.  
(100.0%)  
1710 Commercial Park  
Coralville, IA 52241, US**

(72) Inventor/es:

**DOBOSY, JOSEPH;  
CHEN, CAIFU;  
BEHLKE, MARK;  
RETTIG, GARRETT, RICHARD y  
OWCZARZY, RICHARD**

(74) Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 989 461 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

Métodos de detección de variantes

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La invención proporciona métodos para la detección de secuencias de ADN alteradas después de la escisión por una endonucleasa seleccionable, tal como la proteína CRISPR Cas9 (por sus siglas en inglés) de la bacteria *Streptococcus pyogenes*.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

Para la detección de mutaciones se pueden usar tanto la PCR (por sus siglas en inglés) dependiente de ARNasa H2 (rhPCR, por sus siglas en inglés, ver la publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. US 2009/0325169 A1) como la PCR alelo-específica estándar (ASPCR, por sus siglas en inglés). En la ASPCR, la ADN polimerasa realiza la discriminación del apareamiento erróneo por la detección de un apareamiento erróneo en o cerca del extremo 3' del cebador. Aunque la ASPCR a veces tiene éxito en la detección de apareamientos erróneos, la discriminación puede ser limitante, debido a la baja capacidad de detección de apareamientos erróneos de las ADN polimerasas de tipo silvestre.

20 A diferencia de la ASPCR, la sensibilidad al apareamiento erróneo de la enzima ARNasa H2 en la rhPCR permite tanto la detección sensible de mutaciones del ADN como la eliminación de artefactos de cebador-dímero de la reacción. Sin embargo, cuando se intenta detectar mutaciones del ADN con rhPCR, la colocación del apareamiento erróneo dentro del cebador es importante. Cuanto más cerca del ARN escindible se ubique el apareamiento erróneo, más discriminación se observará de la enzima ARNasa H2 y mayor será la discriminación del ensayo de rhPCR resultante. Dado que las ADN polimerasas de tipo silvestre más comunes, tales como la Taq, muestran a menudo bajos niveles de detección de apareamientos erróneos, no se puede confiar únicamente en que la polimerasa realice esta discriminación tras el escindido de la ARNasa H2. Junto con la interrogación repetida deseada de cada ciclo de rhPCR estándar, colocar el apareamiento erróneo en cualquier lugar que no sea inmediatamente opuesto al ARN no es deseable cuando se usan estas polimerasas.

30 Así pues, se necesitan ensayos con una mayor sensibilidad al apareamiento erróneo.

35 Además, se necesitan métodos mejorados para la detección de mutaciones alteradas después de la escisión por endonucleasas seleccionables, tales como la proteína CRISPR Cas9. Un método comúnmente usado para detectar mutaciones introducidas en el ADN genómico después de la reparación de eventos de escisión de ADN de doble hebra (ADNdh) es el ensayo enzimático de apareamiento erróneo (EMCA, por sus siglas en inglés). Los ensayos EMCA escinden en los sitios donde hay apareamientos erróneos de bases en el ADNdh. Para la detección EMCA de las mutaciones introducidas en el ADN después de escindir y reparar con Cas9, se cosecha el ADN genómico de las células y se amplifican por PCR las regiones alrededor del sitio de corte del ADNdh usando cebadores que flanquean el sitio de corte. Típicamente se usan amplicones de 100-1000 bases para este propósito. Una vez finalizada la amplificación, se forman heterodúplex al calentar los productos de la reacción y dejando que se recongelen, lo que lleva a la formación de variantes homodúplex WT/WT (silvestre/silvestre, por sus siglas en inglés), Mut/Mut o heterodúplex WT/Mut o Mut1/Mut2. Posteriormente, los ADNdhs son escindidos por una endonucleasa de apareamiento erróneo (tal como T7EI, Surveyor, etc.). Los heterodúplex se escinden y la presencia de fragmentos más cortos se detecta por electroforesis en gel, electroforesis capilar o cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Aunque tal ensayo es rápido y barato, a menudo no refleja con exactitud los cambios que realmente se generan a partir del proceso de mutagénesis con CRISPR. Si se introduce la misma mutación un gran número de veces, se forman homodímeros Mut/Mut, que no se detectan. Además, las enzimas endonucleasas de apareamiento erróneo a menudo no escinden eventos de una única base, lo que lleva a otra clase de mutaciones que no se detectan. Así, un ensayo EMCA casi siempre subestimarán el alcance de la edición del genoma que se produjo después del escindir y reparar el ADNdh con Cas9.

55 Un método alternativo de análisis involucra la secuenciación a gran escala del ADN usando métodos de secuenciación "de Nueva Generación" (NGS, por sus siglas en inglés) del ADN modificado, que es altamente exacto, pero resulta lento y costoso. Existen otros métodos para valorar el resultado de la mutación después de escindir y reparar con CRISPR/Cas9. Por ejemplo, los resultados de la secuenciación de Sanger se pueden analizar usando la descomposición de trazas de secuencias (análisis "TIDE", por sus siglas en inglés); la extensión de cebadores marcados con fluorescencia en un amplicón que abarque el sitio de corte de Cas9 se puede usar para mapear indels ( inserciones-delecciones) usando la detección de indels por análisis de amplicones (IDAA, por sus siglas en inglés); o el análisis de fusión de alta resolución (HRM, por sus siglas en inglés) se puede aplicar a amplicones de PCR que abarquen el sitio de corte de Cas9. Sin embargo, ninguno de estos métodos se acerca a la exactitud del análisis NGS, mientras que todos son más costosos y lentos de realizar que los métodos de EMCA. Así, se necesitan métodos mejorados para valorar la frecuencia de las mutaciones que surgen de los experimentos de edición genómica que sean rápidos y de bajo coste.

**BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN**

La divulgación proporciona ensayos que usan mutantes de polimerasas de alta discriminación u otras polimerasas de alta discriminación de apareamientos erróneos para crear un nuevo diseño de ensayo que puede usar apareamientos erróneos ubicados en el 5' del ARN.

La invención proporciona un método de enriquecimiento de objetivos que comprende:

(a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende:

i. un primer cebador oligonucleotídico que tiene un dominio de cola que no es complementario a una secuencia objetivo, el dominio de cola que comprende una primera secuencia universal de cebador; un dominio de escisión, en donde dicho dominio de escisión, cuando se hibrida con el objetivo, es escindible por una enzima ARNasa H2, colocado en el 5' de un grupo de bloqueo y en el 3' de una posición de variación, el grupo de bloqueo enlazado al final o cerca del final del extremo 3' del primer oligonucleótido cebador, en donde el grupo de bloqueo previene la extensión del cebador y/o inhibe que el primer cebador sirva como molde para la síntesis de ADN;

ii. un ácido nucleico de muestra que ha sido tratado con una enzima CRISPR, que puede o no tener la secuencia objetivo;

iii. una enzima de corte, en donde la enzima de corte es una enzima ARNasa H2; y

iv. una polimerasa;

(b) hibridar el primer cebador con la secuencia de ADN objetivo para formar un sustrato de hebra doble;

(c) escindir el primer cebador hibridizado, si el primer cebador es complementario al objetivo, con la enzima de escisión en un punto dentro o adyacente al dominio de escisión para eliminar el grupo de bloqueo del primer cebador; y

(d) extender el primer cebador con la polimerasa.

La invención proporciona métodos para la detección de secuencias de ADN alteradas después de la escisión por la proteína CRISPR Cas9 de la bacteria *Streptococcus pyogenes*.

Estas y otras ventajas de la invención, así como otros atributos inventivos adicionales, se desprenderán de la descripción de la invención proporcionada en la presente.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 es un diagrama que muestra dos diseños de cebadores. La parte a) es un cebador bloqueado-escindible diseñado para que el SNP (por sus siglas en inglés) de interés se encuentre en el 5' de la base del ARN cuando se hibrida con un molde. La ARNasa H2 se escinde, dejando una base interrogante en el 3', que la ADN polimerasa, altamente discriminativa, determina como coincidente o apareamiento erróneo. Los ciclos térmicos permiten que este proceso continúe. La parte b) ilustra un cebador de la presente invención, el escindido de la ARNasa H2 y la detección de SNP son idénticos a los de la parte a), pero el cebador también incluye un dominio de "cola" en el 5', que incluye un sitio de unión para una sonda y un cebador sentido universal. Despues de 1-10 ciclos de discriminación con la ARNasa H2 y la polimerasa, el cebador sentido universal altamente concentrado pasa a dominar la amplificación, degradando la sonda cuando se amplifica. Este ciclo se repite 25-50 veces, generando la señal de salida. Este diseño de cebador se puede multiplexar, lo que permite diseñar ensayos multicolor con un único tubo.

Las Figuras 2A y 2B son gráficas de fluorescencia de punto final del ensayo descrito en el Ejemplo 1. Los valores de fluorescencia FAM y HEX (por sus siglas en inglés, respectivamente) se representan en los ejes X e Y. La Figura 2A es un ensayo de SNP "universal" para rs351855 realizado con la Taq polimerasa WT. La Figura 2B es un ensayo SNP "universal" para rs351855 realizado con la Taq polimerasa mutante H784Q, que demuestra una discriminación muy potenciada entre cada una de las variantes alélicas, como se observa por la mayor separación de los grupos en el caso de la Taq mutante. En ambos casos, los controles sin molde (NTC, por sus siglas en inglés, cuadrados) están cerca de las coordenadas (0,0), como se deseaba. Las muestras del alelo 1 se muestran como círculos, las del alelo 2 como rombos y los heterocigotos como triángulos. Cada reacción se realizó por triplicado.

Las Figuras 3A y 3B son gráficas de discriminación alélica con llamadas de genotipado para rs4655751. La placa de reacción se cicló inmediatamente después de la preparación de la reacción (A) o se mantuvo a temperatura ambiente en la mesa de trabajo por 48 horas antes del ciclado(B). Diamantes: controles sin molde (NTC); cuadrados: muestras de alelo 1; círculos: muestras de alelo 2; triángulos: heterocigotos. Los genotipos están muy agrupados y presentan una buena separación angular, lo que indica una excelente especificidad alélica. A cada

muestra se le asignó la llamada de genotipado correcta, y no se observaron cambios en el rendimiento durante el periodo de retención de 48 horas.

- 5 Las Figuras 4A y 4B ilustran una comparación lado a lado de las gráficas de discriminación alélica del gen CCR2, rs1799865 de un ensayo basado en TaqMan contra rhPCR. Diamantes: controles sin molde (NTC); cuadrados: muestras de alelo 1; círculos: muestras de alelo 2; triángulos: heterocigotos. El ensayo de genotipado por rhPCR (Figura 4B) logró una señal de fluorescencia más alta en comparación con un ensayo tradicional de genotipado por 5'-nucleasas (Figura 4A), mostrando al mismo tiempo resultados concordantes.
- 10 Las Figuras 5A y 5B son gráficas de discriminación alélica del SNP tri-alélico, CYP2C8 (rs72558195), usando un ensayo multiplex de genotipado de tubo único por rhPCR en la plataforma QuantStudio™ 7 Flex (Thermo Fisher). En la Figura 5A, rombos: controles sin molde (NTC); cuadrados: muestras de alelo G (alelo 1); círculos: muestras de alelo A (alelo 2); triángulos: heterocigotos. En la Figura 5B, rombos: controles sin molde (NTC); cuadrados: muestras del alelo G (alelo 1); círculos: muestras del alelo C (alelo 3); triángulos: heterocigotos.
- 15 La Figura 6 muestra el diagrama 360 de discriminación alélica tri-alélica de CYP2C8 rs72558195, usando el ensayo de genotipado rhPCR con 3 cebadores alelo-específicos multiplexados en una única reacción.
- 20 La Figura 7 es una gráfica de discriminación alélica que ilustra la capacidad del ensayo de rhPCR para realizar genotipado cuantitativo.
- 25 Las Figuras 8A y 8B ilustran los resultados del genotipado y la detección de la variación alélica del número de copias que es posible con la presente invención. Se usaron muestras de ADNg para las pruebas variando los números de copias y variando los genotipos de referencia. En la Figura 8A, rombos: controles sin molde (NTC); cuadrados: muestras del alelo G; círculos: muestras del alelo C; y triángulos: heterocigotos. Los datos resultantes se correlacionan con la entrada de la prueba.
- 30 La Figura 9 es una representación esquemática de la rhPCR multiplexado.
- 35 La Figura 10 es la imagen resultante de la estación de cinta que indica la efectividad de los métodos de rhPCR multiplexado para reducir los dímeros del cebador y aumentar el rendimiento del amplicón deseado.
- 40 La Figura 11 representa gráficamente la efectividad de los rhCebadores en el porcentaje de lecturas mapeadas y lecturas específicas.
- 45 La Figura 12 muestra la colocación del residuo de ARN en relación con el sitio de escindir más común para los métodos de la divulgación (tal como en el Ejemplo 10). El ARN se muestra en minúsculas, mientras que los residuos de ADN aparecen en mayúsculas. El sitio de escisión Cas9 se muestra con una línea a través de ambas hebras de ADN. RN2 = enzima ARNasa H2; pol = polimerasa.
- 50 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN
- 55 La invención se refiere a métodos de discriminación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que usan cebadores de rhPCR bloqueables (ver la publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. US 2009/0325169 A1) y una ADN polimerasa con altos niveles de discriminación de apareamientos erróneos. En la presente invención, el apareamiento erróneo se coloca en un lugar distinto del opuesto a la base del ARN. En estas situaciones, la mayor parte de la discriminación no procede de la ARNasa H2, sino de la polimerasa de alta discriminación. Usar cebadores bloqueables con ARNasa H2 reduce o elimina los dímeros de cebadores y aumenta la discriminación de SNP o indel (inserción/delección, Figura 1A).
- 60 A los efectos de la presente invención, la alta discriminación se define como cualquier cantidad de discriminación por encima de la discriminación promedio de la polimerasa WT de *Thermus aquaticus* (Taq). Los ejemplos incluyen la ADN polimerasa KlenTaq® (Wayne Barnes) y las polimerasas mutantes descritas en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. US 2015/0191707, tales como las mutantes H784M, H784S, H784A y H784Q.
- 65 En la invención, se añade(n) secuencia(s) universal(es) de detección al extremo 5' de los cebadores bloqueables. La secuencia de detección incluye un sitio de unión para una sonda y un sitio de unión para un cebador de amplificación universal. El sitio de unión del cebador está colocado en o cerca del extremo 5' del oligonucleótido

final y el sitio de unión de la sonda está colocado internamente entre el sitio del cebador universal y el dominio del cebador de detección de SNP. Usar más de una sonda química de este tipo en una reacción de detección en donde se emplean distintos sitios de unión a la sonda permite multiplexar los cebadores y, además, permite la detección de múltiples colores de SNPs u otros atributos genómicos. Los cebadores bloqueables de la rhPCR 5 reducen o eliminan los dímeros de cebadores. Los dímeros de cebadores son un problema importante para usar diseños de cebadores "universales" en ensayos de detección de SNP, y eso limita su utilidad (Figura 1B). La combinación de un dominio de amplificación/detección universal con un dominio de cebador SNP en formato de cebador bloqueable supera esta dificultad.

10 Anteriormente, la mejor realización preferida para la discriminación de SNP por rhPCR empleaba cebadores bloqueables y escindibles que tenían el apareamiento erróneo (sitio SNP) colocado de manera opuesta a la base única de ARN (sitio de escisión). Aunque esto funciona para muchos objetivos SNP, hay emparejamientos de bases coincidentes/no coincidentes en los que no se obtiene una discriminación suficiente para una llamada de bases robusta. Asimismo, debido al alto nivel de discriminación diferencial de SNP observado con la rhPCR, la detección 15 del punto final puede resultar difícil, especialmente con ADN objetivo heterocigoto. En el método propuesto, la base del ARN es idéntica en ambos cebadores discriminantes, lo que elimina este problema.

También es útil colocar el apareamiento erróneo en una posición 5' del ARN. Por ejemplo, una mutación ubicada 20 en el 5' del ARN permite usar una ADN polimerasa altamente discriminatoria como paso de selección secundario durante la amplificación por PCR después de la escisión del cebador, aunque esta configuración restringe el potencial de discriminación de apareamientos erróneos de la ARNasa H2 al primer evento de escisión, y los eventos de cebado subsecuentes en los amplicones hijos se unirán a cualquier secuencia que estuviera presente 25 en el cebador. La colocación del apareamiento erróneo en el 3' del ARN reduce o elimina la posibilidad de conversión del cebador al alelo opuesto.

25 Así, en algunos aspectos, la divulgación proporciona métodos y composiciones que comprenden enzimas mutantes ARNasa H2 que muestran una potenciación de la discriminación de apareamientos erróneos durante la rhPCR cuando las mutaciones están colocadas en 5' en relación con el residuo de ARN. Por ejemplo, se han identificado mutaciones colocadas en las posiciones duodécima, decimotercera y decimonovena de aminoácidos 30 en la enzima ARNasa H2 de *Pyrococcus abyssi* (*P.a.*) que tienen esta inesperada y útil propiedad. Es posible que mutaciones similares en las enzimas ARNasa H2 de otras especies que admiten la rhPCR muestren también propiedades mejoradas similares en relación con sus formas WT.

35 En otras realizaciones, los métodos de la divulgación comprenden el uso de cebadores bloqueables en donde el apareamiento erróneo se coloca a 1-2 bases en el 5' del ARN. En otra realización, el método involucra el uso de cebadores bloqueables con tres o más bases de ADN en el 3' de un residuo de ARN, y los cebadores se diseñan tal como para que el apareamiento erróneo se coloque inmediatamente en el 5' del ARN.

40 Después de la escisión por la ARNasa H2, el cebador restante tiene un residuo de ADN colocado en el extremo 3' exactamente en el lugar del SNP, creando efectivamente un cebador ASPCR. En esta configuración, una ADN polimerasa de alta especificidad puede discriminar entre coincidencia y apareamiento erróneo con la hebra molde (Figura 1A y 1B). Las ADN polimerasas nativas, tales como la ADN polimerasa Taq, mostrarán cierto nivel de 45 discriminación en esta configuración de cebador, y si el nivel de discriminación alcanzado no es suficiente para una llamada SNP robusta en un formato de ensayo de alto rendimiento, posteriormente se pueden usar polimerasas con una discriminación de molde mejorada. En una realización, se pueden usar polimerasas de ADN mutantes, tales como las divulgadas en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. US 2015/0191707 o cualquier otra polimerasa diseñada u optimizada para mejorar la discriminación de moldes. Cuando se usan 50 polimerasas con una mayor discriminación de apareamientos erróneos, el nivel final de discriminación de coincidencias/desigualdades alcanzado será aditivo con contribuciones tanto de la interacción cebador-polimerasa por ASPCR como de la interacción cebador/de ARNasa H2 por rhPCR. Además, el uso de cebadores bloqueables reduce el riesgo de formación de dímeros de cebador, que producen señales falsas positivas, lo que hace que la reacción global sea más robusta y tenga mayor sensibilidad y especificidad. Las contribuciones relativas de cada componente del ensayo pueden variar al usar diferentes polimerasas, diferentes grupos de bloqueo en el extremo 3' del cebador y diferentes enzimas ARNasa H2.

55 La invención usa un dominio de "cola" añadido al extremo 5' del cebador, que contiene una secuencia de sitio de unión del cebador sentido universal y, opcionalmente, una secuencia de sonda universal. Esta cola no es complementaria al molde de interés, y cuando se usa una sonda, la cola permitirá una detección de señal fluorescente barata, que se podría multiplexar para permitir la detección de señales de múltiples colores en qPCR 60 (Figura 1B). En una realización, se producen de 1 a 10 ciclos de ciclado inicial y discriminación tanto de la ARNasa H2 como de la ADN polimerasa. Después de este preciclado inicial, un cebador sentido universal altamente concentrado y no discriminatorio pasa a dominar la amplificación, degradando la sonda y generando la señal fluorescente cuando el ADN se amplifica. Este ciclo se repite 25-50 veces, lo que permite una detección robusta. Este diseño de ensayo es propenso a problemas con dímeros de cebadores, y la presencia del dominio bloqueable 65 en los cebadores suprimirá o eliminará estos problemas.

En otra realización, un cebador sentido se usa opcionalmente con un cebador antisentido, y se añade un dominio de cola al extremo 5' de uno o ambos cebadores sentido y antisentido. El dominio de cola comprende un sitio de unión de cebador sentido universal. Los cebadores se pueden usar para hibridar y amplificar un objetivo tal como una muestra genómica de interés. Los cebadores añadirían sitios de cebado universales al objetivo, y se pueden

- 5 realizar más ciclos de amplificación usando cebadores universales que contengan secuencias adaptadoras que permitan el procesamiento posterior de la muestra, tal como la adición de sitios de unión a células de flujo P5/P7 y secuencias asociadas de índice o código de barras útiles en adaptadores para la secuenciación de próxima generación (ver la Figura 9). En otra realización se usa una polimerasa de alta fidelidad, que reducirá aún más la tasa de incorporación errónea de bases en el producto extendido y aumentará la precisión de los métodos de la invención.

10 Como se indica en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. US 2009/0325169, la ARNasa H2 se puede escindir en posiciones que contienen una o más bases de ARN, en nucleósidos 2'-modificados tales como 15 2'-fluoronucleósidos. Los cebadores también pueden contener enlaces resistentes a las nucleasas, tales como fosforotioato, fosforoditioato o metilfosfonato.

- 20 La divulgación se refiere a la detección de secuencias de ADN alteradas después de la escisión por una endonucleasa seleccionable, tal como la proteína CRISPR Cas9 de la bacteria *Streptococcus pyogenes*. Esta proteína y otras similares se han usado con éxito para la modificación genómica dirigida en el bien documentado sistema de repeticiones palindrómicas cortas regularmente interespaciadas (CRISPR).

25 Los cebadores de cola detallados anteriormente se usan para detectar eventos de edición para la tecnología de edición del genoma enzimática CRISPR. Por ejemplo, CRISPR/Cas9 es una estrategia revolucionaria de edición genómica que permite generar roturas de hebra doble (DSB, por sus siglas en inglés) en el ADN genómico. Los métodos para conseguir DSBs por CRISPR/Cas9 -un sistema de defensa inmunitario bacteriano compuesto por una endonucleasa que se dirige al ADN de hebra doble por un ARN guía se usan ampliamente en la interrupción de genes, el noqueo de genes, la inserción de genes, etc. En las células de mamíferos, la actividad de la endonucleasa va seguida de un proceso de reparación endógena que da lugar a una cierta frecuencia de inserciones/delecciones/sustituciones en el ADN de tipo silvestre en el *locus* objetivo, lo que resulta en la edición 30 del genoma.

35 Se han diseñado cebadores que eliminan la ARNasa H para flanquear los loci editados con el fin de 1) generar amplicones específicos de *locus* con colas universales, y 2) ser amplificados subsecuentemente con cebadores universales P5/P7 indexados para la secuenciación de próxima generación. En experimentos piloto, esta estrategia resultó en una amplificación fiable y específica de *locus* que captura eventos de edición CRISPR/Cas9 de forma reproducible y de alto rendimiento. El hallazgo clave es que se determinó que la edición global dirigida por este método basado en NGS era de 95 %; mientras que las estrategias enzimáticas anteriores sugerían que la edición global de las mismas muestras era de aproximadamente 55 % en el sitio objetivo contemplado. Además, se diseñaron cebadores para amplificar ubicaciones inespecíficas de edición genómica basados en predicciones *in silico* por herramientas bioinformáticas internas.

40 Estos ensayos se agruparían para la amplificación de una única muestra de ADN genómico con el fin de capturar los sitios específicos así como >100 sitios potenciales para la edición genómica inespecífica mediada por homología de secuencia con el ARN guía. Los resultados de este experimento permitirían 1) identificar los sitios CRISPR/Cas9 fuera del objetivo y proporcionar un ensayo para comparar estrategias que reduzcan esos efectos, 2) mejorar el diseño del algoritmo de predicción de sitios CRISPR/Cas9 fuera del objetivo, y 3) mejorar el diseño 45 de los conjuntos de cebadores.

50 Así, en otros aspectos, la divulgación proporciona métodos que emplean el sistema de ensayo de rhPCR universal descrito anteriormente para detectar mutaciones generadas por una endonucleasa seleccionable tal como Cas9 o Cpf1. Los ensayos de rhPCR de acuerdo con estos aspectos de la divulgación usan una enzima ARNasa H2 termoestable, y opcionalmente una ADN polimerasa con potenciación de la discriminación de apareamientos erróneos. La ARNasa H2 se escinde en el único residuo de ARN solamente cuando el oligonucleótido cebador se duplexa con un ácido nucleico objetivo, lo que elimina un grupo de bloqueo 3' y activa el cebador. La ADN 55 polimerasa usa el cebador para iniciar la síntesis de ADN y, en múltiples ciclos, apoya la PCR. La discriminación de las mutaciones se consigue por la acción de la ARNasa H2 o la acción combinada de la ARNasa H2 y la ADN polimerasa, en donde la ARNasa H2 tiene una actividad de desbloqueo reducida cuando hay un apareamiento erróneo y la ADN polimerasa tiene una actividad de cebado/síntesis de ADN reducida cuando hay un apareamiento erróneo. En una realización, los cebadores comprenden múltiples dominios funcionales que incluyen (desde el extremo 5'): un dominio de cebador universal, un dominio de unión a sonda universal, un dominio de cebador específico de un objetivo, un único residuo de ARN (unión escindible), un dominio de extensión 3' corto y un grupo de bloqueo 3' que previene que el oligonucleótido cebe la síntesis de ADN. El escindido por la ARNasa H2 elimina el residuo de ARN, el dominio de extensión 3' y el grupo de bloqueo 3'.

60 65 En algunas realizaciones, un segundo ensayo está presente en la reacción y se ejecuta como un multiplex de 2 colores, dirigido al gen de la ARNasa P o a algún otro gen de control. Este segundo ensayo permite la normalización

con un gen de control interno que no fue objetivo de la reacción de edición del genoma CRISPR. Este ensayo de control se puede realizar como un ensayo estándar de nucleasas 5' de tres oligonucleótidos o como un segundo ensayo universal basado en la rhPCR.

5 Como se describe en la presente pero no forma parte de la invención, los cebadores pueden carecer del dominio universal 5', pero conservar el grupo de bloqueo 3' extraíble. En esta realización alternativa, se coloca una sonda fluorescente estándar de 5' de nucleasa entre los cebadores sentido y antisentido. La sonda se coloca dentro del amplicón de modo tal que quede fuera de cualquier región que pueda ser alterada por el evento de edición del genoma.

10 En cada experimento, la posición relativa del cebador discriminatorio (es decir, que interroga sobre la mutación) en la secuencia es importante. La ARNasa H2 escinde el 5' de un residuo de ARN. La colocación del cebador de modo que el residuo de ARN se una dos nucleótidos después del sitio de escindir más común es importante para el reconocimiento de las muestras mutagenizadas. En la Figura 12 se muestra un diagrama de este principio. En las muestras de tipo silvestre (WT), la amplificación se produce normalmente, ya que ni la ARNasa H2 ni la ADN polimerasa ven obstaculizadas sus funciones. Si se introduce una inserción en la secuencia, se produce un apareamiento erróneo tanto para la ARNasa H2 como para la ADN polimerasa, lo que permite dos oportunidades independientes para distinguir la mutante de WT. La misma interrogación de las muestras se consigue si existe una delección tanto la ARNasa H2 como la ADN polimerasa detectan los apareamientos erróneos generados (Figura 12). Este doble nivel de interrogación permite cuantificar con gran precisión la presencia de ADN mutado en una muestra heterogénea.

15 Así, en un aspecto, la divulgación proporciona cebadores bloqueables para rhPCR, los cebadores que comprenden: 5'-A-B-C-D-E-3', en donde A es una extensión de cola que no es complementaria a un objetivo; B es un dominio de secuencia que es complementario a un objetivo; C es un dominio de discriminación; D es un dominio escindible que, cuando se hibrida con el objetivo, es escindible por la ARNasa H2; y E es un dominio de bloqueo que previene la extensión del cebador.

20 En algunas realizaciones, D se compone de 1-3 bases de ARN. En algunas realizaciones, D se compone de 1 base de ARN. En algunas realizaciones, el dominio de escisión comprende uno o más de los siguientes restos: un resto de ADN, un resto abásico, un nucleósido modificado o un enlace fosfato-internucleótido modificado. En algunas realizaciones, una secuencia que flanquea el sitio de escisión contiene uno o más enlaces internucleósidos resistentes al escindido por nucleasas. En algunas realizaciones, el enlace resistente a nucleasas es un fosforotioato. En algunas realizaciones, el átomo de oxígeno 3' de al menos uno de los residuos de ARN está sustituido por un grupo amino, un grupo tiol o un grupo metileno. En algunas realizaciones, el grupo bloqueador se une al nucleótido 3'-terminal del cebador. En la invención, A se compone de una región idéntica a un cebador sentido universal y, opcionalmente, de un dominio de unión a una sonda.

25 En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para detectar una variación en una secuencia de ADN objetivo, el método comprende: (a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende (i) un cebador oligonucleotídico que tiene un dominio de escisión, en donde dicho dominio de escisión, cuando se hibrida con el objetivo, es escindible por una enzima ARNasa H2, colocado en el 5' de un grupo de bloqueo y en el 3' de una posición de variación, el grupo de bloqueo colocado en o cerca del extremo del extremo 3' del cebador oligonucleotídico en donde el grupo de bloqueo previene la extensión del cebador y/o inhibe que el cebador sirva como molde para la síntesis de ADN, (ii) una muestra de ácido nucleico que ha sido tratada con una enzima CRISPR, que puede o no tener la secuencia objetivo, y en donde la secuencia objetivo puede o no tener la variación (iii) una enzima de corte, en donde la enzima de corte es una enzima ARNasa H2 y (iv) una polimerasa; (b) hibridar el cebador con la secuencia de ADN objetivo para formar un sustrato de hebra doble; (c) escindir el cebador hibridado, si el cebador es complementario en la variación, con la enzima de escisión en un punto dentro o adyacente al dominio de escisión para eliminar el grupo de bloqueo del cebador; y (d) extender el cebador con la polimerasa.

30 En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 es una enzima de escisión de arranque en caliente que es termoestable y tiene una actividad reducida a temperaturas más bajas. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 es una enzima de escisión de arranque en caliente modificada químicamente que es termoestable y tiene una actividad reducida a temperaturas más bajas. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 de arranque en caliente es una ARNasa H2 de *Pyrococcus abyssi* modificada químicamente. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 es una enzima de escisión de arranque en caliente que se inactiva reversiblemente a través de la interacción con un anticuerpo a temperaturas más bajas que es termoestable y tiene una actividad reducida a temperaturas más bajas. En algunas realizaciones, el dominio de corte está compuesto por al menos una base de ARN, y la enzima de corte corta entre la posición complementaria a la variación y la base de ARN. En algunas realizaciones, el dominio de corte está compuesto por uno o más nucleósidos 2'-modificados, y la enzima de corte corta entre la posición complementaria a la variación y el uno o más nucleósidos modificados. En algunas realizaciones, el uno o más nucleósidos modificados son 2'-fluorouracilos. En algunas realizaciones, la polimerasa es una polimerasa de alta discriminación. En algunas realizaciones, la polimerasa es una Taq polimerasa mutante H784Q. En algunas realizaciones, la Taq polimerasa mutante H784Q se inactiva

reversiblemente mediante modificación química, de aptámeros o de anticuerpos. En la presente invención, el cebador contiene una secuencia de cola en 5' que comprende una secuencia de cebador universal y opcionalmente una secuencia de sonda universal, en donde la cola es no complementaria a la secuencia de ADN objetivo. En la presente invención, la secuencia de ADN objetivo es una muestra que ha sido tratada con una enzima CRISPR.

5 En algunas realizaciones, la secuencia de ADN objetivo es una muestra que ha sido tratada con una enzima Cas9 o Cpf1.

También se describen en la presente composiciones de oligonucleótidos para genotipado de una muestra objetivo, en donde la composición comprende, de 5' a 3': (a) una porción de cola no complementaria a la muestra objetivo pero que contiene (5' a 3') una primera secuencia idéntica a un cebador sentido universal y una segunda secuencia idéntica a una secuencia de sonda informadora que corresponde a un alelo; (b) una región complementaria a un objetivo; (c) un dominio específico de alelo; y (d) una región terminal 3' que contiene un dominio de bloqueo. Como se describe en la presente, el dominio alelo-específico es capaz de ser escindido por una enzima ARNasa H cuando se hibrida con la muestra objetivo. En algunas realizaciones, el dominio alelo-específico es 5'-D-R-3', en donde D es una base de ADN que se alinea con una posición SNP de interés y R es una base de ARN. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene una longitud de aproximadamente 15-30 bases. En algunas realizaciones, el dominio de bloqueo está compuesto por 0-5 bases de ADN. En algunas realizaciones, el dominio de bloqueo está compuesto por al menos dos de los flujos: ADN, ARN, 1,3-propanodiol, ADN o ARN con apareamiento erróneo y un resto de etiquetado. En algunas realizaciones, el dominio alelo-específico está compuesto por análogos 2'-fluoro.

Como se describe en la presente, la divulgación proporciona kits para ensayos de genotipado, los kits comprenden: (a) un primer oligonucleótido alélico comprendido como en el aspecto anterior; (b) un segundo oligonucleótido alélico comprendido como en el aspecto anterior; (c) un cebador antisentido específico de *locus*; (d) un cebador antisentido universal; (e) una polimerasa; (f) una primera sonda correspondiente a un primer alelo; (g) una segunda sonda correspondiente a un segundo alelo; y (h) una enzima ARNasa H.

Como se describe en la presente, la divulgación proporciona métodos de visualización de múltiples señales fluorescentes diferentes a partir de parcelas de amplificación alélica, los métodos comprenden: (a) usar tres señales fluorescentes de múltiples señales de tintes fluorescentes en un único pozo de reacción, restar un Tinte de menor fluorescencia de las señales de fluorescencia de Tinte<sub>1</sub> y Tinte<sub>2</sub>; (b) calcular la distancia de los datos desde un origen y un ángulo desde uno de los ejes con una ecuación;

$$\text{Distancia desde el origen} = \sqrt{(\Delta Rn_{Tinte_1})^2 + (\Delta Rn_{Tinte_2})^2}$$

35

$$\text{Ángulo} = \tan^{-1}(\Delta Rn_{Tinte_1} \div \Delta Rn_{Tinte_2}) \times \frac{120}{90}$$

y (c) trazar en un diagrama circular con tres ejes, uno para cada tinte o alelo, la distancia resultante.

40 En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos de enriquecimiento de objetivos que comprenden: (a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende (i) un primer cebador oligonucleotídico que tiene un dominio de cola que no sea complementario de una secuencia objetivo, el dominio de cola comprende una primera secuencia universal de cebador; un dominio de escisión, en donde dicho dominio de escisión cuando se hibrida con el objetivo, es escindible por una enzima ARNasa H2, colocado en el 5' de un grupo de bloqueo y en el 3' de una posición de variación, el grupo de bloqueo colocado en o cerca del extremo del extremo 3' del primer cebador oligonucleótido en donde el grupo de bloqueo previene la extensión del cebador y/o inhibe que el primer cebador sirva como molde para la síntesis de ADN, (ii) un ácido nucleico de muestra que ha sido tratado con una enzima CRISPR, que puede o no tener la secuencia objetivo, (iii) una enzima de corte, en donde la enzima de corte es una enzima ARNasa H2; (iv) una polimerasa; (b) hibridar el primer cebador con la secuencia de ADN objetivo para formar un sustrato de hebra doble; (c) escindir el primer cebador hibridado, si el primer cebador es complementario al objetivo, con la enzima de escisión en un punto dentro o adyacente al dominio de escisión para eliminar el grupo de bloqueo del primer cebador; y (d) extender el primer cebador con la polimerasa.

45 En algunas realizaciones, los métodos comprenden además un segundo cebador en orientación antisentido para apoyar el cebado y la extensión del primer producto de extensión del cebador. En algunas realizaciones, el segundo cebador comprende además un dominio de cola que comprende una segunda secuencia de cebador universal. En algunas realizaciones, los pasos b-d se llevan a cabo de 1-10 veces. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además la eliminación de cebadores no extendidos de la reacción y la hibridación de cebadores universales con el producto de extensión para formar un segundo producto de extensión. En algunas realizaciones, los cebadores universales comprenden adicionalmente secuencias de cola para la adición de secuencias adaptadoras al segundo producto de extensión. En algunas realizaciones, la secuenciación se lleva a cabo en el segundo producto de extensión para determinar la secuencia del objetivo. En la invención, la secuencia de ADN objetivo es una muestra que ha sido tratada con una enzima CRISPR. En algunas realizaciones, la secuencia de

ADN objetivo es una muestra que ha sido tratada con una enzima Cas9 o Cpf1. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 es una enzima de escisión de arranque en caliente que es termoestable y tiene una actividad reducida a temperaturas más bajas. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 es una enzima ARNasa H2 de arranque en caliente modificada químicamente que es termoestable y tiene una actividad reducida a temperaturas más bajas. En algunas realizaciones, la enzima de escisión de arranque en caliente es una ARNasa H2 de *Pyrococcus abyssi* modificada químicamente. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 es una enzima de escisión de arranque en caliente que se inactiva reversiblemente a través de la interacción con un anticuerpo a temperaturas más bajas que es termoestable y tiene una actividad reducida a temperaturas más bajas. En algunas realizaciones, el dominio de corte está compuesto por al menos una base de ARN, y la enzima ARNasa H2 corta entre la posición complementaria a la variación y la base de ARN. En algunas realizaciones, el dominio de corte está compuesto por uno o más nucleósidos 2'-modificados, y la enzima ARNasa H2 corta entre la posición complementaria a la variación y el uno o más nucleósidos modificados. En algunas realizaciones, el uno o más nucleósidos modificados son 2'-fluoronucleósidos. En algunas realizaciones, la polimerasa es una polimerasa de alta discriminación. En algunas realizaciones, la polimerasa es una Taq polimerasa mutante H784Q. En alguna realización, la Taq polimerasa mutante H784Q se inactiva reversiblemente mediante modificación química, de aptámeros o de anticuerpos.

La divulgación proporciona métodos para detectar variaciones en secuencias de ADN objetivo que han sido alteradas con una enzima de edición de genes, que no forman parte de la presente invención, los métodos comprenden: (a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende: (i) un cebador oligonucleotídico que tiene un dominio de escisión colocado en el 5' de un grupo de bloqueo y en el 3' de una posición de variación, el grupo de bloqueo colocado al final o cerca del final del extremo 3' del cebador oligonucleotídico, en donde el grupo de bloqueo previene la extensión del cebador y/o impide que el cebador sirva como molde para la síntesis de ADN; (ii) una muestra de ácido nucleico que puede o no tener la secuencia objetivo, y en donde la secuencia objetivo puede o no tener la variación; (iii) una enzima de escisión; y (iv) una polimerasa; (b) hibridar el cebador con la secuencia de ADN objetivo para formar un sustrato de hebra doble; (c) escindir el cebador hibridado, si el cebador es complementario en la variación, con la enzima de escisión en un punto dentro o adyacente al dominio de escisión para eliminar el grupo de bloqueo del cebador; y (d) extender el cebador con la polimerasa.

En la presente invención, la secuencia de ADN objetivo ha sido tratada con una enzima CRISPR. En algunas realizaciones, la secuencia de ADN objetivo ha sido tratada con una enzima Cas9 o Cpf1. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 es una enzima de escisión de arranque en caliente que es termoestable y tiene una actividad reducida a temperaturas más bajas. En la invención, la enzima de corte es una enzima ARNasa H2. En algunas realizaciones, la enzima de corte es la enzima ARNasa H2 de *Pyrococcus abyssi*. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 es una enzima de escisión de arranque en caliente modificada químicamente que es termoestable y tiene una actividad reducida a temperaturas más bajas. En algunas realizaciones, la enzima de escisión de arranque en caliente es una ARNasa H2 de *Pyrococcus abyssi* modificada químicamente. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 es una enzima de escisión de arranque en caliente que se inactiva reversiblemente a través de la interacción con un anticuerpo a temperaturas más bajas.

En algunas realizaciones, el dominio de escisión comprende al menos una base de ARN, y la enzima ARNasa H2 escinde entre la posición complementaria a la variación y la base de ARN. En algunas realizaciones, el dominio de escisión comprende al menos una base de ARN ubicada en el 3' de la posición de variación, y comprende una base de ADN entre la posición de variación y la base de ARN. En algunas realizaciones, no hay bases de ADN entre la posición de variación y la base de ARN. En algunas realizaciones, el dominio de escisión comprende uno o más nucleósidos 2'-modificados, y la enzima ARNasa H2 escinde entre la posición complementaria a la variación y el uno o más nucleósidos modificados. En algunas realizaciones, el uno o más nucleósidos modificados son 2'-fluoronucleósidos.

En algunas realizaciones, la polimerasa es una polimerasa de alta discriminación. En algunas realizaciones, la polimerasa es una Taq polimerasa mutante H784Q. En algunas realizaciones, la Taq polimerasa mutante H784Q se inactiva reversiblemente mediante modificación química, de aptámeros o de anticuerpos. En la invención, el cebador contiene una secuencia de cola 5' que comprende una secuencia de cebador universal y opcionalmente una secuencia de sonda universal, en donde la cola es no complementaria a la secuencia de ADN objetivo.

En algunas realizaciones, los métodos de este aspecto de la divulgación comprenden además (e) detectar un gen de control interno no dirigido por la enzima de edición génica; y (f) normalizar los resultados de los pasos (a)-(d) a los resultados del paso (e). En algunas realizaciones, el gen de control interno no objetivo de la enzima de edición génica es el gen de la ARNasa P. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además un cebador oligonucleotídico de control específico para el gen de control interno no objetivo de la enzima de edición génica, en donde el cebador oligonucleotídico de control comprende un dominio de escisión colocado en el 5' de un grupo de bloqueo y en el 3' de una posición de variación, el grupo de bloqueo colocado en o cerca del extremo del extremo 3' del cebador oligonucleotídico en donde el grupo de bloqueo previene la extensión del cebador y/o inhibe que el cebador sirva como molde para la síntesis de ADN. En algunas realizaciones, el gen de control interno no objetivo de la enzima de edición génica se detecta al usar un ensayo de nucleasa 5' de tres oligonucleótidos.

La divulgación proporciona métodos de enriquecimiento de objetivos que no forman parte de la presente invención y que comprenden: (a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende: (i) un primer cebador oligonucleotídico que tiene un dominio de cola que no es complementario a una secuencia objetivo, el dominio de cola que comprende una primera secuencia universal de cebador; un dominio de escisión colocado en el 5' de un grupo de bloqueo y en el 3' de una posición de variación, el grupo de bloqueo colocado al final o cerca del final del extremo 3' del primer cebador oligonucleotídico en donde el grupo de bloqueo previene la extensión del cebador y/o impide que el primer cebador sirva como molde para la síntesis de ADN; (ii) una muestra de ácido nucleico que ha sido tratada con una enzima de edición génica, que puede o no tener la secuencia objetivo; (iii) una enzima de corte; y (iv) una polimerasa; (b) hibridación del primer cebador con la secuencia de ADN objetivo para formar un sustrato de hebra doble; (c) escindir el primer cebador hibridizado, si el primer cebador es complementario al objetivo, con la enzima de escisión en un punto dentro o adyacente al dominio de escisión para eliminar el grupo de bloqueo del primer cebador; y (d) extender el primer cebador con la polimerasa.

En la invención, la secuencia de ADN objetivo es una muestra que ha sido tratada con una enzima CRISPR. En algunas realizaciones, la secuencia de ADN objetivo es una muestra que ha sido tratada con una enzima Cas9 o Cpf1. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además un segundo cebador en orientación antisentido para apoyar el cebado y la extensión del primer producto de extensión del cebador. En algunas realizaciones, el segundo cebador comprende además un dominio de cola que comprende una segunda secuencia de cebador universal. En algunas realizaciones, los pasos (b)-(d) se llevan a cabo de 1-10 veces. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además la eliminación de cebadores no extendidos de la reacción y la hibridación de cebadores universales con el producto de extensión para formar un segundo producto de extensión. En algunas realizaciones, los cebadores universales comprenden adicionalmente secuencias de cola para la adición de secuencias adaptadoras al segundo producto de extensión. En algunas realizaciones, la secuenciación se lleva a cabo en el segundo producto de extensión para determinar la secuencia del objetivo.

En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 es una enzima de escisión de arranque en caliente que es termoestable y tiene una actividad reducida a temperaturas más bajas. En la invención, la enzima de corte es una enzima ARNasa H2. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 es la enzima ARNasa H2 de *Pyrococcus abyssi*. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 es una enzima de escisión de arranque en caliente modificada químicamente que es termoestable y tiene una actividad reducida a temperaturas más bajas. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 de arranque en caliente es una ARNasa H2 de *Pyrococcus abyssi* modificada químicamente. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 es una enzima de escisión de arranque en caliente que se inactiva reversiblemente a través de la interacción con un anticuerpo a temperaturas más bajas que es termoestable y tiene una actividad reducida a temperaturas más bajas. En algunas realizaciones, el dominio de escisión comprende al menos una base de ARN, y la enzima ARNasa H2 escinde entre la posición complementaria a la variación y la base de ARN.

En algunas realizaciones, el dominio de escisión comprende al menos una base de ARN ubicada en el 3' de la posición de variación, y comprende una base de ADN entre la posición de variación y la base de ARN. En algunas realizaciones, no hay bases de ADN entre la posición de variación y la base de ARN. En algunas realizaciones, el dominio de escisión comprende uno o más nucleósidos 2'-modificados, y la enzima ARNasa H2 escinde entre la posición complementaria a la variación y el uno o más nucleósidos modificados. En algunas realizaciones, el uno o más nucleósidos modificados son 2'-fluorouracilos. En algunas realizaciones, la polimerasa es una polimerasa de alta discriminación. En algunas realizaciones, la polimerasa es una Taq polimerasa mutante H784Q. En algunas realizaciones, la Taq polimerasa mutante H784Q se inactiva reversiblemente mediante modificación química, de aptámeros o de anticuerpos.

La divulgación proporciona cebadores bloqueables para rhPCR, que no forman parte de la invención, que comprenden: 5'-A-B-C-D-E-3', en donde A es opcional y es una extensión de cola que no es complementaria a un objetivo; B es un dominio de secuencia que es complementario a un objetivo; C es un dominio de discriminación; D es un dominio de escindir que, cuando se hibrida con el objetivo, es escindible por la ARNasa H2, y que comprende una base de ARN; y E es un dominio de bloqueo que previene la extensión del cebador.

En algunas realizaciones, D es un dominio de escisión que, cuando se hibrida con el objetivo, es escindible por la ARNasa H2, y que comprende una base de ARN que está: separada del dominio de discriminación por una posición de base o adyacente al dominio de discriminación. En algunas realizaciones, la base de ARN está separada del dominio de discriminación por una posición de base. En algunas realizaciones, la base de ARN es adyacente al dominio de discriminación. Por ejemplo, cuando la base de ARN es adyacente al dominio de discriminación, no hay ningún residuo de ADN intermedio entre la base de ARN y el dominio de discriminación.

En algunas realizaciones, D comprende 1-3 bases de ARN. En algunas realizaciones, el dominio de escisión comprende uno o más de los siguientes restos: un resto de ADN, un resto abásico, un nucleótido modificado o un enlace fosfato-internucleótido modificado. En algunas realizaciones, una secuencia que flanquea el sitio de escisión contiene uno o más enlaces internucleótidos resistentes al escindido por nucleasas. En algunas realizaciones, el enlace resistente a nucleasas es un fosforotioato. En algunas realizaciones, el átomo de oxígeno 3' de al menos uno de los residuos de ARN está sustituido por un grupo amino, un grupo tiol o un grupo metileno.

En algunas realizaciones, el grupo bloqueador se une al nucleótido 3'-terminal del cebador. En la invención, A se compone de una región idéntica a un cebador sentido universal y, opcionalmente, de un dominio de unión a una sonda.

- 5 En algunas realizaciones, el dominio de discriminación C no comprende ni se solapa con el dominio de escisión D. En algunas otras realizaciones, el dominio de discriminación C comprende el dominio de escisión D. En algunas otras realizaciones, el dominio de discriminación C se solapa con el dominio de escisión D.

10 En otro aspecto, la divulgación proporciona cebadores bloqueables para rhPCR, los cebadores comprenden:  
5'-A-B-Z-E-3'

15 en donde A es una extensión de cola que no es complementaria a un objetivo; B es un dominio de secuencia que es complementario a un objetivo; Z comprende: C, un dominio de discriminación, y D, un dominio de escisión que, cuando se hibrida con el objetivo, es escindible por la ARNasa H2; y E es un dominio de bloqueo que previene la extensión del cebador.

20 En algunas realizaciones, el dominio de discriminación C está situado en el 5' del dominio de escisión D. En algunas realizaciones, el dominio de discriminación C se solapa con el dominio de escisión D. En algunas realizaciones, C comprende 1-3 bases de ARN. En algunas realizaciones, C comprende 1 base de ARN. En algunas realizaciones, el dominio de escisión comprende uno o más de los siguientes restos: un resto de ADN, un resto abásico, un nucleósido modificado o un enlace fosfato-internucleótido modificado. En algunas realizaciones, una secuencia que flanquea el sitio de escisión contiene uno o más enlaces internucleósidos resistentes al escindido por nucleasas. En algunas realizaciones, el enlace resistente a nucleasas es un fosforotioato. En algunas realizaciones, el átomo de oxígeno 3' de al menos uno de los residuos de ARN está sustituido por un grupo amino, un grupo tiol o un grupo metileno. En algunas realizaciones, el grupo bloqueador se une al nucleótido 3'-terminal del cebador. En la invención, A comprende una región que es idéntica a un cebador sentido universal y opcionalmente un dominio de unión a sonda.

30 35 En las realizaciones, la divulgación proporciona métodos para detectar una variación en una secuencia de ADN objetivo, que no forman parte de la presente invención, los métodos comprenden: (a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende (i) un cebador oligonucleotídico que tiene un dominio de escisión colocado en el 5' de un grupo de bloqueo, el grupo de bloqueo colocado al final o cerca del final del extremo 3' del cebador oligonucleotídico en donde el grupo de bloqueo previene la extensión del cebador y/o impide que el cebador sirva como molde para la síntesis de ADN, (ii) un ácido nucleico de muestra que puede o no tener la secuencia objetivo, y en donde la secuencia objetivo puede o no tener la variación, (iii) una enzima de corte, y (iv) una polimerasa; (b) hibridar el cebador con la secuencia de ADN objetivo para formar un sustrato de hebra doble; (c) escindir el cebador hibridado, si el cebador es complementario en la variación, con la enzima de escisión en un punto dentro o adyacente al dominio de escisión para eliminar el grupo de bloqueo del cebador; y (d) extender el cebador con la polimerasa.

40 45 En las realizaciones, la divulgación proporciona métodos para detectar una variación en una secuencia de ADN objetivo, que no forman parte de la presente invención, los métodos comprenden: (a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende (i) un cebador oligonucleotídico que tiene un dominio de escisión colocado en el 5' de un grupo de bloqueo, el grupo de bloqueo colocado al final o cerca del final del extremo 3' del cebador oligonucleotídico en donde el grupo de bloqueo previene la extensión del cebador y/o impide que el cebador sirva como molde para la síntesis de ADN, (ii) un ácido nucleico de muestra que puede o no tener la secuencia objetivo, y en donde la secuencia objetivo puede o no tener la variación, (iii) una enzima de corte, y (iv) una polimerasa; (b) hibridar el cebador con la secuencia de ADN objetivo para formar un sustrato de hebra doble; (c) escindir el cebador hibridado, si el cebador es complementario en la variación, con la enzima de escisión en un punto dentro o adyacente al dominio de escisión para eliminar el grupo de bloqueo del cebador; y (d) extender el cebador con la polimerasa.

50 55 En las realizaciones, la divulgación proporciona métodos para detectar una variación en una secuencia de ADN objetivo, que no forman parte de la presente invención, los métodos comprenden: (a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende (i) un cebador oligonucleotídico que tiene un dominio de escisión colocado en el 5' de un grupo de bloqueo, el grupo de bloqueo colocado al final o cerca del final del extremo 3' del cebador oligonucleotídico en donde el grupo de bloqueo previene la extensión del cebador y/o impide que el cebador sirva como molde para la síntesis de ADN, (ii) un ácido nucleico de muestra que puede o no tener la secuencia objetivo, y en donde la secuencia objetivo puede o no tener la variación, (iii) una enzima de corte, y (iv) una polimerasa; (b) hibridar el cebador con la secuencia de ADN objetivo para formar un sustrato de hebra doble; (c) escindir el cebador hibridado, si el cebador es complementario en la variación, con la enzima de escisión en un punto dentro o adyacente al dominio de escisión para eliminar el grupo de bloqueo del cebador; y (d) extender el cebador con la polimerasa.

60 65 En las realizaciones, la divulgación proporciona métodos para detectar una variación en una secuencia de ADN objetivo, que no forman parte de la presente invención, los métodos comprenden: (a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende (i) un cebador oligonucleotídico que tiene un dominio de escisión colocado en el 5' de un grupo de bloqueo, el grupo de bloqueo colocado al final o cerca del final del extremo 3' del cebador oligonucleotídico en donde el grupo de bloqueo previene la extensión del cebador y/o impide que el cebador sirva como molde para la síntesis de ADN, (ii) un ácido nucleico de muestra que puede o no tener la secuencia objetivo, y en donde la secuencia objetivo puede o no tener la variación, (iii) una enzima de corte, y (iv) una polimerasa; (b) hibridar el cebador con la secuencia de ADN objetivo para formar un sustrato de hebra doble; (c) escindir el cebador hibridado, si el cebador es complementario en la variación, con la enzima de escisión en un punto dentro o adyacente al dominio de escisión para eliminar el grupo de bloqueo del cebador; y (d) extender el cebador con la polimerasa.

La divulgación proporciona métodos de enriquecimiento de objetivos que no forman parte de la invención y que comprenden: (a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende (i) un primer cebador oligonucleotídico que tiene un dominio de cola que no sea complementario de una secuencia objetivo, el dominio de cola comprende una primera secuencia universal de cebador; un dominio de escisión colocado en el 5' de un grupo de bloqueo, el

grupo de bloqueo colocado al final o cerca del final del extremo 3' del primer cebador oligonucleotídico, en donde el grupo de bloqueo previene la extensión del cebador y/o inhibe que el primer cebador sirva como molde para la síntesis de ADN, (ii) un ácido nucleico de muestra que puede o no tener la secuencia objetivo, (iii) una enzima de escisión, y (iv) una polimerasa; (b) hibridar el primer cebador con la secuencia de ADN objetivo para formar un sustrato de hebra doble; (c) escindir el primer cebador hibridado, si el primer cebador es complementario al objetivo, con la enzima de escisión en un punto dentro del dominio de escisión o adyacente al mismo para eliminar el grupo de bloqueo del primer cebador; y (d) extender el primer cebador con la polimerasa.

5 En algunas realizaciones, los métodos comprenden además un segundo cebador en orientación antisentido para apoyar el cebado y la extensión del primer producto de extensión del cebador. En algunas realizaciones, el segundo cebador comprende además un dominio de cola que comprende una segunda secuencia de cebador universal. En algunas realizaciones, los pasos (b)-(d) se llevan a cabo entre 1 y 10 veces. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además la eliminación de cebadores no extendidos de la reacción y la hibridación de cebadores universales con el producto de extensión para formar un segundo producto de extensión. En algunas realizaciones, los cebadores universales comprenden adicionalmente secuencias de cola para la adición de secuencias adaptadoras al segundo producto de extensión. En algunas realizaciones, la secuenciación se lleva a cabo en el segundo producto de extensión para determinar la secuencia del objetivo. En la invención, la secuencia de ADN objetivo es una muestra que ha sido tratada con una enzima CRISPR. En algunas realizaciones, la secuencia de ADN objetivo es una muestra que ha sido tratada con una enzima Cas9 o Cpf1. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 es una enzima de escisión de arranque en caliente que comprende al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con su tipo silvestre, que es termoestable y tiene una actividad reducida a temperaturas más bajas, y que presenta una discriminación de apareamiento erróneo potenciada durante la rhPCR en comparación con su tipo silvestre. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 de arranque en caliente es la ARNasa H2 de *Pyrococcus abyssi* que comprende (a) una sustitución de aminoácidos G12A; (b) una sustitución de aminoácidos P13T; o (c) una sustitución de aminoácidos G169A; o (d) una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 se modifica químicamente. En algunas realizaciones, la enzima ARNasa H2 es una enzima de escisión de arranque en caliente que se inactiva reversiblemente a través de la interacción con un anticuerpo a temperaturas más bajas. En algunas realizaciones, el dominio de corte comprende al menos una base de ARN. En algunas realizaciones, el dominio de escisión está colocado en el 3' de la posición de variación. En algunas realizaciones, el dominio de corte comprende uno o más nucleósidos 2'-modificados, y la enzima ARNasa H2 corta entre la posición complementaria a la variación y el uno o más nucleósidos modificados. En algunas realizaciones, el uno o más nucleósidos modificados son 2'-fluorouracilos. En algunas realizaciones, la polimerasa es una polimerasa de alta discriminación. En algunas realizaciones, la polimerasa es una Taq polimerasa mutante H784Q. En algunas realizaciones, la Taq polimerasa mutante H784Q se inactiva reversiblemente mediante modificación química, de aptámeros o de anticuerpos.

40 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que comúnmente se entiende por alguien con conocimientos ordinarios en la técnica. En caso de conflicto, prevalecerá el presente documento, incluidas las definiciones. Los métodos y materiales preferidos se describen a continuación, aunque en la práctica o en las pruebas de la presente invención se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente.

45 "Complemento" o "complementario" como se usa en la presente significa un ácido nucleico, y puede significar apareamiento de bases Watson-Crick (por ejemplo, A-T/U y C-G) o Hoogsteen entre nucleótidos o análogos de nucleótidos de moléculas de ácido nucleico.

50 "Fluoróforo" o "etiqueta fluorescente" se refiere a compuestos con un máximo de emisión fluorescente entre unos 350 y 900 nm.

55 "Hibridación", como se usa en la presente, se refiere a la formación de una estructura dúplex por dos ácidos nucleicos de hebra única debido al emparejamiento de bases complementarias. La hibridación se puede producir entre hebras de ácido nucleico totalmente complementarias o entre hebras de ácido nucleico "sustancialmente complementarias" que contienen regiones menores de apareamiento erróneo. "Secuencias idénticas" se refiere a secuencias de la misma secuencia exacta o secuencias lo suficientemente similares como para actuar de la misma manera a efectos de generación de señales o hibridación con secuencias complementarias de ácido nucleico. Por "dímeros de cebadores" se entiende la hibridación de dos cebadores oligonucleotídicos. Por "condiciones estrictas de hibridación", como se usa en la presente, se entienden aquellas condiciones en las que se prefiere fuertemente la hibridación de hebras de ácido nucleico totalmente complementarias. En condiciones de hibridación estrictas, una primera secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, un cebador) se hibridará con una segunda secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia objetivo), tal como ocurre en una mezcla compleja de ácidos nucleicos. Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y serán distintas en circunstancias diferentes. Las condiciones estrictas se pueden seleccionar para que sean aproximadamente 5-10 °C más bajas que el punto de fusión térmica ( $T_m$ , por sus siglas en inglés) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definido. La  $T_m$  puede ser la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración nucleica definidos) a la que 50 % de un oligonucleótido complementario a un objetivo hibrida con la secuencia objetivo en equilibrio (como las secuencias de direccionamiento están presentes en exceso, a  $T_m$ , 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las

- condiciones estrictas pueden ser aquellas en las que la concentración de sal es inferior a aproximadamente 1,0 M de ion de sodio, tal como aproximadamente 0,01-1,0 M de concentración de ion de sodio (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, aproximadamente 10-50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, mayor a 5) aproximadamente 50 nucleótidos). También se pueden conseguir condiciones más estrictas al añadir agentes desestabilizadores tales como la formamida. Para una hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser al menos de 2 a 10 veces la hibridación de fondo. Como ejemplo de condiciones de hibridación estrictas cabe citar las siguientes: 50 % de formamida, 5x de SSC (por sus siglas en inglés), y 1 % de SDS (por sus siglas en inglés), incubando a 42 °C, o, 5x de SSC, 1 % de SDS, incubando a 65 °C, con lavado en 0,2x de SSC, y 0,1 % de SDS a 65 °C.
- Los términos "ácido nucleico", "oligonucleótido" o "polinucleótido", como se usan en la presente, se refieren a al menos dos nucleótidos unidos covalentemente entre sí. La representación de una hebra única también define la secuencia de la hebra complementaria. Así, un ácido nucleico también abarca la hebra complementaria de una hebra representada. Se pueden usar muchas variantes de un ácido nucleico para el mismo fin que un ácido nucleico determinado. Así, un ácido nucleico también abarca ácidos nucleicos sustancialmente idénticos y sus complementos. Una hebra única proporciona una sonda que puede hibridar con una secuencia objetivo en condiciones de hibridación estrictas. Así, un ácido nucleico también abarca una sonda que hibrida en condiciones de hibridación estrictas.
- Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, o contener porciones de secuencias tanto bicatenario como monocatenario. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN, o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, y combinaciones de bases incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Los ácidos nucleicos se pueden obtener por métodos de síntesis química o por métodos recombinantes. Una secuencia particular de ácido nucleico puede abarcar variantes de la misma modificadas de forma conservadora (por ejemplo, sustituciones de codones), alelos, ortólogos, polimorfismos de nucleótido único (SNP) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente.
- La "reacción en cadena de la polimerasa (PCR)" se refiere a la reacción enzimática en la que se sintetizan y amplifican fragmentos de ADN a partir de un ADN sustrato *in vitro*. La reacción típicamente es el uso de dos cebadores de oligonucleótidos sintéticos, que son complementarios a secuencias de nucleótidos en el ADN sustrato que están separadas por una corta distancia de unos pocos cientos a unos pocos miles de pares de bases, y el uso de una ADN polimerasa termoestable. La reacción en cadena consiste en una serie de 10 a 40 ciclos. En cada ciclo, el ADN sustrato se desnaturaliza primero a alta temperatura. Despues de enfriarse, los cebadores sintéticos, presentes en gran exceso, se hibridan con el ADN sustrato para formar estructuras de hebra doble a lo largo de secuencias de nucleótidos complementarias. Los complejos cebador-ADN sustrato servirán posteriormente como sitios de iniciación para una reacción de síntesis de ADN catalizada por una ADN polimerasa, resultando en la síntesis de una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra de ADN sustrato. El proceso de síntesis se repite con cada ciclo adicional, creando un producto amplificado del ADN sustrato.
- Un "cebador", como se usa en la presente, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de iniciación para la síntesis de ADN en condiciones adecuadas. Las condiciones adecuadas incluyen aquellas en las que se produce la hibridación del oligonucleótido con un ácido nucleico molde, y la síntesis o amplificación de la secuencia objetivo, en presencia de cuatro nucleósidos trifosfatos diferentes y un agente de extensión (por ejemplo, una ADN polimerasa) en un amortiguador adecuado y a una temperatura adecuada.
- Una "sonda" y "sonda de generación fluorescente" son sinónimos y se refieren a a) un oligonucleótido de secuencia específica con un fluoróforo y/o un apagador unido, y opcionalmente un aglutinante de surco menor o b) un reactivo de unión al ADN, tal como, pero no se limitan a, el tinte SYBR® Green.
- Por "atenuador" se entiende una molécula o parte de un compuesto capaz de reducir la emisión de un donante fluorescente cuando se une al donante o se encuentra cerca de él. El enfriamiento se puede producir por cualquiera de los mecanismos siguientes: transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, transferencia de electrones fotoinducida, potenciación paramagnética del cruce entre sistemas, acoplamiento de intercambio Dexter y acoplamiento de excitones tal como la formación de complejos oscuros.
- El término "ARNasa H PCR (rhPCR)" se refiere a una reacción de PCR que usa cebadores oligonucleótidos "bloqueados" y una enzima ARNasa H. Los cebadores "bloqueados" contienen al menos un resto químico (tal como, pero no se limitan a, un residuo de ácido ribonucleico) unido al cebador u otro oligonucleótido, de modo tal que se produce la hibridación del cebador bloqueado con el ácido nucleico molde, sin amplificación del ácido nucleico por la ADN polimerasa. Una vez que el cebador bloqueado se hibrida con el molde o el ácido nucleico objetivo, se elimina el resto químico escindiéndolo con una enzima ARNasa H, que se activa a alta temperatura (por ejemplo, 50 °C o más). Despues de la escisión de la ARNasa H, se puede producir la amplificación del ADN objetivo.

El término "dominio de discriminación" es diferente del dominio de escisión. El dominio de discriminación es la posición del sitio de mutación potencial, y la enzima solamente escindirá en el sitio de escisión si se cumplen los criterios del dominio de discriminación. Por ejemplo, en una realización, la ARNasa H2 escindirá o no un objetivo de hebra doble en el residuo de ARN (dominio de escisión), dependiendo de si existe una mutación en el dominio de discriminación.

Los métodos descritos en la presente se pueden realizar usando cualquier enzima ARNasa H2 adecuada derivada u obtenida de cualquier organismo. Típicamente, las reacciones de PCR dependientes de ARNasa H se realizan usando una enzima ARNasa H obtenida o derivada de la arquea hipertermófila *Pyrococcus abyssi* (*P.a.*), tal como la ARNasa H2. Así, en la presente invención, la enzima ARNasa H2 empleada en los métodos descritos en la presente es preferiblemente una ARNasa H2 obtenida o derivada de *Pyrococcus abyssi*. En otras realizaciones, la enzima ARNasa H2 empleada en los métodos descritos en la presente puede obtenerse o derivarse de otras especies, por ejemplo, *Pyrococcus furiosis*, *Pyrococcus horikoshii*, *Thermococcus kodakarensis* o *Thermococcus litoralis*.

Los siguientes ejemplos ilustran mejor la invención, pero no se debe interpretar que limitan en modo alguno su alcance.

#### EJEMPLO 1 - como referencia

Este ejemplo demuestra un ensayo de rhPCR potenciado que usa una ADN polimerasa y una ARNasa H2 altamente discriminatorias para la discriminación

Para demostrar la utilidad de estos nuevos diseños de ensayo, se diseñaron rhCebadores y cebadores estándar específicos de alelo frente a rs113488022, la mutación V600E en el gen BRAF humano. Estos cebadores se probaron en PCR y rhPCR con Taq polimerasa WT o mutante H784Q. Los cebadores usados en estos ensayos fueron los indicados en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1-7).

Tabla 1: Secuencia de los oligonucleótidos empleados en el ensayo de discriminación de SNP descrito en el Ejemplo 1.

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Cebador sentido no discriminante	GCTGTGATTTGGTCTAGCTACAG	SEQ ID NO. 1
Cebador sentido del alelo 1 ASP1 por ASPCR	GCTGTGATTTGGTCTAGCTACAGT	SEQ ID NO. 2
Cebador sentido del alelo 2 ASP2 por ASPCR	GCTGTGATTTGGTCTAGCTACAGA	SEQ ID NO. 3
Sonda	FAM-TCCCATCAG-ZEN- TTTGAACAGTTGTCTGGAA-IBFQ	SEQ ID NO. 4
rhCebador sentido del alelo 1 de rs113488022 ASP1	GCTGTGATTTGGTCTAGCTACAGTgAA ATG-x	SEQ ID NO. 5
rhCebador sentido del alelo 2 de rs113488022 ASP2	GCTGTGATTTGGTCTAGCTACAGAgAA ATG-x	SEQ ID NO. 6
rhCebador antisentido	GCCCTCAATTCTTACCATCCACAAaTG GAA-x	SEQ ID NO. 7

Las secuencias de ácido nucleico se muestran 5'-3'. ADN en mayúsculas, ARN en minúsculas. La ubicación del posible apareamiento erróneo aparece subrayada. ZEN = apagador interno ZEN™ (IDT, Coralville, IA), FAM = 6-carboxifluoresceína, IBFQ = Iowa Black® FQ (apagador de fluorescencia, IDT, Coralville, IA), y x = bloque espaciador de propanodiol C3

En estos ensayos se usaron volúmenes de reacción de 10 µL. Para llevar a cabo la reacción, se combinaron 5 µL de 2x la mezcla de genotipado maestra para rhPCR de Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, que contiene dNTPs, Taq ADN polimerasa H784Q mutante o WT, estabilizadores y MgCl<sub>2</sub>) con 200 nM (2 pmol) de cualquiera de los cebadores alélicos. También se añadieron 200 nM (2 pmol) de la sonda, así como 200 nM (5 pmol) del cebador antisentido. Adicionalmente, 2,5 mU (5,25 fmol/0,53 nM) de *P.a.* La ARNasa H2 y 1000 copias de molde sintético de gBlock™ (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, 1000 copias del alelo 1, 500 copias del alelo 1+500 copias del alelo 2 (heterocigoto), o 1000 copias del alelo 2 (para las secuencias de gBlock™, ver la Tabla 2, SEQ ID NO: 8-9) a la mezcla de reacción. La reacción se termocicló en un sistema en tiempo real Bio-Rad™ CFX384™. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 95<sup>3:00</sup> - (95<sup>0:10</sup>-65<sup>0:30</sup>) x 65 ciclos. Cada reacción se realizó por triplicado.

Tabla 2: Moldes sintéticos gBlock para el ensayo del Ejemplo 1

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Molde 1 de gBlock de rs113488022	AAAAAATAAGAACACTGATTGTGAAT ACTGGAACTATGAAAACATATAGTTGA GACCTCAATGACTTCTAGTAACATCAGCA GCATCTCAGGCCAAAAATTAAATCAGTG GAAAATAGCCTCAATTCTACCATCCAC AAAATGGATCCAGACAACTGTTCAAACGT ATGGGACCCACTCCATCGAGATT <u>T</u> ACTGT AGCTAGACCAAAATCACCTATTTTACTGT GAGGTCTTCATGAAGAAATATACTGAGG TGTAGTAAGTAAAGGAAAACAGTAGATCT CATTTCTATCAGAGCAAGCATTATGAAG AGTTTAGGTAAGAGATCTAATTCTATAAT TCTGTAATATAATATTCTTAAAACATAGT <u>A</u> CTTCATCTTCTCTTA	SEQ ID NO. 8
Molde 2 de gBlock de rs113488022	AAAAAATAAGAACACTGATTGTGAAT ACTGGAACTATGAAAACATATAGTTGA GACCTCAATGACTTCTAGTAACATCAGCA GCATCTCAGGCCAAAAATTAAATCAGTG GAAAATAGCCTCAATTCTACCATCCAC AAAATGGATCCAGACAACTGTTCAAACGT ATGGGACCCACTCCATCGAGATT <u>C</u> CTGT AGCTAGACCAAAATCACCTATTTTACTGT GAGGTCTTCATGAAGAAATATACTGAGG TGTAGTAAGTAAAGGAAAACAGTAGATCT CATTTCTATCAGAGCAAGCATTATGAAG AGTTTAGGTAAGAGATCTAATTCTATAAT TCTGTAATATAATATTCTTAAAACATAGT <u>A</u> CTTCATCTTCTCTTA	SEQ ID NO. 9

Las secuencias de ácido nucleico se muestran 5'-3'. La ubicación de los SNP se muestra en negrita y subrayada.

Los resultados de Cq del experimento se muestran en la Tabla 3. Estos datos muestran que la discriminación de apareamientos erróneos del sistema de ensayo aumenta con la rhPCR respecto a la ASPCR con la Taq polimerasa WT, y que la discriminación se potencia al usar la Taq polimerasa H784Q.

5

Tabla 3: Valores de Cq resultantes

	WT Taq				H784Q			
	Alelo 1	Het	Alelo 2	NTC	Alelo 1	Het	Alelo 2	NTC
No discrimina	29.3	29.3	29.4	>65	30.6	30.6	30.8	>65
ASP1 por ASPCR	30.2	30.2	31.4	>65	29.2	32.5	40.3	>65
ASP2 por ASPCR	36.7	30.5	29.4	>65	44.2	31.7	30.8	>65
ASP1 por rhPCR	30.9	32.1	38.2	>65	31.9	31.4	49.2	>65
ASP2 por rhPCR	39.3	31.0	30.8	>65	43.4	33.9	32.5	>65

Todos los números de esta tabla representan valores de Cq obtenidos con el instrumento CFX384™ (Bio-Rad™, Hercules, CA).

10

**EJEMPLO 2 - como referencia**

El siguiente ejemplo muestra un ensayo de rhPCR potenciado que usa una ADN polimerasa altamente discriminatoria y ARNasa H2 para la discriminación.

5 Para demostrar la funcionalidad de este nuevo diseño de ensayo, se diseñaron rhCebadores y cebadores estándar específicos de alelo frente a rs113488022, la mutación V600E en el gen BRAF humano. Estos cebadores se probaron en PCR y rhPCR con la Taq polimerasa mutante H784Q. Los cebadores usados en estos ensayos fueron los indicados en la Tabla 4 (SEQ ID NO: 1, 4 y 10-12).

10 Tabla 4: Secuencia de los oligonucleótidos empleados en el ensayo de discriminación de SNP descrito en el Ejemplo 2

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Cebador sentido no discriminatorio	GCTGTGATTTGGTCTAGCTACAG	SEQ ID NO. 1
Sonda	FAM-TCCCAGTCAG-ZEN- TTTGAACAGTTGTCTGGAA-IBFQ	SEQ ID NO. 4
rhCebador sentido del alelo 1 rs113488022 dxxd	GCTGTGATTTGGTCTAGCTACAGTg AxxTG	SEQ ID NO. 10
rhCebador sentido del alelo 2 rs113488022 dxxd	GCTGTGATTTGGTCTAGCTACAGAg AxxTG	SEQ ID NO. 11
rhCebador antisentido	GCCCTCAATTCTTACCATCCACAAa TGGAA-x	SEQ ID NO. 12

Las secuencias de ácido nucleico se muestran 5'-3'. ADN en mayúsculas, ARN en minúsculas. La ubicación del posible apareamiento erróneo aparece subrayada. ZEN = apagador fluorescente Zen™ interno (IDT, Coralville, IA). FAM = 6-carboxifluoresceína, IBFQ = Iowa Black FQ (amortiguador de fluorescencia), y x = espaciador de propanodiol C3.

15 En estos ensayos se usaron volúmenes de reacción de 10 µL. Para llevar a cabo la reacción, se combinaron 5 µL de 2x la mezcla de genotipado maestra para rhPCR de Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, que contiene dNTPs, ADN polimerasa mutante H784Q, estabilizadores y MgCl<sub>2</sub>) con 200 nM (2 pmol) de cualquiera de los cebadores alélicos. También se añadieron 200 nM (2 pmol) de la sonda, así como 200 nM (5 pmol) del cebador antisentido. Adicionalmente, 7,5 mU (15,75 fmol/1,58 nM), 50 mU (105 fmol/10,5 nM) o 200 mU (420 fmol/42 nM) de P<sub>a</sub>. La ARNasa H2 y 5e4 copias de molde de gBlock™ sintético (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, 1e5 copias del alelo 1, 5e4 copias del alelo 1+5e4 copias del alelo 2 (heterocigoto), o 1e5 copias del alelo 2 (para las secuencias de gBlock™, ver la Tabla 2, SEQ ID NO: 8-9) a la mezcla de reacción. La reacción se termocicló en un sistema en tiempo real Bio-Rad™ CFX384™. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 95<sup>3:00</sup> - (95<sup>0:10</sup>-65<sup>0:30</sup>) x 65 ciclos. Cada reacción se realizó por triplicado.

20 25 Los resultados de Cq del experimento se muestran en la Tabla 5. Estos datos muestran que la discriminación de apareamientos erróneos del sistema de ensayo aumenta con la rhPCR respecto a la ASPCR con la Taq polimerasa WT, y que la discriminación se potencia al usar la Taq polimerasa H784Q.

Tabla 5: Valores de Cq resultantes

Promedios	Alelo 1	Het	Alelo 2	NTC	Δ Cq
Desbloqueado	7,5 mU	21.9	22.3	22.1	>75
	50 mU	22.7	22.5	22.7	>75
	200 mU	21.8	21.8	21.9	>75
AgAxxTG	7,5 mU	43.7	25.6	24.6	>75
	50 mU	50.3	24.5	23.5	>75
	200 mU	48.5	25.2	24.1	>75
TgAxxTG	7,5 mU	25.1	26.3	42.5	>75
	50 mU	24.2	25.4	41.0	>75
	200 mU	22.9	23.8	37.2	>75

Todos los números de esta tabla representan valores de Cq obtenidos con el instrumento CFX384™ (Bio-Rad™, Hercules, CA).

30 Los valores delta Cq fueron significativamente superiores a los obtenidos con las versiones Gen 1 de estos cebadores, lo que indica que existe una ventaja en este diseño de cebador, como se ha visto anteriormente en la rhPCR.

#### EJEMPLO 3 - como referencia

35 El siguiente ejemplo ilustra la mayor fiabilidad de los ensayos universales que usan una ADN polimerasa con una alta discriminación de apareamientos erróneos.

Para demostrar que los ensayos divulgados pueden funcionar en un formato universal y que mejoran significativamente con una polimerasa con alta discriminación de apareamientos erróneos, se diseñaron cebadores de ensayo "universales" frente a rs351855, la mutación G338R en el gen humano FGFR4. Este diseño de ensayo "universal" tiene numerosas ventajas, incluida la capacidad de multiplexar los rhCebadores específicos de alelo y obtener lecturas de múltiples colores. Los cebadores usados en este ensayo fueron los indicados en la Tabla 6 (SEQ ID NO: 13-18).

Tabla 6: Secuencias de los oligonucleótidos empleados en el ensayo "universal" de discriminación de SNP

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Cebador sentido universal	CGCCGCGTATAGTCCCAGCGTAAA	SEQ ID NO. 13
Sonda 1 (FAM)	FAM-C+CATC+A+C+CGTG+CT-IBFQ	SEQ ID NO. 14
Sonda 2 (HEX)	HEX-CAATC+C+C+CGAG+CT-IBFQ	SEQ ID NO. 15
Cebador sentido del alelo 1 de rs351855	GCCCCATGTCCCAGCGAACCATCACCGTGCTA GCCCTCGATA <u>CAGCCC</u> gGCCAC-x	SEQ ID NO. 16
Cebador sentido del alelo 2 de rs351855	GCCCCATGTCCCAGCGAACAA <u>TCCCCGAGCTG</u> CCCTCGATA <u>CAGCCT</u> gGCCAC-x	SEQ ID NO. 17
Cebador antisentido	GCGGCCAGGTATA <u>CGGACATcATCCA</u> -x	SEQ ID NO. 18

Las secuencias de ácido nucleico se muestran 5'-3'. ADN en mayúsculas, ARN en minúsculas. La ubicación del posible apareamiento erróneo aparece subrayada. Los residuos de LNA se designan con un +. FAM = 6-carboxifluoresceína, HEX = 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína, IBFQ = Iowa Black FQ (amortiguador de fluorescencia), y x = bloque espaciador de propanodiol C3.

En estos ensayos se usaron volúmenes de reacción de 10 µL. Para llevar a cabo la reacción, se combinaron 5 µL de 2x la mezcla de genotipado maestra para rhPCR de Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, que contiene dNTPs, Taq ADN polimerasa mutante o WT, estabilizadores y MgCl<sub>2</sub>) con 50 nM (500 fmol) de cada uno de los dos cebadores alélicos. También se añadieron 250 nM (2,5 pmol) de cada una de las dos sondas, así como 500 nM (5 pmol) del cebador sentido universal y 500 nM (5 pmol) del cebador antisentido. Adicionalmente, 2,5 mU (5,25 fmol/0,53 nM) de P.a. La ARNasa H2 y 1000 copias de molde sintético de gBlock™ (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, 1000 copias del alelo 1, 500 copias del alelo 1+500 copias del alelo 2 (heterocigoto), o 1000 copias del alelo 2 (para las secuencias de gBlock™, ver la Tabla 7, SEQ ID NO: 19-20) a la mezcla de reacción. La reacción se termocicló en un sistema en tiempo real Bio-Rad™ CFX384™. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 95<sup>3:00</sup> - (95<sup>0:10</sup>-60<sup>0:30</sup>) x 3 ciclos - (95<sup>0:10</sup>-65<sup>0:30</sup>) x 65 ciclos. Cada reacción se realizó por triplicado. Las lecturas de fluorescencia se tomaron después de completar un total de 50 ciclos. Los valores de fluorescencia se trazaron en los ejes FAM y HEX, y los resultados se muestran en las Figuras 2A y 2B.

Tabla 7: Moldes sintéticos gBlock para el Ejemplo 3

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Molde 1 de gBlock de rs351855	GTTGGGAGCTGGGAGGGACTGAGTTAGGG TGCACGGGGCGGCCAGTCTACCACGTGAC CAGTTTGTCTGTCTGTGTGTCCATGTGC GAGGGCAGAGGAGGGACCCACATGGACC GCAGCAGCGCCCGAGGCCAGGTATAACGGA CATCATCCTGTACGCCCTGGGCTCCCTGGC CTTGGCTGTGCTCTGCTGCTGGCC <u>GGG</u> CT GTATCGAGGGCAGGCCCTCCACGGCCGGC ACCCCGCCCCGCCACTGTGCAGAAAG CTCTCCCGCTTCCCTCTGGCCCACAGGTA CTGGGCGCA <u>TCCCCCACCTCACATGTGAC</u> AGCCTGACTCCAGCAGGCAGAACCAAGTC TCCCACTTTGCAGTTCTCCCTGGAGTCAGG CTCTTCCGGCAAGTCAAGCT	SEQ ID NO. 19

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Molde 2 de gBlock de rs351855	GTTGGGAGCTGGGAGGGACTGAGTTAGGG TGCACGGGGCGGCCAGTCTACCACTGAC CAGTTGTCTGTCTGTGTGTCCATGTGC GAGGGCAGAGGAGGGACCCCACATGGACC GCAGCAGCGCCCGAGGCCAGGTATAACGGA CATCATCCTGTACCGCTGGGCTCCCTGGC CTTGGCTGTGCTCCTGCTGGCC <u>A</u> GGCT GTATCGAGGGCAGGCCCTCCACGGCCGGC ACCCCCGCCGCCACTGTGCAGAAAG CTCTCCCCTTCCTGGCCCGACAGGTA CTGGCGCACTCCCCCACCTCACATGTGAC AGCCTGACTCCAGCAGGCAGAACCAAGTC TCCCACTTGCAGITCTCCCTGGAGTCAGG CTCTCCGGCAAGTCAAGCT	SEQ ID NO. 20

Las secuencias de ácido nucleico se muestran 5'-3'. La ubicación de los SNP se muestra en negrita y subrayada.

Los resultados ilustran que la discriminación por apareamiento erróneo entre homocigotos es suficiente con ambas polimerasas, aunque los datos resultantes usando la Taq WT demuestran que es más difícil hacer una llamada alélica. Sin embargo, es importante destacar que la Taq polimerasa WT no puede discriminar eficientemente los

5 heterocigotos de los homocigotos, y los coloca demasiado cerca de las señales de los alelos 1 y 2 (Figura 2A). En cambio, la señal de los heterocigotos en los ensayos que usan la Taq polimerasa mutante se distingue fácilmente de la de los homocigotos (Figura 2B).

10 La importancia de la Taq mutante se puede comprender mejor al examinar los valores de Cq de este ejemplo (Tabla 8). Los datos muestran que la mutante Taq H784Q no solamente aumenta drásticamente la discriminación del apareamiento erróneo, sino que los Cq de los NTC disminuyen de los 50 bajos a medios, a mayores que el número probado en el ensayo (>65). A partir de este experimento, se demuestra que la identidad alélica puede determinarse a partir de los valores de Cq, así como de la fluorescencia en el punto final.

15 Tabla 8: Datos de Cq y delta Cq para el experimento descrito en el Ejemplo 3

Molde	WT Taq			H784Q		
	FAM	HEX	Delta Cq	FAM	HEX	Delta Cq
Alelo 1	32.9	31.3	-1.6	37.5	56.8	19.3
Alelo 1	31.9	31.1	-0.8	36.2	51.4	15.2
Alelo 1	31.8	31.0	-0.9	36.6	54.3	17.8
Heterocigoto	33.0	29.4	-3.5	38.7	37.8	-0.9
Heterocigoto	32.8	29.7	-3.1	38.7	38.2	-0.5
Heterocigoto	33.2	30.0	-3.3	39.9	39.1	-0.8
Alelo 2	35.1	29.1	6.0	50.6	36.5	14.1
Alelo 2	34.7	29.3	5.4	52.1	36.6	15.5
Alelo 2	34.5	29.0	5.5	50.7	36.1	14.6
NTC	51.8	56.1	---	>65	>65	---
NTC	52.8	56.1	---	>65	>65	---
NTC	52.1	50.7	---	>65	>65	---

Todos los números de esta tabla representan valores de Cq y valores delta Cq obtenidos con el instrumento CFX384 (Bio-Rad™, Hercules, CA).

#### EJEMPLO 4 - como referencia

20 El siguiente ejemplo ilustra la detección de variantes alélicas raras con los diseños de ensayo de la presente invención. Para demostrar la utilidad de estos nuevos diseños de ensayo para detectar variantes alélicas raras, se usaron los rhCebadores de segunda generación (rdxxdm) descritos previamente frente a rs113488022, la mutación V600E en el gen BRAF humano (ver la Tabla 4; SEQ ID NO: 1, 4 y 10-12).

En estos ensayos se usaron volúmenes de reacción de 10 µL. Para llevar a cabo la reacción, se combinaron 5 µL

de 2x la mezcla de genotipado maestra para rhPCR de Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, que contiene dNTPs, Taq ADN polimerasa H784Q mutante o WT, estabilizadores y MgCl<sub>2</sub>) con 200 nM (2 pmol) de cualquiera de los cebadores alélicos, o del cebador sentido no discriminatorio. También se añadieron 200 nM (2 pmol) de la sonda, así como 200 nM (5 pmol) del cebador antisentido. Adicionalmente, 50 mU (105 fmol/10,5 nM) de P.a. La ARNasa H2 y 50.000 copias de molde de coincidencia de gBlock™ sintético (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA), se combinó con 0, 50 o 500 copias del alelo opuesto (para las secuencias de gBlock™, ver la Tabla 6, SEQ ID NO: 16-17) a la mezcla de reacción. La reacción se termocicló en un sistema en tiempo real Bio-Rad™ CFX384™. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 95<sup>3:00</sup> - (95<sup>0:10</sup>-60<sup>0:30</sup>) x 65 ciclos. Cada reacción se realizó por triplicado.

Los datos de la polimerasa WT se muestran en la Tabla 9, y los de la polimerasa Taq mutante H784Q en la Tabla 10. Una de las ventajas de este sistema para la detección de alelos raros sobre a la rhPCR "convencional" es la posibilidad de usar una única cantidad de ARNasa H2 para ambos alelos. Esta ventaja reduce a la mitad la necesidad potencial de determinar la cantidad de enzima necesaria para escindir.

Tabla 9: Valores promedio de Cq y delta Cq para el experimento de alelos raros con la Taq polimerasa WT descrita en el Ejemplo 4.

	Fondo	50,000	50,000	50,000	0	0	0
	Objetivo	500	50	0	500	50	0
SEQ ID	No discrimina	22.9	23.1	22.8	30.4	34.2	>65
No. 1							
SEQ ID NO. 10	... <u>TgAxxTG</u>	31.6	34.5	36.1	31.6	36.0	>65
SEQ ID NO. 11	... <u>AgAxxTG</u>	29.1	29.1	29.9	30.8	34.4	>65

Todos los números de esta tabla representan valores de Cq y valores delta Cq obtenidos con el instrumento CFX384 (Bio-Rad™, Hercules, CA). ADN en mayúsculas, ARN en minúsculas. La ubicación del posible apareamiento erróneo está subrayada. x = bloque espaciador interno de propanodiol C3.

Tabla 10: Valores promedio de Cq y delta Cq para el experimento de alelos raros con la Taq polimerasa mutante H784Q descrita en el Ejemplo 4.

	Fondo	50,000	50,000	50,000	0	0	0
	Objetivo	500	50	0	500	50	0
SEQ ID No. 1	No discrimina	22.7	23.2	23.2	31.5	34.2	>65
SEQ ID NO. 10	... <u>TgAxxTG</u>	33.8	36.6	47.3	33.1	36.4	>65
SEQ ID NO. 11	... <u>AgAxxTG</u>	32.1	35.2	38.8	32.0	35.5	>65

Todos los números de esta Tabla representan valores de Cq y delta Cq obtenidos con el instrumento CFX384 (Bio-Rad™, Hercules, CA). ADN en mayúsculas, ARN en minúsculas. La ubicación del posible apareamiento erróneo está subrayada. x = bloque espaciador interno de propanodiol C3.

Los datos muestran claramente que la ADN polimerasa H784Q permite detectar 50 copias del objetivo en 50.000 copias de ADN de fondo (un nivel de discriminación de 1:1000) para el alelo mutante A de rs113488022, con un delta Cq de más de 11 ciclos. Aunque en este ensayo solamente se observaron algo más de 3 ciclos para el alelo T, se trataba de una mejora significativa con respecto a la Taq polimerasa WT, que no mostró ninguna discriminación para el alelo T, y solamente un delta de 3 ciclos para el alelo A.

#### EJEMPLO 5 - como referencia

Este ejemplo demuestra el éxito de la discriminación alélica con el uso de un ensayo universal de genotipado rhPCR y la mezcla maestra de genotipado rhPCR de Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA), así como la sólida estabilidad de los componentes de la reacción. Para demostrar la robustez del diseño del ensayo y de los componentes de la mezcla, se diseñaron cebadores universales frente al rs4657751, un SNP localizado en el cromosoma 1 humano (ver la Tabla 11, SEQ ID NO: 14, 21-25).

Se prepararon reacciones de genotipado rhPCR universales idénticas en dos placas PCR blancas Hard-Shell® de 384 pozos con faldón (Bio-Rad, Hercules, CA) en el sistema de detección de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX384 Touch™ con un volumen final de 10 µL. Cada pozo contenía los cebadores del ensayo de rhPCR (150 nM del cebador específico del alelo 1 de rs4657751 (SEQ ID NO: 23), 150 nM del cebador específico de alelo 2 de rs4657751 (SEQ ID NO: 24), y 500 nM de cebador específico del locus de rs4657751 (SEQ ID NO: 25)). Las reacciones contenían oligos reporteros universales en las siguientes concentraciones: 250 nM de sonda FAM universal (SEQ ID NO: 14), 450 nM de Yakima Amarillo® universal (SEQ ID NO: 22) y 1000 nM de cebador sentido universal (SEQ ID NO: 21), y 5 µL de 2x la mezcla de genotipado maestra para rhPCR de Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, que contiene dNTPs, una Taq polimerasa H784Q mutante (ver Behlke, et al. U.S. 2015/0191707), ARNasa H2 de *Pyrococcus abyssi* modificada químicamente (ver Walder et al. UA20130288245A1), estabilizadores y MgCl<sub>2</sub>).

Se usaron fragmentos génicos gBlocks® (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA) que contenían

# ES 2 989 461 T3

cualquiera de los alelos del SNP de rs4657751 como fuente de ADN molde (ver la Tabla 12, SEQ ID NO: 26 y 27). Cada pozo contenía un molde que representaba uno de los tres genotipos posibles: alelo 1 homocigoto (1000 copias del molde gBlock® del alelo 1 de rs4657751 (SEQ ID NO: 26)), alelo 2 homocigoto (1000 copias del molde gBlock® del alelo 2 de rs4657751 (SEQ ID NO: 27)), o heterocigoto (mezcla de 500 copias del molde gBlock® del alelo 1 de rs4657751 (SEQ ID NO: 26) y 500 copias del molde gBlock® del alelo 2 de rs4657751 (SEQ ID NO: 27)). Se añadió molde o agua para las reacciones de control sin molde (NTC) en tres pozos replicados de dos placas individuales. Las reacciones se sometieron al siguiente protocolo de ciclado: 95 °C por 10 minutos, posteriormente 45 ciclos de 95 °C por 10 segundos y 60 °C por 45 segundos.

10 Tabla 11: Secuencias de los oligonucleótidos usados en el Ejemplo 5

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Cebador sentido universal	CGGCCCATGTCCCAGCGAA	SEQ ID NO. 21
Sonda 1 (FAM)	FAM-C+CATC+A+C+CGTG+CT-IBFQ	SEQ ID NO. 14
Sonda 2 (Yakima Amarillo)	Yak-CAATC+C+C+CGAG+CT-IBFQ	SEQ ID NO. 22
Cebador sentido del alelo 1 de rs4657751	GCCCCATGTCCCAGCGAACCATCACCGTGC TACTTCCCACACCCTCATATCuTGTAA-x	SEQ ID NO. 23
Cebador sentido del alelo 2 de rs4657751	GCCCCATGTCCCAGCGAACAAATCCCCGAGC TCTTACTTCCCACACCCTCATATA <u>u</u> TGTAA- x	SEQ ID NO. 24
Cebador antisentido de rs4657751	GCGCTAAGTAAACATTCTGATTGCA <u>a</u> CTT AT-x	SEQ ID NO. 25

Las secuencias de ácido nucleico se muestran 5'-3'. ADN en mayúsculas, ARN en minúsculas. La ubicación del posible apareamiento erróneo aparece subrayada. Los residuos de LNA se designan con un +. FAM = 6-carboxifluoresceína, Yak = Yakima Amarillo (3-(5,6,4',7'-tetracloro-5'-metil-3',6'-dipivaloilfluorescein-2-il)o), IBFQ = Iowa Negro FQ (apagador de fluorescencia), y x = bloque espaciador de propanodiol C3.

Tabla 12: Moldes sintéticos de gBlock® usados en el Ejemplo 5.

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Molde gBlock del alelo 1 de rs4657751	GATTTTTTTTTTTGGCATTCTTCTTAGAT TTCTATCTCCTAACATAGGATCACTTATT GTGAAATTATTGTATACCTTTTATGGA GTGATGATGTGATAACAAATTCTATCCCTAA GGATATAAGAACATCTTCTTATATTAG GATTTCTGGACCCATGAGITACATGCTT ACTTCCCACACCCTCATATCTTGTAAAT TTGTAGAATTAAATTCTAGGTATTATT CTGAAACTCTTCCCTGTGAGCAATCTA AATAATTATTACAATGCCTTAAGITGCAAT CAGGAATGTTACTTAGCACAGACTTTT CCCCACTACTGCACTCAAAGGATAACAGA TATATGGCAAATCTAACCATATTCTTGTC CTTGTCCATGTTGGAGGGAGCTCATC AGTGGGGCCACGAGCTGAGTGCCTGT CACTCCACTCCATGTCCCTGGGAAGGTC TGAGACTAGGG	SEQ ID NO. 26

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Molde gBlock del alelo 2 de rs4657751	GATTTTTTTTTGGCATTCTTCTTAGAT TTCTATCTCCTAACATAGGATCACTTATT GTGAAATTATTGTATACCTTTATGGA GTGATGATGTGATA <u>CAAATTCTATCCTAA</u> GGATATAAGAACATCTTCTTATATTAG GATTTCTGGACCCATGAGTTACATGCTT ACTTCCCACACCCTCATATA <u>TTGTTAAAT</u> TTGTAGAATTAAATT <u>CATAGGTAATT</u> ATT CTGAAACTTCTCCCTGTGTGAGCAATCTA AATAATTATTACAATGCCTTAAGTTGCAAT CAGGAATGTTACTTAGCACAGACTTTTT CCCCACTACTGCACTCAAAGGATAACAGA TATATGGCAAATCTAACCATATTCTTGTC CTTGTCCATGTTGCGGAGGGAGCTCATC AGTGGGGCCACGAGCTGAGTGCCTGT CACTCCACTCCCAGTGCCTGGAAAGGTC TGAGACTAGGG	SEQ ID NO. 27

Las secuencias de ácido nucleico se muestran 5'-3'. El ADN se escribe con mayúsculas. La ubicación del SNP aparece subrayada.

Una placa de reacción se sometió a ciclos inmediatamente (0 h de mantenimiento en banco) y otra se mantuvo a temperatura ambiente por 2 días (48 h de mantenimiento en banco) para demostrar la estabilidad de la reacción a lo largo del tiempo. El análisis de discriminación alélica se realizó usando el software Bio-Rad CFX Manager 3.1

(Bio-Rad, Hercules, CA). En cada pozo se detectaron fluoróforos FAM y Yakima Amarillo. Para ambos fluoróforos, los ciclos de referencia se fijaron para que comenzaran en el ciclo 10 y terminaran en el ciclo 25. Se usó la señal de fluorescencia (RFU, por sus siglas en inglés) en cada pozo al final de los 45 ciclos para generar una gráfica de discriminación alélica y se determinaron los genotipos con los atributos de llamada automática del software de análisis. Se obtuvo un rendimiento idéntico con la ejecución inmediata (Figura 3A) y con la placa de mantenimiento de 48 horas (Figura 3B), lo que demuestra la sólida estabilidad de los componentes de la reacción. A cada muestra se le asigna la llamada de genotipado correcta y las muestras del mismo genotipo se agrupan estrechamente. El clúster heterocigoto está separado de ambos clústeres homocigotos por un ángulo aproximado de 45 grados, lo que indica una excelente especificidad alélica de los ensayos universales de genotipado rhPCR y de la mezcla maestra.

#### 15 EJEMPLO 6 - como referencia

El siguiente ejemplo compara el rendimiento de los métodos de genotipado de la presente invención frente a los métodos tradicionales de ensayo de genotipado con nucleasas 5' (Taqman™).

20 Se seleccionó el SNP de rs1799865 en el gen CCR2, y se diseñaron y obtuvieron cebadores de genotipado rhPCR, así como un ensayo de nucleasa 5' de rs1799865 (Thermo-Fisher, Waltham, MA). Las secuencias para el ensayo SNP genómico de rs1799865 por rhPCR se muestran en la Tabla 14 (SEQ ID NO: 14, 21, 22 y 28-30). Las secuencias del cebador/sonda de nucleasa 5' (Taqman™) de Thermo-Fisher no están publicadas y por lo tanto no se incluyen en este documento.

25 Las reacciones se realizaron en volúmenes de 10 µL, conteniendo 10 ng de ADN genómico Coriell (Camden, NJ), 250 nM de sonda FAM universal (SEQ ID NO: 14), 450 nM de Yakima Amarillo® universal (SEQ ID NO: 22), 1000 nM de cebador sentido universal (SEQ ID NO: 21), 150 nM de los dos cebadores sentido alelo-específicos (SEQ ID NO: 28 y 29), 500 nM del cebador antisentido (SEQ ID NO: 30), y 5 µL de 2x la mezcla de genotipado maestra para rhPCR de Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, que contiene dNTPs, una Taq polimerasa H784Q mutante (ver Behlke, et al. U.S. 2015/0191707), ARNasa H2 de *Pyrococcus abyssi* modificada químicamente (ver Walder et al. UA20130288245A1), estabilizadores y MgCl<sub>2</sub>).

30 35 La PCR se realizó en el instrumento de PCR en tiempo real QuantStudio™ 7 Flex de Life Technologies (Carlsbad,

CA) usando las siguientes condiciones de ciclado: 10 minutos a 95 °C seguidos de 50 ciclos de 95 °C por 10 segundos y 60 °C por 45 segundos. El análisis del punto final de cada una de las placas se realizó después de 45 ciclos con el software QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.3 (Carlsbad, CA).

5 Tabla 14: Secuencias de oligonucleótidos usadas para el ensayo de genotipado de rs1799865 en el Ejemplo 6.

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Cebador sentido universal	CGGCCCATGTCCCAGCGAA	SEQ ID NO. 21
Sonda 1 (FAM)	FAM-C+CATC+A+C+CGTG+CT-IBFQ	SEQ ID NO. 14
Sonda 2 (Yakima Amarillo)	Yak-CAATC+C+C+CGAG+CT-IBFQ	SEQ ID NO. 22
Cebador sentido del alelo 1 de rs1799865	GCCCCATGTCCCAGCGAACCATCACCGTG CTTTCTCTCTGGACTCCCTATAAAT <sub>a</sub> TTGT G-x	SEQ ID NO. 28
Cebador sentido del alelo 2 de rs1799865	GCCCCATGTCCCAGCGAACATCCCCGAG CTTTCTCTCTGGACTCCCTATAAAC <sub>a</sub> TTGT G-x	SEQ ID NO. 29
Cebador antisentido de rs1799865	GCGGATTGATGCAGCAGTGA <sub>g</sub> T <sub>c</sub> CATG-x	SEQ ID NO. 30

Las secuencias de ácido nucleico se muestran 5'-3'. ADN en mayúsculas, ARN en minúsculas. Los residuos de LNA se designan con un +. La ubicación del posible apareamiento erróneo aparece subrayada. FAM = 6-carboxifluoresceína, Yak = Yakima Amarillo (3-(5,6,4',7'-tetracloro-5'-metil-3',6'-dipivaloilfluorescen-2-ilo)), IBFQ = Iowa Negro FQ (apagador de fluorescencia), y x = bloque espaciador de propanodiol C3.

10 Las Figuras 4A y 4B muestran una comparación en paralelo de las gráficas de discriminación alélica resultantes. El ensayo de genotipado por rhPCR (Figura 4B) logró una señal de fluorescencia más alta en comparación con un ensayo tradicional de genotipado por 5'-nucleasas (Figura 4A), mostrando al mismo tiempo resultados concordantes. La señal más alta y la amplificación no específica mínima del NTC en el ensayo de rhPCR permiten una mejor separación de los grupos y llamadas de genotipo exactas.

#### EJEMPLO 7 - como referencia

- 15 El siguiente ejemplo ilustra los presentes métodos que permiten la detección y el análisis de SNP tri-alélicos. El SNP de rs72558195 está presente en el gen CYP2C8, y tiene tres genotipos potenciales. Este SNP fue seleccionado para su análisis con el sistema de genotipado por rhPCR.
- 20 El flujo de trabajo convencional para interrogar SNP tri-alélicos, como se ilustra en las Figuras 5A y 5B, involucra la ejecución de un par de ensayos usando las mismas muestras, la llamada manual y la comparación del resultado del ensayo emparejado para obtener el verdadero genotipo de las muestras.

25 Para demostrar que tal sistema puede funcionar con el sistema universal de genotipado por rhPCR, se prepararon reacciones en placas PCR blancas Hard-Shell® de 384 pozos con faldón (Bio-Rad, Hercules, CA) en el QuantStudio™ 7 Flex de PCR en tiempo real de Life Technologies (Carlsbad, CA) con un volumen final de 10 µL. Cada pozo contenía los cebadores del ensayo de rhPCR (ver la Tabla 16, SEQ ID NO: 14, 21, 22, 31-33). Específicamente, 150 nM del cebador de alelo específico 1 de rs72558195 G:A (SEQ ID NO: 31) y 150 nM del cebador de alelo específico 2 de rs72558195 G:A (SEQ ID NO: 32), o 150 nM del cebador de alelo específico 1 de rs72558195 G:A (SEQ ID NO: 31) y 150 nM del cebador de alelo específico 3 de rs72558195 G:C (SEQ ID NO: 33), así como 500 nM de cebador específico del locus de rs72558195 (SEQ ID NO: 34) se incluyeron en las reacciones.

30 Las reacciones contenían oligos reporteros universales en las siguientes concentraciones: 250 nM de sonda FAM universal (SEQ ID NO: 14), 450 nM de Yakima Amarillo® universal (SEQ ID NO: 22) y 1000 nM de cebador sentido universal (SEQ ID NO: 21), 50 nM de patrón interno ROX (por sus siglas en inglés), y 5 µL de 2x la mezcla de genotipado maestra para rhPCR de Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, que contiene dNTPs, una Taq polimerasa H784Q mutante (ver Behlke, *et al.* U.S. 2015/0191707), ARNasa H2 de *Pyrococcus abyssi* modificada químicamente (ver Walder *et al.* UA20130288245A1), estabilizadores y MgCl<sub>2</sub>).

40 Tabla 16: Secuencias de oligonucleótidos usadas para el ensayo de genotipado de rs72558195 en el Ejemplo 7.

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Cebador sentido universal	CGGCCCATGTCCCAGCGAA	SEQ ID NO. 21

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Sonda 1 (FAM)	FAM-C+CATC+A+C+CGTG+CT-IBFQ	SEQ ID NO. 14
Sonda 2 (Yakima Amarillo)	Yak-CAATC+C+C+CGAG+CT-IBFQ	SEQ ID NO. 22
Cebador sentido del alelo 1 de rs72558195:G:A	GCCCCATGTCCCAGCGAACCATCACCGTGCTC TCCGGTTGTTTCCAGAAAC <u>g</u> ATTTC-x	SEQ ID NO. 31
Cebador sentido del alelo 2 de rs72558195:G:A	GCCCCATGTCCCAGCGAACATCCCCGAGCTC TCCGGTTGTTTCCAGAAAT <u>g</u> ATTTC-x	SEQ ID NO. 32
Cebador sentido del alelo 3 de rs72558195:G:C	GCCCCATGTCCCAGCGAACATCCCCGAGCTC TCCGGTTGTTTCCAGAAAG <u>g</u> ATTTC-x	SEQ ID NO. 33
Cebador antisentido de rs1135840	GCAACCCAAGTCTTCCCTACAAACcTTGAT-x	SEQ ID NO. 34

Las secuencias de ácido nucleico se muestran 5'-3'. ADN en mayúsculas, ARN en minúsculas. Los residuos de LNA se designan con un +. La ubicación del posible apareamiento erróneo aparece subrayada. FAM = 6-carboxifluoresceína, Yak = Yakima Amarillo (3-(5,6,4',7-tetracloro-5'-metil-3',6'-dipivaloilfluorescen-2-ilo)), IBFQ = Iowa Negro FQ (apagador de fluorescencia), y x = bloque espaciador de propanodiol C3.

Se usaron fragmentos génicos de gBlocks® (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA) que contenían alelos del SNP de rs72558195 como fuente de ADN molde (ver la Tabla 17, SEQ ID NO: 35, 36 y 37). Cada pozo contenía un molde que representaba uno de los seis genotipos posibles: alelo 1 homocigoto (1000 copias del molde gBlock® del alelo 1 de rs72558195 (SEQ ID NO: 35)), alelo 2 homocigoto (1000 copias del molde gBlock® del alelo 2 de rs72558195 (SEQ ID NO: 36)), alelo 3 homocigoto (1000 copias del molde gBlock® del alelo 2 de rs72558195 (SEQ ID NO: 37)), heterocigoto (mezcla de 500 copias del molde gBlock® del alelo 1 de rs72558195 (SEQ ID NO: 35) y 500 copias del molde gBlock® del alelo 2 de rs72558195 (SEQ ID NO: 36)), heterocigoto (mezcla de 500 copias del molde gBlock® del alelo 1 de rs72558195 (SEQ ID NO: 35) y 500 copias del molde gBlock® del alelo 3 de rs72558195 (SEQ ID NO: 37)). Se añadió molde o agua para las reacciones de control sin molde (NTC) en tres pozos replicados de dos placas individuales. Las reacciones se sometieron al siguiente protocolo de ciclado: 95 °C por 10 minutos, posteriormente 45 ciclos de 95 °C por 10 segundos y 60 °C por 45 segundos.

Tabla 17: Secuencias gBlock® usadas en el Ejemplo 7

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Molde gBlock del alelo 1 de rs72558195	ACATCATTTTATTGTATAAAAGCATTAA GTATCAATTTCCTCATTTTAACCAAGTC TICCTACACCTTGAATAATGGTTCCA AGGAAAATAAAATCTTGGCCTTACCTGGA TCCATGGGGAGTTAGAATCCTGAAGTT TCATTGAATCTTTCATCAGGGTGAGAAA ATTCTGATCTTATAATCAAATCGTTCTG GAAAACAACGGAGCAGATCACATTGCAG GGAGCACAGCCCAGGATGAAAGTGGGAT CACAGGGTGAAGCTAAAGATTAAAAATT TTTAAAAAAATTATTAAAAATAAATT TAAAAGATTGCATTGTAAAGACATAAA GGAAATTAGAAATTAAACAATATCTT ACAAATTCCTCATGIGTCCAAA	SEQ ID NO. 35
Molde gBlock del alelo 2 de rs72558195	ACATCATTTTATTGTATAAAAGCATTAA GTATCAATTTCCTCATTTTAACCAAGTC TICCTACACCTTGAATAATGGTTCCA AGGAAAATAAAATCTTGGCCTTACCTGGA TCCATGGGGAGTTAGAATCCTGAAGTT	SEQ ID NO. 36

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
	TCATTGAATCTTTCATCAGGGTGAGAAA ATTCTGATCTTATAATCAAATC <u>A</u> TTCTG GAAAACAACGGAGCAGATCACATTGCAG GGAGCACAGCCCAGGATGAAAGTGGGAT CACAGGGTGAAGCTAAAGATTAAAAATT TTTAAAAAAATTATTAAAAAATAAATATT TAAAAGATTGCATTGTAAAGACATAAA GGAAATTAGAAATTAAACAATATCTT ACAAATTCCCCATGTGTCCAAA	
Molde gBlock del alelo 3 de rs72558195	ACATCATTTTATTGTATAAAAGCATTAA GTATCAATTTCCTCATTTTAAACCAAGTC TICCTACAACCTTGAATAATGGTTCCA AGGAAAATAAAATCTTGGCCTTACCTGGA TCCATGGGGAGTTCAAGATCCTGAAGTTT TCATTGAATCTTTCATCAGGGTGAGAAA ATTCTGATCTTATAATCAAATC <u>C</u> TTCTG GAAAACAACGGAGCAGATCACATTGCAG GGAGCACAGCCCAGGATGAAAGTGGGAT CACAGGGTGAAGCTAAAGATTAAAAATT TTTAAAAAAATTATTAAAAAATAAATATT TAAAAGATTGCATTGTAAAGACATAAA GGAAATTAGAAATTAAACAATATCTT ACAAATTCCCCATGTGTCCAAA	SEQ ID NO. 37

Las secuencias de ácido nucleico se muestran 5'-3'. El ADN se escribe con mayúsculas. La ubicación del SNP aparece subrayada.

Los resultados se muestran en las Figuras 5A y 5B. De ello se desprende que el sistema universal de genotipado por rhPCR se puede usar para caracterizar genotipos multi-alélicos.

- 5 Se diseñó una gráfica AD 360 tri-alélica para ilustrar la discriminación alélica. La señal de fluorescencia ( $\Delta Rn$ , por sus siglas en inglés) del último ciclo de PCR de cada tinte se normalizó entre los tres tintes del mismo pozo. El ángulo y la distancia del punto de datos al origen se calculan al usar la fórmula siguiente:

$$\text{Distancia desde el origen} = \sqrt{(\Delta Rn_{Tinte1})^2 + (\Delta Rn_{Tinte2})^2}$$

10

$$\text{Ángulo} = \tan^{-1}(\Delta Rn_{Tinte1} \div \Delta Rn_{Tinte2}) \times \frac{120}{90}$$

- 15 La Figura 5B muestra la gráfica 360 de discriminación alélica tri-alélica de rs72558195, usando el ensayo de genotipado por rhPCR con 3 cebadores específicos de alelo multiplexados en una única reacción. Al recolectar la señal de fluorescencia de todos los ensayos, se pudieron detectar seis genotipos en una única reacción. La distancia de los puntos de datos desde el origen indicaba la intensidad de la señal de los tintes y la separación de ángulos amplios entre los grupos de datos indicaba la especificidad del ensayo multiplexado. Un NTC en el centro de la gráfica indica que no hay dímeros de cebador ni amplificación inespecífica. La especificidad del ensayo multiplexado se consigue por la selectividad de la ARNasa H2 y la ADN polimerasa Taq mutante, como se usó en los ejemplos anteriores. Esta gráfica AD 360 también permitirá la capacidad de autocalificación por parte del software de genotipado.

20 Se podría implementar una gráfica 360 para la visualización tetra-alélica, penta-alélica o hexa-alélica. Por lo tanto,

la visualización es posible para posiciones que podrían tener múltiples bases, así como posibles delecciones. La distancia desde el origen permanece invariable para cada cálculo, y las fórmulas de los ángulos serían:

$$\text{tetra-alélico (4 alelos): Ángulo} = \tan^{-1}(\Delta Rn_{Tintel} - \Delta Rn_{Tinte2})$$

5

$$\text{penta-alélico (5 alelos): Ángulo} = \tan^{-1}(\Delta Rn_{Tintel} + \Delta Rn_{Tinte2}) \times \frac{72}{90}$$

$$\text{hexa-alélico (6 alelos): Ángulo} = \tan^{-1}(\Delta Rn_{Tintel} + \Delta Rn_{Tinte2}) \times \frac{60}{90}$$

#### 10 EJEMPLO 8 - como referencia

El siguiente ejemplo ilustra la capacidad de los métodos de la presente invención para proporcionar genotipado SNP cuantitativo, permitiendo la determinación del número de copias de diferentes alelos. Para demostrarlo, se diseñó un ensayo frente al rs1135840, un SNP del gen CYP2D6 humano. Este gen puede estar presente en múltiples copias, y el número de copias con el SNP de rs1135840 parece afectar al metabolismo de los fármacos (metabolismo rápido del fármaco debrisoquina).

Para demostrar que el sistema de ensayo puede detectar pequeñas diferencias en las raciones alélicas, se creó una curva estándar para el análisis. Se sintetizaron dos fragmentos génicos gBlock™ (IDT, Coralville, IA, alelo 1 y alelo 2, que representan las dos variantes aléicas (G>C) del SNP de rs1135840) y posteriormente se mezclaron en diferentes relaciones. Las reacciones se realizaron en volúmenes de 10 µL, conteniendo un total de 1500 copias de molde en las relaciones indicadas (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 y 0:10), 250 nM de sonda FAM universal (SEQ ID NO: 14), 450 nM de Yakima Amarillo® universal (SEQ ID NO: 22), 1000 nM de cebador sentido universal (SEQ ID NO: 21), 150 nM de los dos cebadores sentido alelo-específicos, 500 nM del cebador antisentido, y 5 µL de 2x la mezcla de genotipado maestra para rhPCR de Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, que contiene dNTPs, una Taq polimerasa H784Q mutante (ver Behlke, et al. U.S. 2015/0191707), ARNasa H2 de *Pyrococcus abyssi* modificada químicamente (ver Walder et al. UA20130288245A1), estabilizadores y MgCl<sub>2</sub>).

La PCR se realizó en el instrumento de PCR en tiempo real QuantStudio™ 7 Flex de Life Technologies (Carlsbad, CA) usando las siguientes condiciones de ciclado: 10 minutos a 95 °C seguidos de 45 ciclos de 95 °C por 10 segundos y 60 °C por 45 segundos. El análisis del punto final de cada una de las placas se realizó después de 45 ciclos con el software proporcionado por las respectivas empresas (software Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, Hercules, CA) y QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.3 (Carlsbad, CA)).

35 Tabla 16: Secuencias de oligonucleótidos usadas en el Ejemplo 8.

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Cebador sentido universal	CGGCCCATGTCCCAGCGAA	SEQ ID NO. 21
Sonda 1 (FAM)	FAM-C+CATC+A+C+CGTG+CT-IBFQ	SEQ ID NO. 14
Sonda 2 (Yakima Amarillo)	Yak-CAATC+C+C+CGAG+CT-IBFQ	SEQ ID NO. 22
Cebador sentido del alelo 1 de rs1135840	GCCCATGTCCCAGCGAACCATCACCGTGC TGTCTTGCTTCCTGGTGA <del>G</del> CCATG-x	SEQ ID NO. 38
Cebador sentido del alelo 2 de rs1135840	GCCCATGTCCCAGCGAACATCCCCGAGC TGTCTTGCTTCCTGGTGA <del>C</del> CCATG-x	SEQ ID NO. 39
Cebador antisentido de rs1135840	GCGTTGGA <del>A</del> CTACCACATTGCTTAT <del>T</del> uGTA CT-x	SEQ ID NO. 40

Las secuencias de ácido nucleico se muestran 5'-3'. ADN en mayúsculas, ARN en minúsculas. Los residuos de LNA se designan con un +. La ubicación del posible apareamiento erróneo aparece subrayada. FAM = 6-carboxifluoresceína, Yak = Yakima Amarillo (3-(5,6,4',7'-tetracloro-5'-metil-3',6'-dipivaloilfluorescein-2-il)o), IBFQ = Iowa Negro FQ (apagador de fluorescencia), y x = bloque espaciador de propanodiol C3.

Los datos resultantes se ilustran en la Figura 7. La dispersión de cada una de las mezclas de muestras es suficiente para determinar el número de copias de cada molde.

40

Una vez demostrada la separación necesaria de las cantidades alélicas, es posible determinar el número de copias

5 presentes de cada alelo en una muestra experimental. Para probarlo, se usó el ensayo descrito anteriormente, diseñado contra el rs1135840, para analizar trece muestras de ADN genómico de Coriell (Camden, NJ) con distintos números de copias de CYP2D6 y distintos genotipos del rs1135840. Estas muestras tienen números de copias definidos y genotipos rs1135840 conocidos que se pudieron verificar tras la prueba con la mezcla universal de genotipado por rhPCR. A partir de aquí, estas muestras también se pueden clasificar como homocigotas para cualquiera de los alelos, o heterocigotas.

10 Para calcular el número de copias a partir de los datos, se realizaron dos reacciones dúplex para cada muestra. Las reacciones se realizaron en volúmenes de 10 µL, conteniendo 3 ng de uno de los siguientes ADN genómicos: NA17123, NA17131, NA17132, NA17149, NA17104, NA17113, NA17144, NA17213, NA17221, NA17114, NA17235, o NA17241. Cada ensayo individual también contenía 50 nM de oligo normalizador ROX, 250 nM de sonda FAM universal (SEQ ID NO: 14), 450 nM de Yakima Amarillo® universal (SEQ ID NO: 22), 1000 nM de cebador sentido universal (SEQ ID NO: 21), 150 nM de los dos cebadores sentido alelo-específicos (SEQ ID NO: 38 y 39), 500 nM del cebador antisentido (SEQ ID NO: 40), y 5 µL de 2x la mezcla de genotipado maestra para rhPCR de Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, que contiene dNTPs, una Taq polimerasa H784Q mutante (ver Behlke, et al. U.S. 2015/0191707), ARNasa H2 de *Pyrococcus abyssi* modificada químicamente (ver Walder et al. UA20130288245A1), estabilizadores y MgCl<sub>2</sub>). Los ensayos también contenían un ensayo separado de ARNasa P (ver la Tabla 17, SEQ ID NO: 41-43) para la normalización de la concentración de molde.

15

20 Tabla 17: Secuencias del ensayo de ARNasa P usadas en el Ejemplo 8.

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Cebador sentido de ARNasa P	GCGGAGGGAAAGCTCATCAG	SEQ ID NO. 41
Cebador antisentido de ARNasa P	CCCTAGTCTCAGACCTTCCCAA	SEQ ID NO. 42
Sonda 2 (Yakima Amarillo)	Yak-CCACGAGCTGAGTGCCTGTCA- IBFQ	SEQ ID NO. 43

Las secuencias de ácido nucleico se muestran 5'-3'. El ADN se escribe con mayúsculas. FAM = 6-carboxifluoresceína, Yak = Yakima Amarillo (3-(5,6,4',7'-tetracloro-5'-metil-3',6'-dipivaloilfluorescein-2-ilo)), IBFQ = Iowa Negro FQ (amortiguador de fluorescencia).

25 La PCR cuantitativa se realizó en el instrumento de PCR en tiempo real QuantStudio™ 7 Flex de Life Technologies (Carlsbad, CA) usando las siguientes condiciones de ciclado: 10 minutos a 95 °C seguidos de 45 ciclos de 95 °C por 10 segundos y 60 °C por 45 segundos. El análisis del punto final de cada una de las placas se realizó después de 45 ciclos con el software QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.3 (Carlsbad, CA) proporcionado por la empresa.

30 El número de copias se determinó mediante el método siguiente. Para cada muestra que resultó ser un homocigoto, se calculó ΔCq (ARNasa P Cq - rs1135840 ensayo Cq) para cada muestra. Para las muestras que resultaron ser heterocigotas, se calculó ΔCq para ambos alelos (ARNasa P Cq - rs1135840 ensayo 1 Cq y ARNasa P Cq - rs1135840 ensayo 2 Cq). A continuación, se calculó ΔΔCq (ΔCq - ΔCq medio para muestras de ADN de control de 2 copias conocidas) para cada alelo. Esta corrección permitió la normalización frente a las diferencias de amplificación entre el ensayo de SNP y el ensayo de ARNasa P. Por último, se usó la siguiente ecuación para calcular el número de copias de cada alelo:

35

$$\text{Copia de número de alelos} = 2 * (2^{(\Delta\Delta Cq)})$$

40 Los datos de punto final resultantes se muestran en la Figura 8A y los números de copias calculados se muestran en la Figura 8B. Los genotipos determinados en la Figura 8A (alelo 1 homocigoto, alelo 2 homocigoto o heterocigoto) coincidían todos con los genotipos conocidos y permitían calcular correctamente el número de copias. El número de copia de referencia establecido de las muestras individuales se muestra debajo de cada resultado. En cada caso, el número de copias determinado por el ensayo determinó correctamente el genotipo y el número de copias del ADN de entrada.

45

#### EJEMPLO 9 - como referencia

50 El siguiente ejemplo demuestra que se puede usar una variación de una sonda de rhPCR para la rhPCR multiplexada.

55 El esquema del ensayo se muestra en la Figura 9. En la primera ronda de PCR, se usan rhCebadores específicos de objetivo de cola 5'. Las colas 5', una vez incorporadas al amplicón, contienen sitios de unión para una segunda ronda de PCR con cebadores diferentes (bloqueados o desbloqueados) para añadir secuencias específicas de la aplicación. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 9, este sistema se puede usar para el enriquecimiento por amplificación para la secuenciación de próxima generación. En este caso, los cebadores rhPCR de cola 5'

contienen secuencias de cebador de lectura 1/lectura 2. La segunda ronda de PCR añade secuencias adaptadoras tales como las series P5/P7 para plataformas de secuenciación basadas en Illumina® u otros adaptadores, incluidos los que contienen códigos de barras/identificadores moleculares únicos. Este enfoque permite añadir al amplicón cualquier secuencia adicional necesaria para su introducción en cualquier tipo de plataforma NGS.

Como se ilustra en la Figura 10, se diseñaron dos conjuntos de cebadores, uno que contenía un conjunto de 96 rhCebadores de cola 5', y otro que contenía 96 cebadores PCR "estándar" de ADN de cola 5', usando un algoritmo IDT (por sus siglas en inglés). Los dos conjuntos de cebadores se diferenciaban únicamente en que los rhCebadores contenían una base interna de ARN escindible y un grupo de bloqueo en el extremo 3'. Una vez eliminado el grupo de bloqueo por la escisión de la ARNasa H2, las secuencias de los cebadores se vuelven idénticas.

La primera ronda de reacciones PCR contenía el plexado 96 a 10 nM de cada cebador específico de objetivo bloqueado, 10 ng de ADN genómico humano NA12878 (Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ), 200 mU de ARNasa H2 de *Pyrococcus abyssi* químicamente modificada (ver Walder *et al.* UA20130288245A1, IDT, Coralville, IA) y 1X KAPA 2G HotStart Fast Ready Mix™ (Kapa Biosystems, Wilmington, MA). El perfil del ciclo térmico fue de 10 minutos a 95 °C, seguido de 8 ciclos de 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 4 minutos, y un paso final a 99 °C por 15 minutos. Las reacciones se limpian con un 2X AMPure™ XP beads (Beckman Coulter, Brea, CA). Brevemente, se añadieron 100 µL de perlas AMPure™ SPRI a cada pozo de PCR, se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente y se recolectaron por 5 minutos a temperatura ambiente en un imán de placa (DynaMag™ (Thermo-Fisher, Watherham, MA) imán lateral de placa de 96 pozos). Las perlas se lavaron dos veces con etanol al 80 % y se dejaron secar por 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se eluyeron en 22 µL de TE a pH 8,0.

La segunda ronda de PCR se preparó usando 20 µL de los productos de PCR limpiados de la primera ronda, cebadores universales PCR-50F y PCR-47R (ver la Tabla 18, SEQ ID NO: 44 y 45) a 2 µM y 1X KAPA 2G HotStart Fast Ready Mix™ (KAPA Biosystems, Wilmington, MA). Las reacciones se ciclaron por 45 segundos a 98 °C, seguidos de 20 ciclos de 98 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos. Un último paso de pulido a 72 °C de 1 minuto finalizó la reacción. Las muestras se limpian de nuevo con microesferas AMPure™ 0,8X. Brevemente, se añadieron 40 µL de microesferas AMPure™ SPRI los segundos pozos de PCR, se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente y se recolectaron por 5 minutos a temperatura ambiente en imán de placa (DynaMag™ (Thermo-Fisher, Watherham, MA) imán lateral de placa de 96 pozos). Las perlas se lavaron dos veces con etanol al 80 % y se dejaron secar por 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se eluyeron en 22 µL de TE a pH 8,0, y 20 µL se transfirieron a un tubo nuevo.

Se analizaron 2 µL de las muestras usando Agilent® High Sensitivity D1000™ Screen Tape™ en Agilent® 2200 Tape Station™ (Agilent Technologies®, Santa Clara, CA). La cuantificación se realizó usando el kit de cuantificación de bibliotecas KAPA (KAPA Biosystems, Wilmington, MA) para plataformas Illumina®, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las muestras replicadas se mezclaron hasta alcanzar una concentración final de 10 pM y se añadió un control de secuenciación de bacteriófagos PhiX al 1 %. Las muestras se analizaron con un kit MiSeq™ V2 de 300 ciclos en una plataforma MiSeq™ de Illumina® (San Diego, CA), usando protocolos estándar del fabricante.

Tabla 18: Secuencias universales de ensayo usadas en el Ejemplo 9.

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Universal PCR-50F	AATGATAACGGCGACCACCGAGATCTACAC TCTTTCCTACACGACGCTCT	SEQ ID NO. 44
Universal PCR-47R	CAAGCAGAAGACGGCATACGGAGATGGACC TATGTGACTGGAGITCAGACGTGTGC	SEQ ID NO. 45

Las secuencias de ácido nucleico se muestran 5'-3'. El ADN se escribe con mayúsculas.

La Figura 10 muestra los resultados de la estación de cinta Agilent®. El producto de dímero del cebador fue el producto más significativo producido usando cebadores de ADN estándar en presencia de molde de ADN, con solamente una pequeña cantidad del producto esperado de longitud completa. En ausencia de molde, el producto dímero del cebador era el principal componente de la reacción. En el caso de los cebadores rhPCR bloqueados, la gran mayoría del material eran los productos PCR deseados, observándose pocos dímeros de cebador. En ausencia de molde, no hay dímero de cebador presente, lo que contrasta con la abrumadora abundancia de dímero de cebador observada en el carril sin molde de los cebadores de ADN no bloqueados. La cuantificación de las bandas de producto frente a las de dímero de cebador muestra que la relación de masa entre el producto y el dímero de cebador para los cebadores de ADN no bloqueados era de 0,6. La relación de masas para los cebadores de la rhPCR fue de 6,3.

La Figura 11 resume dos métricas clave de secuenciación. La primera es el porcentaje de lecturas mapeadas a partir de los datos de secuenciación. Las reacciones rhPCR dieron un porcentaje de lecturas mapeadas con el genoma humano de 85 %, mientras que los cebadores de ADN no bloqueados dan un porcentaje de lecturas

mapeadas de menos de 20. Una segunda métrica, el porcentaje de lecturas específicas, es de casi 95 % cuando se usan cebadores rhPCR, pero de menos de 85 % cuando se usan cebadores no bloqueados en el multiplexado. Estos resultados demuestran claramente la utilidad de usar la rhPCR en multiplexado, donde se observa un gran aumento del material deseado y una gran reducción de los productos secundarios no deseados. Las diferencias 5 significan menos lecturas de secuenciación no deseadas, y la profundidad de cobertura de las secuencias deseadas es mayor.

#### EJEMPLO 10

10 Este ejemplo demuestra que los sistemas de ensayo de la divulgación potencian su sensibilidad y precisión en comparación con los ensayos estándar de escindir endonucleasas T7.

15 Se eligieron un total de 36 sitios modificados con el sistema de proteína CRISPR/Cas9 para ser analizados comparativamente por endonucleasa T7, secuenciación de próxima generación (NGS) o un sistema de ensayo qPCR "Genie" de la divulgación.

20 Para mutar los sitios genómicos elegidos, se generó una línea celular HEK293 con expresión estable de *S. pyogenes* Cas9. Los ARN guía AltR™ se transfecaron inversamente en las células en placas de 96 pozos (40.000 células/pozo) usando 0,75 µL de RNAiMAX (Thermo) por pozo. Brevemente, los ARNcr AltR™ se diseñaron a partir del motor de diseño CRISPR2.0 de IDT para dirigirse al exón 1 o 2 de genes humanos seleccionados. Antes de la transfección, los ARN guía (ARNcr/ARNtracr con química AltR™) se duplexaron en una relación equimolar a 3 µM de concentración final del complejo en amortiguador dúplex IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). Los complejos se calentaron a 95 °C por 5 min y se enfriaron a temperatura ambiente. El ADN genómico se aisló después de 48 h con 50 µL de amortiguador Quick Extract (Epicentre), usando las técnicas estándar descritas por el fabricante. Las soluciones de ADN se diluyeron de nuevo con 100 µL de agua antes de proceder al análisis.

25 El análisis por digestión con endonucleasas T7 se realizó del siguiente modo. Las células tratadas con CRISPR-Cas9 se lavaron con 100 µL de PBS (por sus siglas en inglés). Las células se lisaron añadiendo 50 µL de QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Integrated DNA Technologies). Posteriormente, los lisados celulares se 30 transfirieron a tubos o placas de PCR adecuados, se agitaron en vórtex y se calentaron en un termociclador a 65 °C por 10 min, seguidos de 98 °C por 5 min, tras lo cual se añadieron 100 µL de agua libre de nucleasas para diluir el ADN genómico. Posteriormente, las muestras se agitaron en un vórtex y se centrifugaron. La PCR se configuró usando el molde, cebadores y componentes del Kit de Detección de Edición del Genoma Alt-R y el Kit de PCR KAPA HiFi HotStart de la siguiente manera. Muestra: 4 µL (~ 40 ng) de ADN genómico, 300 nM de cebador sentido, 35 300 nM de cebador antisentido, 5 µL (1X) de amortiguador de KAPA HiFi Fidelity (5X), 1,2 mM (0,3 mM cada uno) de dNTPs, 0,5 U de ADN polimerasa de arranque en caliente de KAPA HiFi (1 U/µL), para un volumen total de 25 µL. Control A Alt-R™: 1 µL de mezcla de cebador/molde Alt-RTM Control A, 5 µL (1X) de amortiguador de KAPA HiFi Fidelity (5X), 1,2 mM (0,3 mM cada uno) de dNTPs, 0,5 U de ADN polimerasa de arranque en caliente de KAPA HiFi (1 U/µL), para un volumen total de 25 µL. Control B Alt-R™: 1 µL de mezcla de cebador/molde Alt-RTM 40 Control B, 5 µL (1X) de amortiguador de KAPA HiFi Fidelity (5X), 1,2 mM (0,3 mM cada uno) de dNTPs, 0,5 U de ADN polimerasa de arranque en caliente de KAPA HiFi (1 U/µL), para un volumen total de 25 µL. La PCR se ejecutó usando las siguientes condiciones: desnaturización a 95 °C por 5 min; 30 ciclos de: desnaturización a 98 °C por 20 s, recocido entre 64-67 °C (dependiendo de la polimerasa) por 15 s, extensión a 72 °C por 30 s; posteriormente extensión a 72 °C por 2 minutos. Los heterodúplex para la digestión T7EI se formaron de la 45 siguiente manera. Se combinaron 2 µL de amortiguador de reacción T7EIR (10X) y 6 µL de agua libre de nucleasas con 10 µL de objetivo experimental o control Alt-RTM HPRT de la PCR, 10 µL de componente de PCR de control A (control homodúplex), o 5 µL de control A y 5 µL de control B (control heterodúplex). Los productos de la PCR se colocaron posteriormente en un termociclador con desnaturización a 95 °C por 10 min, rampa de 95-85 °C a una velocidad de rampa de -2 °C/s, y posteriormente rampa de 85-25 °C a una velocidad de rampa de -0,3 °C/s. 18 µL de heterodúplex de PCR del paso anterior se combinaron con 2 µL de endonucleasa I T7 (1 U/µL), posteriormente la reacción T7EI se incubó a 37 °C por 60 min. El resultado de la detección de apareamientos erróneos T7EI se visualizó en un sistema Fragment Analyzer™ con Mutation Discovery Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Integrated DNA Technologies). Despues de la amplificación y el escindido, los amplicones se clasificaron por tamaño en el sistema de electroforesis capilar Fragment Analyzer™(Advanced Analytical, Inc, Ames, IA).

50 El análisis de secuenciación NGS de las muestras mutadas empleó cebadores específicos de *locus* colocados aproximadamente a 75 pb flanqueando el sitio de escisión de Cas9. Los cebadores contenían colas universales de 5' que permitían una amplificación secundaria que añadía adaptadores Illumina™ TruSeq™ i5 e i7 con códigos de barras específicos de la muestra a los amplicones. Los cebadores específicos de *locus* se diseñaron como cebadores eliminables por ARNasa H2 con la modificación de bloqueo 4DMX en el extremo 3' (donde la nomenclatura 4DMX indica 4 bases de ADN, una base de ADN apareamiento erróneo y un espaciador de propanodiol C3 en el 3' de la base de ARN). Usando una mezcla maestra que contenía una polimerasa Taq de arranque en caliente y una ARNasaH2 de arranque en caliente, se amplificaron los ADN genómicos usando las 55 siguientes condiciones de ciclado: 95 °C<sup>5:00</sup> + (95 °C<sup>0:15</sup> + 60 °C<sup>1:00</sup>) x 8 ciclos + 99 °C<sup>15:00</sup>. Las muestras se purificaron usando perlas SPRI (perlas 1,5x Agencourt™ Ampure® XP, Beckman Coulter) de acuerdo con el

protocolo del fabricante. La segunda PCR incorporó los adaptadores Illumina y se ejecutó en las siguientes condiciones: 95 °C<sup>5:00</sup> + (95 °C<sup>0:15</sup> + 60 °C<sup>0:30</sup> + 72 °C<sup>0:30</sup>) x 18 ciclos + 99 °C<sup>15:00</sup>.

Los amplicones resultantes se sometieron a limpieza 1x SPRI™ y se cuantificaron mediante el kit de cuantificación qPCR de bibliotecas KAPA™ (KAPA Biosystems, Wilmington, MA) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Además, los amplicones se clasificaron por tamaño en el sistema de electroforesis capilar Fragment Analyzer™(Advanced Analytical, Inc., Ames, IA).

La secuenciación del ADN se llevó a cabo en un Illumina™ MiSeq® usando un cartucho MiSeq® Nano (v2, 300 ciclos). Los datos se desmultiplexaron mediante un proceso bioinformático interno. El análisis de eventos de edición específicos en relación con un amplicón de referencia se realizó con CRISPResso™ usando los métodos descritos.

Los cebadores del ensayo de PCR cuantitativa para el análisis de acuerdo con los métodos de la divulgación se diseñaron de modo que el nucleótido de ARN estuviera situado dos bases después del sitio de escindir primario de Cas9, lo que permitía una discriminación máxima tanto de la enzima ARNasa H2 como de la ADN polimerasa (Figura 12). Los cebadores se diseñaron para incluir un dominio 5' universal patentado (UniFor-UniPro-), que tiene identidad de secuencia tanto con un cebador sentido universal, como con una sonda 5' universal degradable por nucleasas (Tabla 19, SEQ ID NO. 1-72 y Tabla 20, SEQ ID NO. 76-147). Se usó un ensayo de ARNasa P basado en Taqman (SEQ ID NO. 73-75) como control universal para la normalización de la concentración de molde en todos los casos. Todos los cebadores se sintetizaron en Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA).

La amplificación se realizó con 2,5 µL del mismo ADN genómico QuickExtract™ usado en los análisis T7 y NGS. También se analizó un control de tipo silvestre (WT) cultivado y extraído por el mismo método con fines de normalización. Los volúmenes de reacción fueron de 10 µL en todos los casos e incluyeron el cebador sentido universal, la sonda universal, el cebador interrogador y el cebador antisentido no interrogador. También se incluyó 1x de una mezcla maestra rhPCR-genotipado, que contenía ARNasa H2 de arranque en caliente, una ADN polimerasa termófila, amortiguador y dNTPs. El cebador sentido universal estaba presente en todas las reacciones a 1000 nM (10 pmol), y la sonda de ensayo universal estaba presente a 300 nM (3 pmol). Los cebadores específicos del ensayo estaban presentes a 200 nM (2 pmol) para el cebador sentido (interrogador de mutaciones), mientras que el cebador antisentido específico del locus no interrogador estaba presente a 500 nM (5 pmol). Las reacciones de control de ARNasa P se realizaron con 500 nM de cebadores de ARNasa P directos e inversos y 250 nM de sonda (Seq ID No. 73-75). Las reacciones se ejecutaron en una máquina CFX384™ Real-Time qPCR (Bio-Rad®, Hercules, CA). Se usaron las siguientes condiciones de ciclado: 95 °C<sup>10:00</sup> + (95 °C<sup>0:15</sup> + 59 °C<sup>0:20</sup> + 72 °C<sup>0:30</sup>) x 55 ciclos.

Tabla 19: Cebadores sentido discriminatorios usados en el Ejemplo 10.

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
GCK-356-1	UniFor-UniPro-CCCTGGTCCCTGGGaGAATC-x	46
GCK-356-2	UniFor-UniPro-CGAGGAGAACACATTCTCCAGGGT-x	47
ERBB3-33-1	UniFor-UniPro-GGGCGGCCGTGACuCACC-x	48
ERBB3-33-2	UniFor-UniPro-GAGGGAAGGGGGTGAGTcACGGCG-x	49
TTR-1257-1	UniFor-UniPro-CCTGGGAGCCATTGCCTCuGGGTT-x	50
TTR-1257-2	UniFor-UniPro-CTTGGCAACTTACCCAGAGGcAAATC-x	51
HAMP-253-1	UniFor-UniPro-GCACTGAGCTCCCAGAuCTGGC-x	52
HAMP-253-2	UniFor-UniPro-GCAAGCGGCCAGATCuGGGAC-x	53
BIRC5-606-1	UniFor-UniPro-GACGACCCCAGTAAGTCTTCuCTGGG-x	54
BIRC5-606-2	UniFor-UniPro-CGAGGCTGCCAGAGAaGACTTT-x	55
SAA 146-1	UniFor-UniPro-CTTCCCCAACAAAGATTATCATTCTAAaAAAAT-x	56
SAA 146-2	UniFor-UniPro-CGCCCCAGGATAACTATTTTTTaAAGGT-x	57
IDO1-97-1	UniFor-UniPro-AGACACTGAGGGGCACCaGAGGT-x	58
IDO1-97-2	UniFor-UniPro-CTTGTAGTCTGCTCTGGuGCCG-x	59
IDO1-176-1	UniFor-UniPro-AGTAAAGAGTACCATATTGATGAAGAAgTGGGA-x	60
IDO1-176-2	UniFor-UniPro-GCAGAGCAAAGCCCACCTTcTTCAA-x	61
CYP27A-31016-1	UniFor-UniPro-CCTTGGTGAGGACTCCAgATGGC-x	62
CYP27A-31016-2	UniFor-UniPro-CCTGGGCCCATCTGgGAGTG-x	63
SAA 226-1	UniFor-UniPro-TCTCCTCTGATCTAGAGAGGTAAAGcAGGG-x	64
SAA 226-2	UniFor-UniPro-ACCAGGCCGACCCGCTuACCTG-x	65
KIF11-369-1	UniFor-UniPro-GAGAAGGGGAAGAACATCCAgGTGGA-x	66
KIF1 1-369-2	UniFor-UniPro-GCATCTCACCAACCTGgATGTA-x	67
C3-1394-1	UniFor-UniPro-CTGGACAGCACTAGTTTTGcTGGGT-x	68
C3-1394-2	UniFor-UniPro-CCACGACTTCCCAGGCaAAAAT-x	69
HOGA-505-1	UniFor-UniPro-CACTGCAGAGGTGGACTaTGGT-x	70
HOGA-505-2	UniFor-UniPro-GATTCTCCTCCAGTTCCATAGuCCACG-x	71

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
EGFR-123344-1	UniFor-UniPro-CCAGAGGATGTTCAATAACTGTGAgGTGGA-x	72
EGFR-123344-2	UniFor-UniPro-CAAATTCCCAAGGACCACCUCACAC-x	73
ALDH2-15144-1	UniFor-UniPro-TGAAGGGACAAGGTGAGAaCTGGA-x	74
ALDH2-15144-2	UniFor-UniPro-CCCAAGGTAAAGTCACCAGTTCuCACCA-x	75
AGXT-140-1	UniFor-UniPro-CCATGGCCTCTCACAAAGCTgCTGGA-x	76
AGXT-140-2	UniFor-UniPro-GGGGGTACCCAGCAGCttGTC-x	77
APOC-2929-1	UniFor-UniPro-CCGTTAAGGACAAGTTCTTGAGTuCTGGC-x	78
APOC-2929-2	UniFor-UniPro-TCAGGGTCAAATCCCAGAACuCAGAC-x	79
Met 27554-1	UniFor-UniPro-AATTTATTTACTTCTTGACGGTCCAAGGgAAACA-x	80
Met 27554-2	UniFor-UniPro-GTCTGAGCATCTAGAGTTTCCCuTTGGT-x	81
SAA 88-1	UniFor-UniPro-AGGTGAGGAGCACCCAAGGAaTGATA-x	82
SAA 88-2	UniFor-UniPro-GAAAACAGAGTAAGTTAAAAACTACTCcTTGGA-x	83
HIF1A-293-1	UniFor-UniPro-TCGCACCCCCCACCTcTGGAG-x	84
HIF1A-293-2	UniFor-UniPro-GAAGGAAAGGCAAGTCCAGAGGgTGGC-x	85
Met 27475-1	UniFor-UniPro-AATTTATTTACTTCTTGACGGTCCAAGGgAAACA-x	86
Met 27475-2	UniFor-UniPro-GTCTGAGCATCTAGAGTTTCCCuTTGGT-x	87
HAMP-295-1	UniFor-UniPro-CTGCCAGCCTGACCaGTGGG-x	88
HAMP-295-2	UniFor-UniPro-GGGAAAACAGAGCCACTGGuCAGGG-x	89
GRHPR-2234-1	UniFor-UniPro-GCCTCCTCTCCGACCACGTGGT-x	90
GRHPR-2234-2	UniFor-UniPro-GGATCCTCTTGTCCACGTGgTCGGAC-x	91
HAMP-88-1	UniFor-UniPro-GGCGCCACCACTTcTTGGT-x	92
HAMP-88-2	UniFor-UniPro-GCTCTGCTCATTTCCAAGGAaGTGGA-x	93
Met 27254-1	UniFor-UniPro-GAGCCAAGTCCTTTCATCTGTaAAGGT-x	94
Met 27254-2	UniFor-UniPro-GAAGTTGATGAACCGGTCTTTACaGATGT-x	95
GRHPR-2264-1	UniFor-UniPro-ACAAGAGGATCCTGGATGCTgCAGGA-x	96
GRHPR-2264-2	UniFor-UniPro-CGCTCTAGCTCCTGGCaGGGAA-x	97
Serpina 279-1	UniFor-UniPro-ACTCAGTCCACAGGTGGGAGGgGAGGC-x	98
Serpina 279-2	UniFor-UniPro-CACTCTAACGCTGTGCTGCCaCCTGA-x	99
Myc 459-1	UniFor-UniPro-CGGGAGGCTATTCTGCCATTuGGGAT-x	100
Myc 459-2	UniFor-UniPro-CGGGAAAGTGTCCCCAAuGGGCT-x	101
Serpina 130-1	UniFor-UniPro-GCTGCTGCTGCCAGGAAuTCCAC-x	102
Serpina 130-2	UniFor-UniPro-CCCCTCCAACCTGGAATTcCTGGG-x	103
Myc 490-1	UniFor-UniPro-CTGCCAGGACCCGCTTCuCTGAT-x	104
Myc 490-2	UniFor-UniPro-CAAGGAGAGCCTTCAGAGAaGCGGC-x	105
GRHPR-2179-1	UniFor-UniPro-GATGAGCCCATTCCCTGCcAAGGT-x	106
GRHPR-2179-2	UniFor-UniPro-CGCTCTAGCTCCTGGCaGGGAA-x	107
GYG-2851-1	UniFor-UniPro-TCGCCACCCCTCAGGuCTCAC-x	108
GYG-2851-2	UniFor-UniPro-ACCTCATGGAGTCTGAGACCuGAGGC-x	109
GYG-2793-1	UniFor-UniPro-GCCCTGGCCTGGGAAuCATCA-x	110
GYG-2793-2	UniFor-UniPro-CTGTGCTGTTTCAAGAGATGATCcCAGGT-x	111
Serpina 79-1	UniFor-UniPro-CAAGAGTCTGAGCTGAACCAAgAAGGT-x	112
Serpina 79-2	UniFor-UniPro-CGACCCCTCCCTCCTTCTTgGTTCT-x	113
Myc 538-1	UniFor-UniPro-CTGCTTAGACGCTGGATTTTuCGGGA-x	114
Myc 538-2	UniFor-UniPro-CTGGTTTCCACTACCCGAArAAAAA-x	115
GYG-2744-1	UniFor-UniPro-CTTTGTATTAAAGATCAGGCCTTGtACACA-x	116
GYG-2744-2	UniFor-UniPro-CATCGTTGTGGTTAGTGTCAcAAGGG-x	117
ARNasa P sentido	GCGGAGGGAAGCTCATCAG	118
ARNasa antisentido P	CCCTAGTCTCAGACCTCCCAA	119
Sonda ARNasa P	FAM-CCACGAGCTGAGTGCCTGTCA-IBFQ	120

ADN en mayúsculas, ARN en minúsculas. FAM = tinte fluorescente de 6-fluoresceína (IDT, Coralville, IA). IBFQ = Inhibidor de fluorescencia Iowa Negro™ (IDT, Coralville, IA). UniFor-UniPro = cebador sentido universal y sitio de unión de la sonda universal. X = grupo espaciador bloqueante propanodiol (C3).

Tabla 20: Cebadores antisentido no discriminatorios usados en el Ejemplo 10.

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
GCK-356-1	GAGGAAACTGTGACTGAACCTC	121
GCK-356-2	CCAAGGCTTCTCCGCC	122
ERBB3-33-1	GAGTCCGGGGAGGGATG	123
ERBB3-33-2	CAATCCCTACTCCAGCCTC	124

# ES 2 989 461 T3

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
TTR-1257-1	ATGTGAGCCTCTCTACCAA	125
TTR-1257-2	GTCCTCTGATGGTCAAAGTTCTA	126
HAMP-253-1	CACTGGTCAGGCTGGC	127
HAMP-253-2	CAAGCTCAAGACCCAGCA	128
BIRC5-606-1	CAACTCAAATCTTTGACAACTCAG	129
BIRC5-606-2	GGAGCTGGAAGGCTGG	130
SAA 146-1	TTCAGAACATGGTATGGCTGTATGC	131
SAA 146-2	CACAGATCAGGTGAGGAGCA	132
IDO1-97-1	GTTCATAGCGTGTGCC	133
IDO1-97-2	GTGGTCACTGGCTGTGG	134
IDO1-176-1	TTCCCACATTTACTGCCTTCTC	135
IDO1-176-2	CGCTATGGAAAACCTCCTGGA	136
CYP27A-31016-1	CAGGTCTGTGCATCAGCG	137
CYP27A-31016-2	CTTTCTGGAAGCGATACTG	138
SAA 226-1	CGCACAGAACTCAACATGGG	139
SAA 226-2	AATAGTTATCCTGGGGCATACAGC	140
KIF11-369-1	GCTCGGAATCCTGTCAAGC	141
KIF11-369-2	CAGCCAAATTCTGCTGCG	142
C3-1394-1	GGGATGTTCCAGTCACTGTTAC	143
C3-1394-2	GGTTGGTGGCAGGGG	144
HOGA-505-1	AGGGGAAGGTGCCAG	145
HOGA-505-2	AAGGTGGACATTGCGGG	146
EGFR-123344-1	TCATAATTCTCTGCACATAGGT	147
EGFR-123344-2	GCCAAGGCACGAGTAACA	148
ALDH2-15144-1	CGTATAAAATAGAACGAAATCCATCCC	149
ALDH2-15144-2	ATGGCACGATGCCGT	150
AGXT-140-1	GGCTTGAGCAGGGCC	151
AGXT-140-2	TGGCCAAGGCCAGTG	152
APOC-2929-1	TCAGGCAGCCACGGC	153
APOC-2929-2	GTGACCGATGGCTTCAGT	154
Met 27554-1	CATACGCAGCCTGAAGTATATTAAACA	155
Met 27554-2	TAGATGCTCAGACTTTACACAAAGA	156
SAA 88-1	TTCAGAACATGGTATGGCTGTATGC	157
SAA 88-2	AGCAGGGAAAGGCTCAGTATAATAG	158
HIF1A-293-1	TAAGCGCTGGCTCCCT	159
HIF1A-293-2	CTCTAGTCTCACGGAGGGTT	160
Met 27475-1	CTCTTTCTGTGAGAACACTCCAG	161
Met 27475-2	TACCCCATTAAAGTATGTCCATGCC	162
HAMP-295-1	TCTCCCATCCCTGCTGC	163
HAMP-295-2	CCGCTTGCCCTGTC	164
GRHPR-2234-1	CACCCAGTGTGACCT	165
GRHPR-2234-2	GCCAAGGAGCTAGAGCGA	166
HAMP-88-1	GAGGCGGTGGCTGAG	167
HAMP-88-2	TGTTCCCTGTCGCTCTG	168
Met 27254-1	CTTAGCCTCTCACTGATATCGAATG	169
Met 27254-2	GCATATTCTCCCCACAGATAGAAGA	170
GRHPR-2264-1	CCTGCCAACCCAGTG	171
GRHPR-2264-2	CTGTGAGGTGGAGCAGTG	172
Serpina 279-1	TAGCTCCTGGGCATTCTTCC	173
Serpina 279-2	AGCTTGAGGAGAGCAGGAAAG	174
Myc 459-1	CCTGGTTTCCACTACCCGA	175
Myc 459-2	CACTGGAACCTACAACACCCG	176
Serpina 130-1	TTCCTGCTCCCTCAAGCTCT	177
Serpina 130-2	GAGCTGAACCAAGAAGGGAGGA	178
Myc 490-1	AGGCATTGACTCATCTCAGC	179
Myc 490-2	TGCACTGGAACCTACAACACC	180
GRHPR-2179-1	TCGGAGAGGGAGGCAGAG	181
GRHPR-2179-2	TTCTCCTGAGGGCTCC	182
GYG-2851-1	ACAGGGAGAAGGATGTCAGAG	183
GYG-2851-2	GTCCTGGGATCATCTGTAAAC	184
GYG-2793-1	ACAGGGAGAAGGATGTCAGAG	185
GYG-2793-2	CACTAACCAACAAACGATGCC	186

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Serpina 79-1	GAATTCTGGCAGCAGCA	187
Serpina 79-2	CTACTGCCTCCACCCGAA	188
Myc 538-1	TAGGCATTCGACTCATCTCAGC	189
Myc 538-2	TGCAGTGGAACTTACAACACC	190
GYG-2744-1	GGACCAGGGCACCTTG	191
GYG-2744-2	GGCTTCTCCAGATAAGATACTG	192

El ADN se escribe con mayúsculas.

Aunque la ARNasa H2 no escindió los cebadores antisentido en estos ensayos, los resultados sugieren que los cebadores antisentido bloqueables también se podrían usar en estos ensayos.

- 5 El análisis de los datos de amplificación se realizó usando un método  $\Delta\Delta Cq$ . Brevemente, se calculó el  $\Delta Cq$  entre cada uno de los  $Cq$  objetivo y el  $Cq$  de referencia correspondiente (ARNasa P). Posteriormente se realizó una conversión con el  $\Delta Cq$  calculado, donde  $\Delta Cq$  experimental se calculó igual a  $2^{-\Delta Cq}$ . Posteriormente, se calculó la  $\Delta\Delta Cq$  normalizándola con respecto a la  $\Delta Cq$  calculada a partir del control WT (no mutado).
- 10 Los resultados experimentales se muestran en las Figuras 13A y 13B. La Figura 13A muestra la clara diferencia entre los datos de NGS y los de escindir la endonucleasa T7. De los 72 ensayos probados, 64 de los resultados de la T7EI fueron >25 % discordantes en su cuantificación de la cantidad de molde mutante presente en comparación con el patrón oro de la NGS. El error en la cuantificación de T7EI es esperado, ya que los ensayos EMCA usualmente subestiman las tasas de edición del genoma, como se discutió anteriormente.
- 15 15 La Figura 13B muestra la comparación entre los datos NGS y el método de la presente invención. En total, se probaron 74 ensayos en el nuevo formato de ensayo. De ellos, 13 fallaron en la amplificación (17 %), de los cuales 10/13 (76 %) de los ensayos fallidos mostraron atributos de secuencia que perjudican la funcionalidad del cebador y que se podrían eliminar fácilmente de futuras pruebas por un algoritmo de diseño (cuadraplexados G, horquillas, etc.). De los 61/74 ensayos que amplificaron, solamente 2/61 (3,3 %) mostraron más de 25 % de divergencia respecto a los resultados obtenidos con el experimento NGS. Estos datos, combinados con los de la Figura 13A, demuestran la utilidad de los ensayos de la divulgación para proporcionar un método rápido y barato basado en PCR para detectar eventos de mutación del genoma CRISPR y cómo la precisión de este método es muy superior a la de los ensayos EMCA.
- 20 25

#### EJEMPLO 11 - como referencia

Este ejemplo demuestra el efecto de ciertas mutaciones sobre la actividad de la Enzima ARNasa H2 de *P.a*. En particular, la mutación G12A tiene un efecto limitante en la discriminación del apareamiento erróneo cuando éste se encuentra frente al ARN, mientras que la mutación P13T no tiene ningún efecto.

Hacia la identificación de enzimas mutantes ARNasa H2 con las propiedades deseadas, una colección de *P.a*. Se desarrollaron mutantes de la ARNasa H2. Entre ellas, se probaron las mutaciones G12A y P13T y se descubrió que conferían una mayor especificidad. Es posible que mutaciones similares en las enzimas ARNasa H2 de otras especies que admiten la rhPCR muestren también propiedades mejoradas similares en relación con sus formas WT.

40 *P.a*. mutante con etiqueta 6x-His y WT. Las proteínas ARNasa H2 se generaron por técnicas estándar de mutagénesis dirigida al sitio (SDM, por sus siglas en inglés, ver, por ejemplo, Weiner M. et al., *Gene*, 151:119-123 (1994)). Los cebadores usados para el SDM de la enzima ARNasa H2 de *P.a*. se muestran en la Tabla 21. Se verificó la secuencia de las proteínas mutagenizadas y se expresaron en *E. coli* usando métodos estándar. La purificación se realizó mediante purificación por afinidad sobre una columna cargada de Ni<sup>2+</sup>, como se describe en Dobosy et al. (2011) y en la patente de EE.UU. No. 8,911,948 B2). Las secuencias finales de aminoácidos de las proteínas mutagenizadas se muestran en la Tabla 22. Después de la expresión y purificación, se determinaron la actividad específica y las definiciones unitarias mediante técnicas descritas previamente (patente US 8,911,948 B2).

45 Tabla 21: Cebadores SDM para la mutagénesis de las enzimas ARNasa H2 usadas en el Ejemplo 11.

Nombre del cebador	SEQ ID NO:	Cambios de AA específicos	Secuencia
Oligo sentido G12A	193	G12A	TGCAGGTGCAGATGAAGCTGGTCGTGCC CAGTTATTGGTCCGCTGGTTATTG
Oligo antisentido G12A	194	G12A	CAATAACCAGCGGACCAATAACTGGGGCA CGACCAGCTICATCTGCACCTGCA
Oligo sentido P13T	195	P13T	AGGTGCAGATGAAGCTGGTCGTGGTACGG TTATTGGTCCGCTGGTTATTGTTG

Nombre del cebador	SEQ ID NO:	Cambios de AA específicos	Secuencia
Oligo antisentido P13T	196	P13T	<b>CAACAATAACCAGCGGACCAATAACCGTA</b> CCACGACCAGCTTCATCTGCACCT

Todas las bases son ADN. Los caracteres mostrados en negrita son los nucleótidos mutagénicos.

Tabla 22: Secuencias de aminoácidos para las proteínas ARNasa H2 del Ejemplo 11.

5

No. Mut	ID SEQ ID NO:	Cambios de AA específicos	Secuencia
N/A	197	ARNasa H2 WT	MKVAGADEAGRGPVIGPLVIVAAVVEEDKIR SLTKLGVKDSKQLTPAQREKLFD <b>EIV</b> KVLDD YSVVIVSPQDIDGRKGSMNELEVENFVKALN SLVKP <b>EVIYIDSADV</b> KAERFAENIRSRLAYE AKVVAEHKADAKYEI <b>VSAASILAKVIRDREIE</b> KLKA <b>EYGDFGSGYPSDPRTKKWLEEWYSKH</b> GNFPIVRRTWDTAKKIEEKFKRAQLTLDNFL KRFRN
1	198	G12A	MKVAGADEAGRPA <b>G</b> IGPLVIVAAVVEEDKIR SLTKLGVKDSKQLTPAQREKLFD <b>EIV</b> KVLDD YSVVIVSPQDIDGRKGSMNELEVENFVKALN SLVKP <b>EVIYIDSADV</b> KAERFAENIRSRLAYE AKVVAEHKADAKYEI <b>VSAASILAKVIRDREIE</b> KLKA <b>EYGDFGSGYPSDPRTKKWLEEWYSKH</b> GNFPIVRRTWDTAKKIEEKFKRAQLTLDNFL KRFRN
2	199	P13T	MKVAGADEAGRGT <b>V</b> IGPLVIVAAVVEEDKIR SLTKLGVKDSKQLTPAQREKLFD <b>EIV</b> KVLDD YSVVIVSPQDIDGRKGSMNELEVENFVKALN SLVKP <b>EVIYIDSADV</b> KAERFAENIRSRLAYE AKVVAEHKADAKYEI <b>VSAASILAKVIRDREIE</b> KLKA <b>EYGDFGSGYPSDPRTKKWLEEWYSKH</b> GNFPIVRRTWDTAKKIEEKFKRAQLTLDNFL KRFRN

La ubicación de las mutaciones se muestra en negrita y subrayada.

Para determinar si estas enzimas mutantes ARNasa H2 aumentan la discriminación de apareamientos erróneos cuando el apareamiento erróneo es opuesto al ARN, se usaron ensayos de rhPCR cuantitativa de primera generación frente al SNP de rs4939827 presente en SMAD7. Este SNP se ha usado en el pasado (Dobosy *et al*, 2011, y patente de EE.UU. 8,911,948 B2) para caracterizar la eficiencia y especificidad de la rhPCR, y se conoce bien su respuesta en diferentes condiciones. Los cebadores usados en estos ensayos se muestran en la Tabla 23, SEQ ID NO: 200-203. Los ensayos se realizaron en volúmenes de reacción de 10  $\mu$ L. El termociclado y la recolección de datos se realizaron con un sistema de tiempo real CFX384® (Bio-Rad®, Hercules, CA). Brevemente, se usó 1x de la iQ™ SYBR® Green Supermix® en combinación con 200 nM (2 pmol) del cebador sentido bloqueado (SEQ ID NO: 202 o 203) y 200 nM (2 pmol) del cebador antisentido desbloqueado (SEQ ID NO: 201), o 200 nM (2 pmol) de cebador sentido de control no bloqueado (SEQ ID NO: 200) y 200 nM (2 pmol) de cebador antisentido no bloqueado (SEQ ID NO: 201). 5 mU de WT (SEQ ID NO: 197) o cada enzima mutante ARNasa H2 (SEQ ID NO: 198 o 199) a cada reacción. En cada reacción se incluyeron 10 ng de ADN genómico de línea celular (líneas celulares NA1852 y NA18537, Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ), que representaban los dos genotipos homocigotos en el SNP de rs4939827. Las reacciones se ciclaron en las siguientes condiciones  $95^{\circ}\text{C}^{3:00} \rightarrow (95^{\circ}\text{C}^{0:10} \rightarrow 60^{\circ}\text{C}^{0:30}) \times 85$ . Los datos de fluorescencia se recolectaron después de cada punto de tiempo de extensión. Una vez finalizada la reacción, se analizaron los datos y se calculó el promedio de los valores de Cq de cada punto. Los resultados se presentan en la Tabla 24.

Tabla 23: Secuencias y SEQ ID de los cebadores usados en el experimento descrito en el Ejemplo 11.

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
200	rs4939827 desbloqueado	CAGCCTCATCCAAAAGAGGAAA
201	rs4939827 antisentido desbloqueado	CTCACTCTAACCCCCAGCATT

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
202	rs4939827 rC 4dmx	CAGCCTCATCCAAAAGAGGAAcAGGA-x
203	rs4939827 rU 4dmx	CAGCCTCATCCAAAAGAGGAAuAGGA-x

ADN en mayúsculas, ARN en minúsculas. x = grupo bloqueador espaciador C3 (propanodiol).

Tabla 24: Cq y  $\Delta$ Cq para el experimento descrito en el Ejemplo 11.

Enzima ARNasa H2	Nombre del cebador	SEQ ID NO del cebador sentido	Molde CC	Molde TT	$\Delta$ Cq
WT	Desbloqueado	200	23.2	23.1	
	rC 4dmx	202	24.6	34.6	10.0
	rU 4dmx	203	36.3	23.5	12.8
P13T (Mut ID 1)	Desbloqueado	200	23.8	23.0	
	rC 4dmx	202	25.2	35.2	10.0
	rU 4dmx	203	39.0	26.0	13.0
G12A (Mut ID 2)	Desbloqueado	200	21.6	21.7	
	rC 4dmx	202	64.8	81.6	16.9
	rU 4dmx	203	54.6	41.5	13.1

Estos datos muestran que estas mutaciones no aumentan significativamente la discriminación de apareamientos erróneos cuando el SNP está situado inmediatamente enfrente del residuo de ARN en el cebador de la rhPCR. Se observa la posible excepción de la mutación G12A, pero en este experimento se usó una cantidad insuficiente de ARNasa H2, lo que resultó en un escindido ineficaz de los cebadores y una amplificación muy retrasada en comparación con el molde coincidente.

## EJEMPLO 12

Este ejemplo demuestra el efecto de ciertas mutaciones sobre la actividad de la Enzima ARNasa H2 de *P.a*. En particular, las mutaciones G12A y P13T aumentan la discriminación del apareamiento erróneo cuando éste se coloca en el 5' del nucleótido de ARN.

Para determinar si la discriminación del apareamiento erróneo puede aumentar con las enzimas mutantes ARNasa H2 G12A y P13T cuando el apareamiento erróneo está situado en el 5' del nucleótido del ARN, se diseñaron ensayos dirigidos al rs113488022, el SNP V600E del gen BRAF humano, con el apareamiento erróneo ubicado en el 5' del ARN. Los cebadores usados en estos ensayos se muestran en la Tabla 25, SEQ ID NO: 204-207. Los ensayos se realizaron en volúmenes de reacción de 10  $\mu$ L. El termociclado y la recolección de datos se llevaron a cabo con un sistema de tiempo real CFX384® (Bio-Rad®, Hercules, CA). Brevemente, se usó 1x de la iQ™ SYBR® Green Supermix® en combinación con 200 nM (2 pmol) del cebador sentido bloqueado (SEQ ID NO: 206 o 207) y 200 nM (2 pmol) del cebador antisentido desbloqueado (SEQ ID NO: 205), o 200 nM (2 pmol) de cebador sentido de control no bloqueado (SEQ ID NO: 204) y 200 nM (2 pmol) de cebador antisentido no bloqueado (SEQ ID NO: 205). 10 mU o 25 mU de WT (SEQ ID NO: 197) o cada enzima mutante ARNasa H2 (SEQ ID NO: 198 o 199) a cada reacción. Las 2.000 copias del molde gBlock® sintético de hebra doble (IDT, Coralville, IA), que representan los dos genotipos homocigotos en el SNP de rs113488022 (SEQ ID NO: 208 o 209), también se añadieron a cada reacción. Las muestras se sometieron a ciclos en las siguientes condiciones  $95^{\circ}\text{C}^{3:00} \rightarrow (95^{\circ}\text{C}^{0:10} \rightarrow 60^{\circ}\text{C}^{0:30}) \times 85$ . Se recolectó la intensidad de fluorescencia después de cada paso de extensión a  $60^{\circ}\text{C}$ . Los valores de Cq se obtuvieron promediando 3 réplicas. Los resultados se muestran en la Tabla 26.

Tabla 25: Secuencias y SEQ ID NO para los cebadores y moldes usados en el experimento descrito en el Ejemplo 12.

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
204	rs113488022 desbloqueado	GTGATTTGGTCTAGCTACAGT
205	rs113488022 antisentido desbloqueado	CCTCAATTCTTACCATCCACAAA
206	rs113488022 TrG 4dmx	GTGATTTGGTCTAGCTACAGTgAAATG-x
207	rs113488022 ArG 4dmx	GTGATTTGGTCTAGCTACAGAgAAATG-x

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
208	molde gBlock® T	TAAGAGGAAAGATGAAGTACTATGTTTAAA GAATATTATATTACAGAATTATAGAAATTAG ATCTCTTACCTAAACTCTTCATAATGCTTGCT CTGATAGGAAAATGAGATCTACTGTTTCCTT TACTTACTACACCTCAGATATATTCTTCATG AAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTGG TCTAGCTACAG <u>I</u> GAATCTCGAIGGAGTGGG TCCCATCAGTTGAACAGTTGTCCTGGATCCAT TTTGTGGATGGTAAGAAATTGAGGCTATTITC CACTGATTAAATTGGCCCTGAGATGCTGC TGACTTACTAGAAAGTCATTGAAGGTCTCAA CTATAGTATTTCATAGTCCCAGTATTACA AAAATCAGTGTCTTATTTTT
209	molde gBlock® A	TAAGAGGAAAGATGAAGTACTATGTTTAAA GAATATTATATTACAGAATTATAGAAATTAG ATCTCTTACCTAAACTCTTCATAATGCTTGCT CTGATAGGAAAATGAGATCTACTGTTTCCTT TACTTACTACACCTCAGATATATTCTTCATG AAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTGG TCTAGCTACAG <u>A</u> GAATCTCGATGGAGTGGG TCCCATCAGTTGAACAGTTGTCCTGGATCCAT TTTGTGGATGGTAAGAAATTGAGGCTATTITC CACTGATTAAATTGGCCCTGAGATGCTGC TGACTTACTAGAAAGTCATTGAAGGTCTCAA CTATAGTATTTCATAGTCCCAGTATTACA AAAATCAGTGTCTTATTTTT

ADN en mayúsculas, ARN en minúsculas. X = grupo bloqueador del espaciador C3 (propanodiol). La ubicación del apareamiento erróneo se muestra en negrita y subrayada en los gBlocks®.

5 Tabla 26: Cq y ΔCq para los experimentos del Ejemplo 12.

ARNasa H2	Cebador sentido	10 mU de ARNasa H2			25 mU de ARNasa H2		
		Molde T	Molde A	Δ Cq	Molde T	Molde A	Δ Cq
WT	Desbloqueado	26.2	25.6		26.0	26.0	
	TrG	26.8	29.1	2.3	26.9	29.0	2.1
	ArG	37.2	26.8	10.4	36.1	26.8	9.3
P13T	Desbloqueado	26.2	25.8		25.8	25.8	
	TrG	27.2	31.4	4.2	26.5	30.0	3.4
	ArG	39.0	27.0	12.0	38.8	26.9	11.9
G12A	Desbloqueado	26.1	26.0		26.0	26.0	
	TrG	28.6	36.5	7.9	27.1	33.2	6.2
	ArG	42.1	30.7	11.4	38.8	27.7	11.1

Estos datos muestran que la mutante ARNasa H2 P13T mejoró la cuantificación ΔCq de la discriminación del apareamiento erróneo con el cebador TrG de 2,3 ciclos con WT a 4,3 ciclos (con 10 mU de ARNasa H2). La ARNasa

10 H2 P13T también mejoró la discriminación del apareamiento erróneo con el cebador ArG, aumentando el ΔCq de 10,4 a 12,0 ciclos. Aunque modestos, estos cambios pueden ser significativos en ensayos sensibles. Los datos

también muestran que la mutante ARNasa H2 G12A mejoró la cuantificación ΔCq de la discriminación del apareamiento erróneo con el cebador TrG de 2,3 ciclos con WT (con 10 mU ARNasa H2) a 6,2 ciclos (con 25 mU ARNasa H2).

15 La ARNasa H2 G12A también mejoró la discriminación del apareamiento erróneo con el cebador ArG, aumentando el ΔCq de 10,4 a 11,4 ciclos. El cambio con el cebador ArG es menos importante aquí, pues ya era efectivo. Ambas mutaciones mejoran por lo tanto la discriminación del apareamiento erróneo cuando éste se ubica en el 5' del nucleótido de ARN.

#### EJEMPLO 13 - como referencia

20 Este ejemplo demuestra el efecto de ciertas mutaciones sobre la actividad de la Enzima ARNasa H2 de *P.a*. En particular, las mutaciones G12A y P13T aumentan la discriminación del apareamiento erróneo cuando éste se coloca en el 3' del ARN.

Para determinar si la discriminación del apareamiento erróneo puede aumentar con las enzimas mutantes ARNasa H2 G12A y P13T cuando el apareamiento erróneo se ubica en el 3' del ARN, se diseñaron ensayos dirigidos al rs113488022, el SNP V600E del gen BRAF humano, con el apareamiento erróneo ubicado en el 3' del ARN. Los cebadores usados en estos ensayos se muestran en la Tabla 27, SEQ ID NO: 204, 205, 210 y 211. Los ensayos se realizaron en volúmenes de reacción de 10 µL. El termociclado y la recolección de datos se realizaron con un sistema de tiempo real CFX384® (Bio-Rad®, Hercules, CA). Brevemente, se usó 1x de la iQ™ SYBR® Green Supermix® en combinación con 200 nM (2 pmol) del cebador sentido bloqueado (SEQ ID NO: 210 o 211) y 200 nM (2 pmol) del cebador antisentido desbloqueado (SEQ ID NO: 205), o 200 nM (2 pmol) de cebador sentido de control no bloqueado (SEQ ID NO: 204) y 200 nM (2 pmol) de cebador antisentido no bloqueado (SEQ ID NO: 205). 5 mU de WT (SEQ ID NO: 197) o cada enzima mutante ARNasa H2 (SEQ ID NO: 198 o 199) a cada reacción. Las 2.000 copias del molde gBlock® sintético de hebra doble (IDT, Coralville, IA), que representan los dos genotipos homocigotos en el SNP de rs113488022 (SEQ ID NO: 208 o 209), también se añadieron a cada reacción. Las reacciones se ciclaron en las siguientes condiciones  $95^{\circ}\text{C}^{3:00} \rightarrow (95^{\circ}\text{C}^{0:10} \rightarrow 60^{\circ}\text{C}^{0:30}) \times 85$ . Se recolectó la intensidad de fluorescencia después de cada paso de extensión. Los valores medios de Cq se obtuvieron a partir de la media de 3 réplicas. Los resultados se muestran en la Tabla 28.

Tabla 27: Secuencias y SEQ ID de los cebadores y moldes usados en el experimento descrito en el Ejemplo 13.

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
204	rs113488022 desbloqueado	GTGATTTGGTCTAGCTACAGT
205	rs113488022 antisentido desbloqueado	CCTCAATTCTTACCATCCACAAA
210	rs113488022 rGT 4dmx	GTGATTTGGTCTAGCTACArGTAAAA-x
211	rs113488022 rGA 4dmx	GTGATTTGGTCTAGCTACArGTAAAA-x

ADN en mayúsculas, ARN en minúsculas. X = grupo bloqueador del espaciador C3 (propanodiol).

Tabla 28: Cq y ΔCq para los experimentos del Ejemplo 13.

ARNasa	Sentido	10 mU de ARNasa H2			25 mU de ARNasa H2		
		Molde T	Molde A	Δ Cq	Molde T	Molde A	Δ Cq
WT	Desbloqueado	26.4	26.0		25.9	26.0	
	rGT 4dmx	26.4	26.5	0.2	25.7	26.3	0.6
	rGA 4dmx	33.3	26.0	7.3	31.3	25.9	5.3
P13T	Desbloqueado	25.8	25.7		25.5	25.8	
	rGT 4dmx	31.7	37.3	5.6	26.1	30.6	4.5
	rGA 4dmx	42.0	27.0	15.0	41.4	26.4	15.0
G12A	Desbloqueado	25.8	25.8		25.7	25.9	
	rGT 4dmx	55.7	66.8	11.1	41.7	50.3	8.6
	rGA 4dmx	75.6	48.2	27.4	58.0	35.4	22.5

Estos datos muestran que la mutante ARNasa H2 P13T mejoró la discriminación ΔCq con el cebador rGT de 0,2 ciclos (observado para WT) a 4,5 ciclos (observado para 110 mU de la mutante ARNasa H2). La ARNasa H2 P13T también mejoró la discriminación del apareamiento erróneo con el cebador rGA, aumentando el ΔCq de 7,3 a 15,0 ciclos. Estas mejoras convirtieron un ensayo fallido en uno exitoso, particularmente cuando se empleó el cebador rGT. Asimismo, la mutante ARNasa H2 G12A mejoró el ΔCq de la discriminación de apareamientos erróneos con el cebador rGT de 0,2 ciclos a 8,6 ciclos. La ARNasa H2 G12A también mejoró la discriminación del apareamiento erróneo con el cebador rGA, aumentando el ΔCq de 7,3 a 22,5 ciclos. Este cambio se produjo a costa de cierta eficiencia de amplificación, pero esto probablemente se superaría con la adición de más enzima mutante ARNasa H2 G12A. En conclusión, ambas mutaciones mejoran la discriminación del apareamiento erróneo cuando éste se ubica en el 3' del nucleótido de ARN.

#### EJEMPLO 14 - como referencia

Este ejemplo demuestra el efecto de ciertas mutaciones sobre la actividad de la Enzima ARNasa H2 de *P.a.* En particular, la mutación G169A de la ARNasa H2 de *P.a.* no tiene ningún efecto sobre la discriminación del apareamiento erróneo cuando éste se ubica de manera opuesta al ARN.

Para identificar enzimas mutantes ARNasa H2 con las propiedades deseadas, se ha usado adicionalmente se desarrolló una mutante de ARNasa H2 de *P.a.* al sustituir la glicina por alanina en la posición 169 (G169A). Es posible que mutaciones similares en las enzimas ARNasa H2 de otras especies que admiten la rhPCR muestren también propiedades mejoradas similares en relación con sus formas WT.

*P.a.* mutante con etiqueta 6x-His y WT. Las proteínas ARNasa H2 se generaron por técnicas estándar de mutagénesis dirigida al sitio (SDM, por sus siglas en inglés, ver, por ejemplo, Weiner M. et al., *Gene*, 151:119-123

5 (1994)). Los cebadores usados para el SDM de la enzima ARNasa H2 de *P.a.* se muestran en la Tabla 29. Se verificó la secuencia de las proteínas mutagenizadas y se expresaron en *E. coli* usando métodos estándar. La purificación se realizó mediante purificación por afinidad sobre una columna cargada de Ni<sup>2+</sup>, como se describe en Dobosy *et al.* (2011) y en la patente de EE.UU. No. 8,911,948 B2). Las secuencias finales de aminoácidos de las proteínas mutagenizadas se muestran en la Tabla 30. Después de la expresión y purificación, se determinaron la actividad específica y las definiciones unitarias mediante técnicas descritas previamente (patente US 8,911,948 B2).

10 Tabla 29: Cebadores SDM para la mutagénesis de las enzimas ARNasa H2 usadas en el Ejemplo 14.

Nombre del cebador	SEQ ID NO:	Cambios de AA específicos	Secuencia
Oligo sentido G169A	212	G169A	AGCCGAATAACGGTGATTTGGTCCGCATA CCCGCTGATCCGCGTACTAAGA
Oligo antisentido G169A	213	G169A	TCTTAGTACGCCGATCAGACGGGTAT <b>GCG</b> GAACCAAAATCACCGTATTGGCT

Todas las bases son ADN. Los caracteres mostrados en negrita son los nucleótidos mutagénicos.

15 Tabla 30: Secuencias de aminoácidos para las proteínas ARNasa H2 del Ejemplo 14.

No. Mut	ID	SEQ ID NO:	Cambios de AA específicos	Secuencia
N/A	197		ARNasa H2 WT	MKVAGADEAGRGPVIGPLVIVAAVVEEDKIR SLTKLGVKDSKQLTPAQREKLFDEIVKVLD YSVVIVSPQDIDGRKGSMNELEVENFVKALN SLKVKPEVIYIDSADVKAERFAENIRSRLAYE AKVVAEHKADAKYEIVSAASILAKVIRDREIE KLKAEYGDFGSGYPSDPRTKWLEEWYSKH GNFPIVRRRTWDTAKKIEEKFKRAQLTLDNFL KRFRN
3	214		G169A	MKVAGADEAGRGPVIGPLVIVAAVVEEDKIR SLTKLGVKDSKQLTPAQREKLFDEIVKVLD YSVVIVSPQDIDGRKGSMNELEVENFVKALN SLKVKPEVIYIDSADVKAERFAENIRSRLAYE AKVVAEHKADAKYEIVSAASILAKVIRDREIE <u>KLKAEYGDFGSA</u> YPSDPRTKWLEEWYSKH GNFPIVRRRTWDTAKKIEEKFKRAQLTLDNFL KRFRN

La ubicación de las mutaciones se muestra en negrita y subrayada.

20 Para determinar si esta enzima mutante ARNasa H2 aumenta la discriminación del apareamiento erróneo cuando éste está de manera opuesta al ARN, se usaron ensayos cuantitativos de rhPCR frente al SNP de rs4939827 presente en SMAD7. Este SNP se ha usado en el pasado (Dobosy *et al.*, 2011, y patente de EE.UU. 8,911,948 B2) para caracterizar la eficiencia y especificidad de la rhPCR, y se conoce bien su respuesta en diferentes condiciones. Los cebadores usados en estos ensayos se muestran en la Tabla 31, SEQ ID NO: 215-218. Los ensayos se realizaron en volúmenes de reacción de 10 µL. El termociclado y la recolección de datos se realizaron con un sistema de tiempo real CFX384® (Bio-Rad®, Hercules, CA). Brevemente, se usó 1x de la iQ™ SYBR® Green Supermix® en combinación con 200 nM (2 pmol) del cebador sentido bloqueado (SEQ ID NO: 217 o 218) y 200 nM (2 pmol) del cebador antisentido desbloqueado (SEQ ID NO: 216), o 200 nM (2 pmol) de cebador sentido de control no bloqueado (SEQ ID NO: 215) y 200 nM (2 pmol) de cebador antisentido no bloqueado (SEQ ID NO: 216). 5 mU de WT (SEQ ID NO: 197) o la enzima mutante ARNasa H2 G169 (SEQ ID NO: 214) a cada reacción. En cada reacción se incluyeron 10 ng de ADN genómico de línea celular (líneas celulares NA1852 y NA18537, Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ), que representaban los dos genotipos homocigotos en el SNP de rs4939827. Las reacciones se ciclaron en las siguientes condiciones 95 °C<sup>3:00</sup> → (95 °C<sup>0:10</sup> → 60 °C<sup>0:30</sup>) × 85. Los datos de fluorescencia se recolectaron después de cada punto de tiempo de extensión. Una vez finalizada la reacción, se analizaron los datos y se calculó el promedio de los valores de Cq de cada punto. Los resultados se presentan en la Tabla 24.

25

30

35

Tabla 31: Secuencias y SEQ ID de los cebadores usados en el experimento descrito en el Ejemplo 14.

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
215	rs4939827 desbloqueado	CAGCCTCATCCAAAAGAGGAAA
216	rs4939827 antisentido desbloqueado	CTCACTCTAAACCCCAGCATT
217	rs4939827 rC 4dmx	CAGCCTCATCCAAAAGAGGAAcAGGA-x
218	rs4939827 rU 4dmx	CAGCCTCATCCAAAAGAGGAAuAGGA-x

ADN en mayúsculas, ARN en minúsculas. x = grupo bloqueador espaciador C3 (propanodiol).

Tabla 32: Cq y ΔCq para el experimento descrito en el Ejemplo 14.

5

Enzima ARNasa H2	Nombre del cebador	SEQ ID NO del cebador sentido	Molde CC	Molde TT	Δ Cq
WT	Desbloqueado	7	22.4	23.0	
	rC 4dmx	9	22.9	34.3	11.5
	rU 4dmx	10	32.6	23.3	9.3
G169A (Mut ID 3)	Desbloqueado	7	22.2	22.0	
	rC 4dmx	9	23.2	31.1	8.0
	rU 4dmx	10	39.2	27.5	11.8

Estos datos muestran que estas mutaciones no aumentan significativamente la discriminación de apareamientos erróneos cuando el SNP está situado inmediatamente enfrente del residuo de ARN en el cebador de la rhPCR.

## 10 EJEMPLO 15

Este ejemplo demuestra el efecto de ciertas mutaciones sobre la actividad de la Enzima ARNasa H2 de *P.a*. En particular, la mutación de la ARNasa H2 en G169A de *P.a*. aumenta la discriminación del apareamiento erróneo cuando éste se coloca en el 5' del nucleótido de ARN.

15

Para determinar si se puede aumentar la discriminación del apareamiento erróneo con la enzima mutante ARNasa H2 G169A cuando el apareamiento erróneo está ubicado en el 5' del nucleótido del ARN, se diseñaron ensayos dirigidos al rs113488022, el SNP V600E del gen BRAF humano, con el apareamiento erróneo ubicado en el 5' del ARN. Los cebadores usados en estos ensayos se muestran en la Tabla 27, SEQ ID NO: 204-207. Los ensayos se realizaron en volúmenes de reacción de 10 μL. El termociclado y la recolección de datos se llevaron a cabo con un sistema de tiempo real CFX384® (Bio-Rad®, Hercules, CA). Brevemente, se usó 1x de la iQ™ SYBR® Green Supermix® en combinación con 200 nM (2 pmol) del cebador sentido bloqueado (SEQ ID NO: 206 o 207) y 200 nM (2 pmol) del cebador antisentido desbloqueado (SEQ ID NO: 205), o 200 nM (2 pmol) de cebador sentido de control no bloqueado (SEQ ID NO: 204) y 200 nM (2 pmol) de cebador antisentido no bloqueado (SEQ ID NO: 205). 25 mU de WT (SEQ ID NO: 197) o la enzima mutante ARNasa H2 G169 (SEQ ID NO: 214) a cada reacción. Las 2.000 copias del molde gBlock® sintético de hebra doble (IDT, Coralville, IA), que representan los dos genotipos homocigotos en el SNP de rs113488022 (SEQ ID NO: 208 o 209), también se añadieron a cada reacción. Las reacciones se ciclaron en las siguientes condiciones 95 °C<sup>3:00</sup> → (95 °C<sup>0:10</sup> → 60 °C<sup>0:30</sup>) x 85. Se recolectó la intensidad de fluorescencia después de cada paso de extensión. Los valores medios de Cq se obtuvieron a partir de la media de 3 réplicas. Los resultados se muestran en la Tabla 33.

20

25

30

Para determinar si se puede aumentar la discriminación del apareamiento erróneo con la enzima mutante ARNasa H2 G169A cuando el apareamiento erróneo está ubicado en el 5' del nucleótido del ARN, se diseñaron ensayos dirigidos al rs113488022, el SNP V600E del gen BRAF humano, con el apareamiento erróneo ubicado en el 5' del ARN. Los cebadores usados en estos ensayos se muestran en la Tabla 27, SEQ ID NO: 204-207. Los ensayos se realizaron en volúmenes de reacción de 10 μL. El termociclado y la recolección de datos se llevaron a cabo con un sistema de tiempo real CFX384® (Bio-Rad®, Hercules, CA). Brevemente, se usó 1x de la iQ™ SYBR® Green Supermix® en combinación con 200 nM (2 pmol) del cebador sentido bloqueado (SEQ ID NO: 206 o 207) y 200 nM (2 pmol) del cebador antisentido desbloqueado (SEQ ID NO: 205), o 200 nM (2 pmol) de cebador sentido de control no bloqueado (SEQ ID NO: 204) y 200 nM (2 pmol) de cebador antisentido no bloqueado (SEQ ID NO: 205). 25 mU de WT (SEQ ID NO: 197) o la enzima mutante ARNasa H2 G169 (SEQ ID NO: 214) a cada reacción. Las 2.000 copias del molde gBlock® sintético de hebra doble (IDT, Coralville, IA), que representan los dos genotipos homocigotos en el SNP de rs113488022 (SEQ ID NO: 208 o 209), también se añadieron a cada reacción. Las reacciones se ciclaron en las siguientes condiciones 95 °C<sup>3:00</sup> → (95 °C<sup>0:10</sup> → 60 °C<sup>0:30</sup>) x 85. Se recolectó la intensidad de fluorescencia después de cada paso de extensión. Los valores medios de Cq se obtuvieron a partir de la media de 3 réplicas. Los resultados se muestran en la Tabla 33.

Tabla 33: Cq y ΔCq para los experimentos del Ejemplo 15.

ARNasa	Sentido	10 mU de ARNasa H2			25 mU de ARNasa H2		
		Cebador	Molde T	Molde A	Δ Cq	Molde T	Molde A
WT	Desbloqueado	26.8	25.9			26.1	25.8
	rGT 4dmx	28.1	28.1	0.0	25.6	25.9	0.3
	rGA 4dmx	40.5	26.3	14.2	28.1	25.6	2.5
G169A	Desbloqueado	26.2	26.0			26.9	26.7
	rGT 4dmx	29.2	39.3	10.1	26.1	27.3	1.2
	rGA 4dmx	43.2	26.4	16.8	31.7	25.9	5.9

35

Estos datos muestran que la mutante ARNasa H2 G169A mejoró la discriminación ΔCq con el cebador rGT de 0,0 ciclos (observado para WT) a 10,1 ciclos (observado para 5 mU de la mutante ARNasa H2). La ARNasa H2 G169A también mejoró ligeramente la discriminación del apareamiento erróneo con el cebador rGA, aumentando el ΔCq de 14,2 a 16,8 ciclos. Estas mejoras convirtieron un ensayo fallido en uno exitoso, particularmente cuando se empleó el cebador rGT. En conclusión, esta mutación mejora la discriminación del apareamiento erróneo cuando éste se ubica en el 3' del nucleótido de ARN.

40

Las mutaciones de la ARNasa H2 examinadas en los Ejemplos 11-15 potenciaban más la discriminación del apareamiento erróneo cuando la mutación se ubicaba en el 5' o 3' del ARN que cuando se localizaba de manera

opuesta al nucleótido del ARN. En conjunto, estos resultados sugieren que las limitaciones de la discriminación de mutaciones de la rhPCR se basan no solamente en la capacidad de la ARNasa H2 para reconocer el apareamiento erróneo y en la capacidad de una polimerasa para extender el cebador escindido, sino también en la conversión del molde con apareamiento erróneo en la secuencia del cebador. Esta conversión enmascara la capacidad de la enzima ARNasa H2 para reconocer el apareamiento erróneo cuando éste se encuentra en el nucleótido de ARN. Esto puede ocurrir de varias maneras. La mayoría de las conversiones (si no todas) surgen de un escindido que se produce en el lado 3' del apareamiento erróneo. Una vez que se produce este tipo de escindido, puede ser ampliado por la ADN polimerasa, después de lo cual el molde recién generado coincide plenamente con los cebadores. Posteriormente, el molde convertido contamina la muestra porque se espera que se amplifique en ciclos subsecuentes.

La ARNasa H2 usualmente corta la hebra en el lado 5' del nucleótido de ARN. Los experimentos (no mostrados) han indicado que el escindido raro en el lado 3' del nucleótido de ARN se produce a una tasa de aproximadamente 1 por cada 1.000 reacciones de escisión. Si el apareamiento erróneo se ubica en el sitio del ARN, tal escindido raro causará la conversión del molde. La introducción del apareamiento erróneo 5' del nucleótido de ARN hace que la conversión del molde a la secuencia del cebador se produzca en el primer ciclo de replicación. En este caso, la discriminación del apareamiento erróneo depende únicamente de la capacidad de la ARNasa H2 para reconocer el apareamiento erróneo y de la capacidad de la polimerasa para extender el cebador no apareado, ya que se espera que la polimerasa se inhiba por un apareamiento erróneo en el extremo 3' de un cebador.

Por otro lado, colocar el apareamiento erróneo en el 3' del nucleótido de ARN reduce (o elimina por completo) la conversión del molde. De nuevo, en esta posición, la discriminación del apareamiento erróneo depende únicamente de la capacidad de la ARNasa H2 para reconocer el apareamiento erróneo y de la capacidad de la polimerasa para extender el cebador no apareado. Sin embargo, no se espera que la polimerasa se inhiba en este caso, ya que el sitio de apareamiento erróneo se escinde del cebador. Los resultados también se pueden haber debido a que las mutaciones divulgadas en la presente son más susceptibles a las mutaciones presentes en 5' y 3' del ARN que a las que se encuentran de manera opuesta al ARN. Estas hipótesis no están contempladas para limitar el alcance de la invención.

### **EJEMPLO 16 - como referencia**

Este ejemplo demuestra el efecto de ciertas mutaciones sobre la actividad de la Enzima ARNasa H2 de *P.a*. En particular, las mutaciones G12A y P13T aumentan la discriminación del apareamiento erróneo cuando éste se coloca en el 3' del ARN con múltiples SNP.

Para determinar si la discriminación del apareamiento erróneo puede aumentar con las enzimas mutantes ARNasa H2 G12A y P13T cuando el apareamiento erróneo está ubicado en el 3' del ARN, se realizaron ensayos dirigidos a los rs12744607, rs60118785, rs60607502, rs7992897, rs3117947, rs7583169, rs4853850, rs28520334, rs13316719, rs61514082, rs12908737, rs6572257, rs2242527, rs1076939, rs35593667, y rs6046375 se diseñaron con el apareamiento erróneo ubicado en el 3' del ARN. Los ensayos se realizaron en volúmenes de reacción de 10 µL. El termociclado y la recogida de datos se realizaron con un CFX384™ Real-Time System (Bio-Rad®, Hercules, CA). Brevemente, se usó 1x de la iQ™ SYBR® Green Supermix® en combinación con 200 nM (2 pmol) del cebador sentido bloqueado y 200 nM (2 pmol) del cebador antisentido no bloqueado. 10 mU de WT (SEQ ID NO: 197) o 20 mU de la enzima mutante ARNasa H2 P13T (SEQ ID NO: 198 o 199) o 50 mU de la enzima mutante ARNasa H2 G12A (SEQ ID NO: 199) a cada reacción. También se añadieron a cada reacción 10 ng de ADN de líneas celulares genómicas NA12878 o NA24385, que representaban los dos genotipos homocigotos en cada uno de estos SNP. Las reacciones se ciclaron en las siguientes condiciones 95 °C<sup>3:00</sup> → (95 °C<sup>0:10</sup> → 60 °C<sup>0:30</sup>) x 85 ciclos. Se recolectó la intensidad de fluorescencia después de cada paso de extensión. Los valores medios de Cq se obtuvieron a partir de la media de 3 réplicas. Los resultados se muestran en la Tabla 34.

Tabla 34: Cq y ΔCq para los experimentos del Ejemplo 16.

	WT RN2			P13T			G12A		
	NA12878	NA24385	Δ Cq	NA12878	NA24385	Δ Cq	NA12878	NA24385	Δ Cq
rs12744607	>85	>85	N/A	73.0	>85	12.0	38.2	61.5	23.3
rs13316719	27.5	25.3	2.2	26.4	25.5	1.0	26.4	27.0	-0.7
rs60118785	25.6	37.8	12.3	40.8	63.7	22.9	26.7	37.6	11.0
rs61514082	24.7	27.2	2.5	25.8	52.5	26.7	26.0	36.5	10.5
rs60607502	25.4	25.5	0.0	25.9	34.8	8.9	29.8	44.0	14.1
rs12908737	34.7	70.6	35.9	75.3	>85	9.7	35.7	52.9	17.2
rs7992897	25.1	27.9	2.8	24.5	24.4	0.1	25.9	30.7	4.8
rs6572257	>85	71.5	13.5	71.3	40.9	30.4	49.2	27.7	21.5
rs3117947	47.3	62.4	15.1	33.3	43.5	10.2	25.6	26.3	0.6
rs2242527	29.4	47.9	18.5	39.2	67.7	28.5	32.6	50.5	17.9

	WT RN2			P13T			G12A		
	NA12878	NA24385	$\Delta$ Cq	NA12878	NA24385	$\Delta$ Cq	NA12878	NA24385	$\Delta$ Cq
rs7583169	27.6	26.0	1.6	31.6	35.7	4.0	29.1	41.8	12.7
rs1076939	33.7	40.2	6.5	34.1	59.6	25.5	36.3	49.9	13.6
rs4853850	30.2	31.9	1.7	36.6	56.1	19.5	29.3	34.0	4.7
rs35593667	31.7	34.5	2.7	42.3	64.9	22.7	38.3	73.2	34.9
rs28520334	26.1	25.1	1.0	24.9	24.3	0.6	24.7	25.0	0.3
rs6046375	>85	61.1	24.0	80.4	46.1	34.3	53.1	28.2	24.9

Estos datos muestran que la mutante ARNasa H2 P13T mejoró la discriminación  $\Delta$ Cq en múltiples SNPs. Un ejemplo excelente es el rs61514082, en donde el  $\Delta$ Cq aumentó de 2,5 ciclos (observado para WT) a 26,7 ciclos (observado para la mutante a 20 mU de ARNasa H2). La ARNasa H2 P13T también mejoró la discriminación del

5 apareamiento erróneo en el SNP de rs60607502, aumentando el  $\Delta$ Cq de 0,0 a 8,9 ciclos. Otros SNP también mejoraron su especificidad. Los dos SNP que no mejoraron  $\Delta$ Cq (rs13316719 y rs28520334) muestran que esta mutación se puede mejorar aún más, y no resuelve todos los problemas con todos los ensayos, a pesar de que se observó una mejora de amplio rango. Estas mejoras convirtieron muchos ensayos fallidos en ensayos exitosos, demostrando las amplias mejoras en  $\Delta$ Cq que confiere esta mutación.

10 La mutante ARNasa H2 G12A también mejoró el  $\Delta$ Cq de la discriminación de apareamientos erróneos en múltiples SNP. El SNP de rs61514082 aumentó en  $\Delta$ Cq de 2,5 ciclos a 10,5 ciclos. La ARNasa H2 G12A también mejoró la discriminación del apareamiento erróneo con el SNP de rs60607502, aumentando el  $\Delta$ Cq de 0,0 a 14,1 ciclos. En conclusión, ambas mutaciones mejoran la discriminación del apareamiento erróneo cuando éste se ubica en el 3'

15 del nucleótido de ARN.

20 El uso de los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) se debe interpretar que abarca tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, que significan "que incluye, pero no se limitan a"), a menos que se indique lo contrario. La enumeración de rangos de valores en la presente solamente pretende servir como método abreviado para referirse individualmente a cada uno de los valores incluidos en el rango, a menos que se indique lo contrario, y cada uno de los valores se incorpora a la memoria descriptiva como si se hubiera enumerado individualmente en la presente.

25 Todos los métodos descritos en la presente se pueden realizar en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en la presente o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o del lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") que se proporciona en la presente, está contemplado simplemente para iluminar mejor la invención y no supone una limitación del alcance de la invención, a menos que se reivindique de otro modo. No se debe interpretar ningún lenguaje de la memoria descriptiva en el sentido de que indique algún elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de enriquecimiento de objetivos, que comprende:

(a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende:

5 (i) un primer cebador oligonucleotídico que tiene un dominio de cola que no es complementario a una secuencia objetivo, el dominio de cola que comprende una primera secuencia universal de cebador; un dominio de escisión, en donde dicho dominio de escisión, cuando se hibrida con el objetivo, es escindible por una enzima ARNasa H2, colocado en el 5' de un grupo de bloqueo y en el 3' de una posición de variación, el grupo de bloqueo colocado en o cerca del extremo del extremo 3' del primer cebador oligonucleótido en donde el grupo de bloqueo previene la extensión del cebador y/o inhibe que el primer cebador sirva como molde para la síntesis de ADN;

10 (ii) un ácido nucleico de muestra que ha sido tratado con una enzima CRISPR, que puede o no tener la secuencia objetivo;

(iii) una enzima de corte, en donde la enzima de corte es una enzima ARNasa H2; y

(iv) una polimerasa;

15 (b) hibridar el primer cebador con la secuencia de ADN objetivo para formar un sustrato de hebra doble;

(c) escindir el primer cebador hibridizado, si el primer cebador es complementario al objetivo, con la enzima de escisión en un punto dentro o adyacente al dominio de escisión para eliminar el grupo de bloqueo del primer cebador; y

(d) extender el primer cebador con la polimerasa.

20

2. El método de la reivindicación 1, en donde la secuencia de ADN objetivo es una muestra que ha sido tratada con una enzima Cas9 o Cpf1.

25

3. El método de la reivindicación 1, el método comprende además un segundo cebador en orientación antisentido para apoyar el cebado y la extensión del primer producto de extensión del cebador; opcionalmente, en donde el segundo cebador comprende además un dominio de cola que comprende una segunda secuencia de cebador universal.

30

4. El método de la reivindicación 3, en donde los pasos (b)-(d) se realizan de 1 a 10 veces.

35

5. El método de la reivindicación 4, que comprende además eliminar los cebadores no extendidos de la reacción e hibridar los cebadores universales con el producto de extensión para formar un segundo producto de extensión; opcionalmente, en donde los cebadores universales comprenden además secuencias de cola para la adición de secuencias adaptadoras al segundo producto de extensión;

40

opcionalmente, en donde la secuenciación se realiza en el segundo producto de extensión para determinar la secuencia del objetivo.

6. El método de la reivindicación 1, en donde la enzima de escisión es una enzima de escisión de arranque en caliente que es termoestable y tiene una actividad reducida a temperaturas más bajas;

45

opcionalmente, en donde la enzima de corte es la enzima ARNasa H2 de *Pyrococcus abyssi*.

7. El método de la reivindicación 1, en donde la enzima de escisión es una enzima de escisión de arranque en caliente modificada químicamente que es termoestable y tiene una actividad reducida a temperaturas más bajas; opcionalmente, en donde la enzima de escisión de arranque en caliente es una ARNasa H2 de *Pyrococcus abyssi* modificada químicamente.

50

8. El método de la reivindicación 1, en donde la enzima de corte es una enzima de corte de inicio en caliente que se inactiva reversiblemente a través de la interacción con un anticuerpo a temperaturas más bajas que es termoestable y tiene una actividad reducida a temperaturas más bajas.

55

9. El método de la reivindicación 1, en donde el dominio de escisión comprende al menos una base de ARN, y la enzima de escisión escinde entre la posición complementaria a la variación y la base de ARN;

opcionalmente, en donde el dominio de escindir comprende al menos una base de ARN situada en el 3' de la posición de variación, y comprende una base de ADN entre la posición de variación y la base de ARN.

60

10. El método de la reivindicación 1, en donde el dominio de escisión comprende uno o más nucleósidos 2'-modificados, y la enzima de escisión escinde entre la posición complementaria a la variación y el uno o más nucleósidos modificados;

opcionalmente, en donde el uno o más nucleósidos modificados son 2'-fluoronucleósidos.

11. El método de la reivindicación 1, en donde la polimerasa es una polimerasa de alta discriminación; opcionalmente, en donde la polimerasa es una Taq polimerasa mutante H784Q; además, opcionalmente, en donde la Taq polimerasa mutante H784Q se inactiva reversiblemente mediante modificación química, de aptámeros o de anticuerpos.

## DIBUJOS

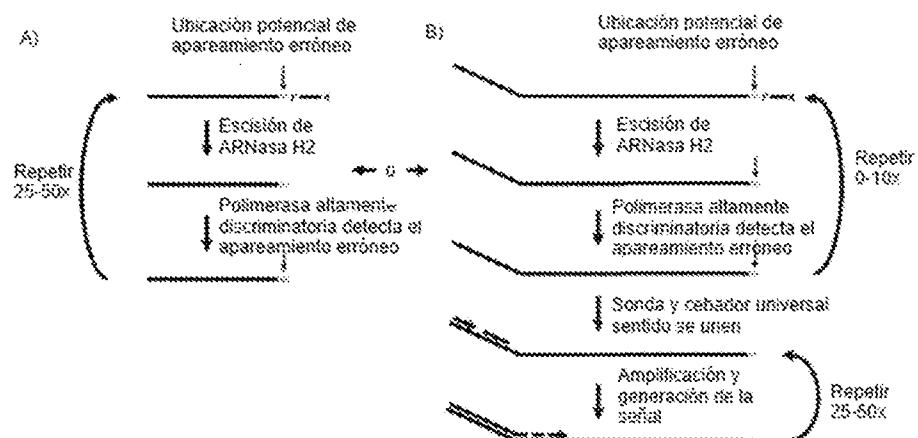


FIGURA 1

ES 2 989 461 T3

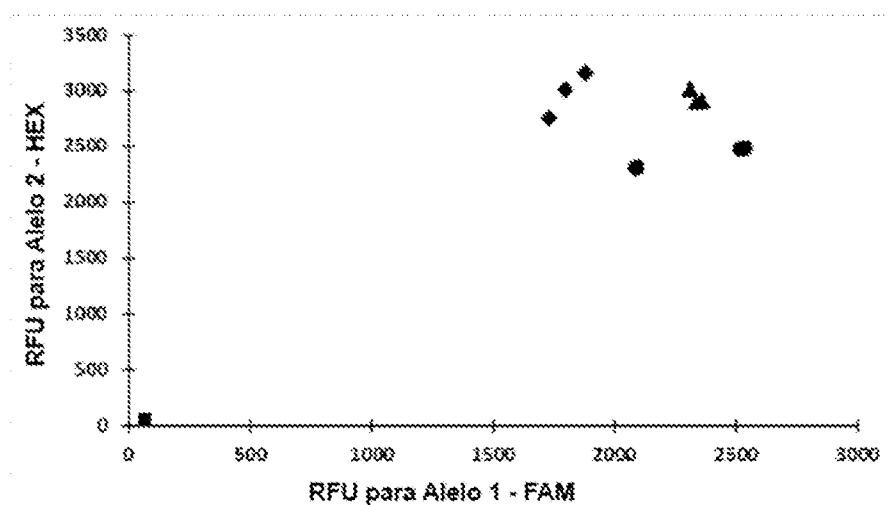


FIGURA 2A

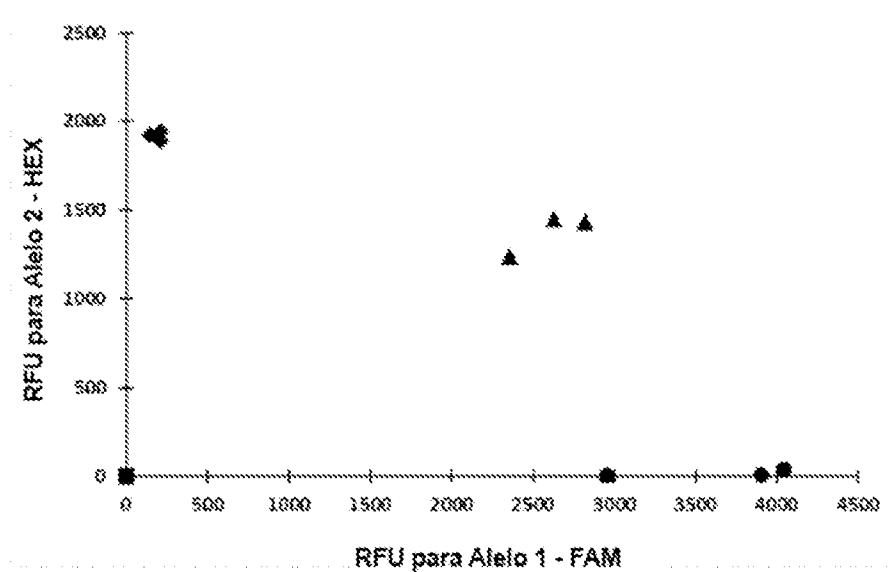


FIGURA 2B

# ES 2 989 461 T3

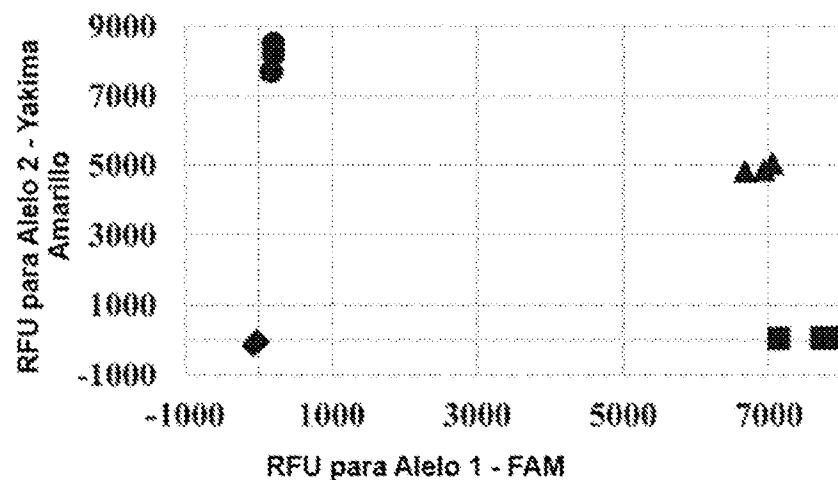


FIGURA 3A

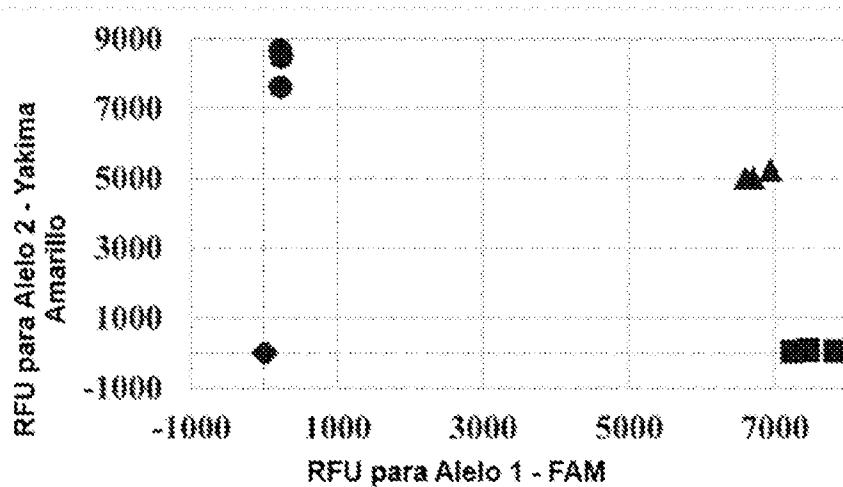


FIGURA 3B

# ES 2 989 461 T3

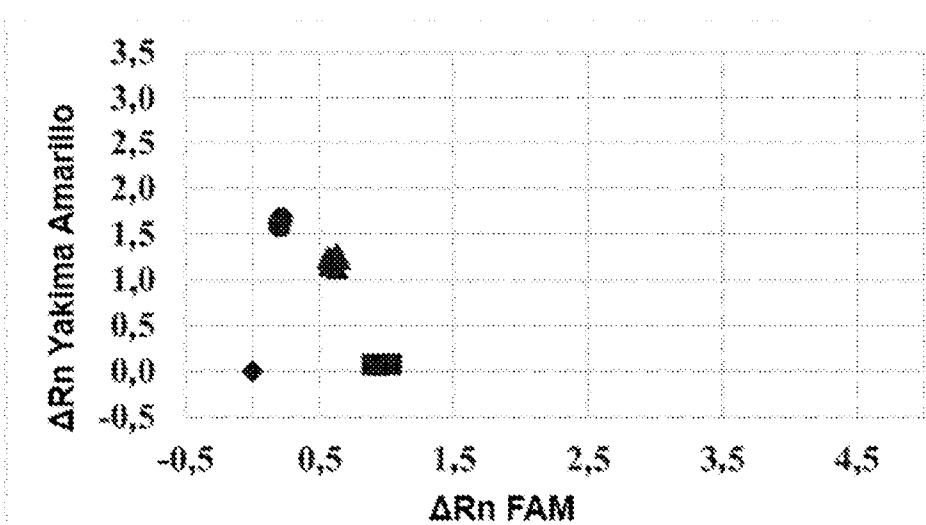


FIGURA 4A

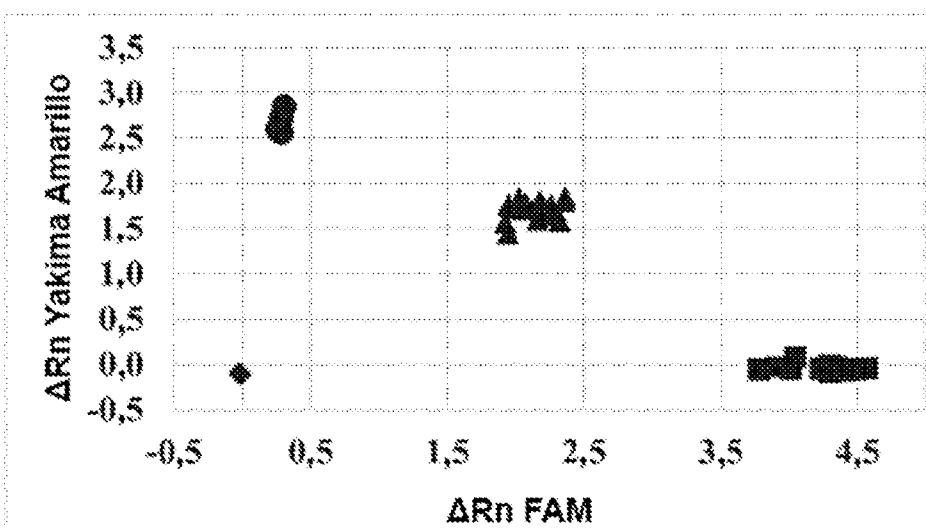


FIGURA 4B

# ES 2 989 461 T3

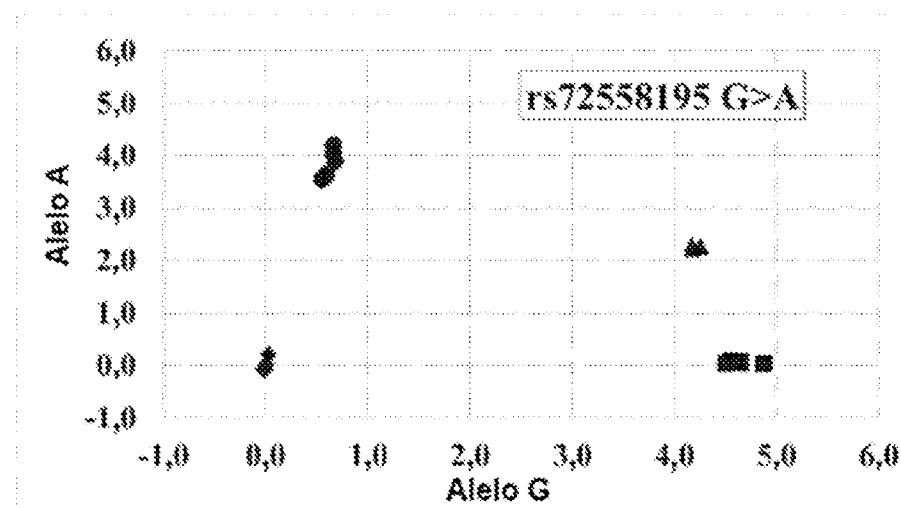


FIGURA 5A

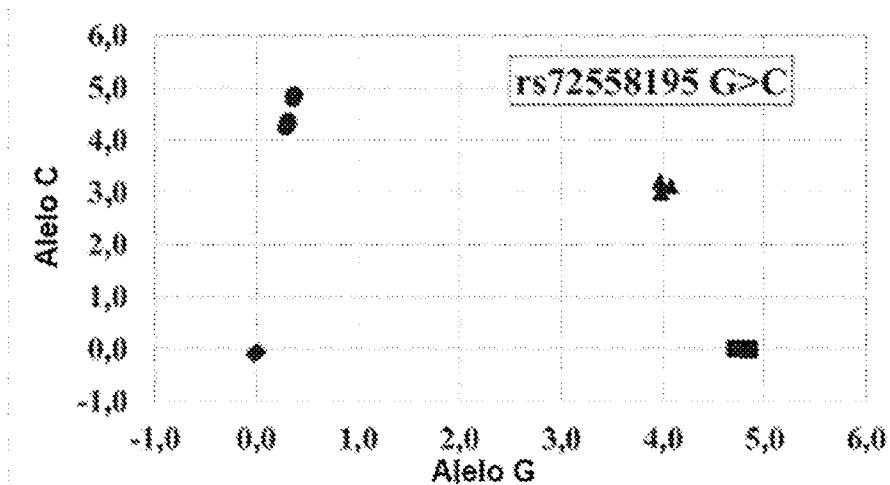


FIGURA 5B

ES 2 989 461 T3

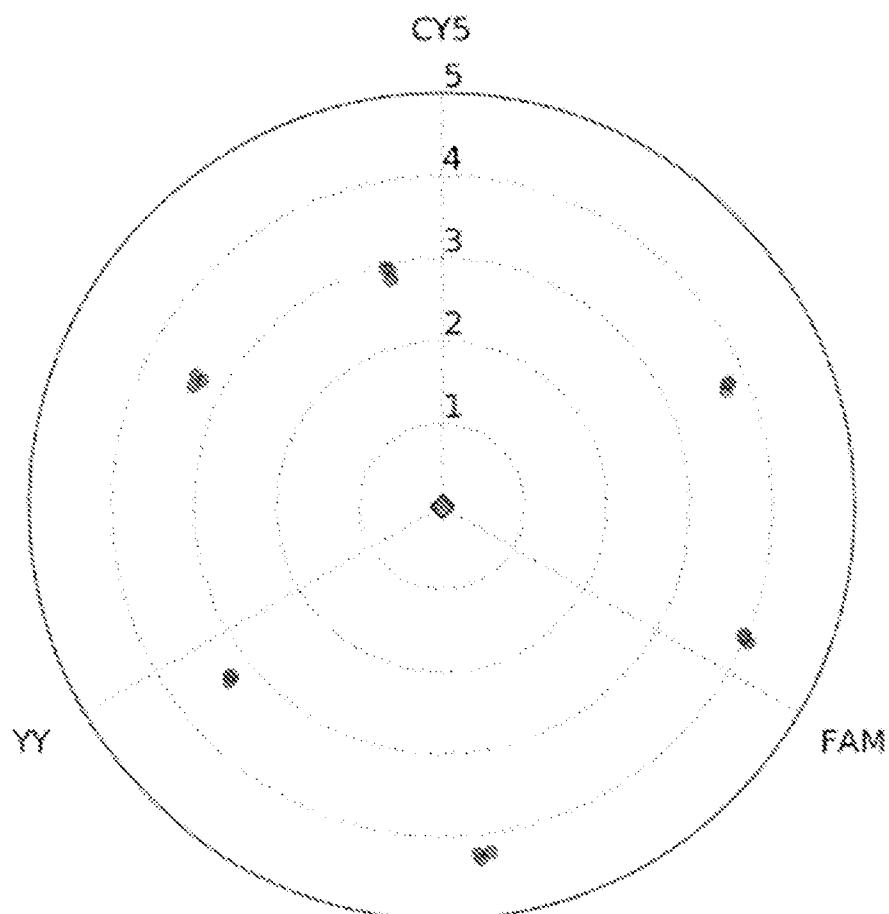


FIGURA 6

# ES 2 989 461 T3

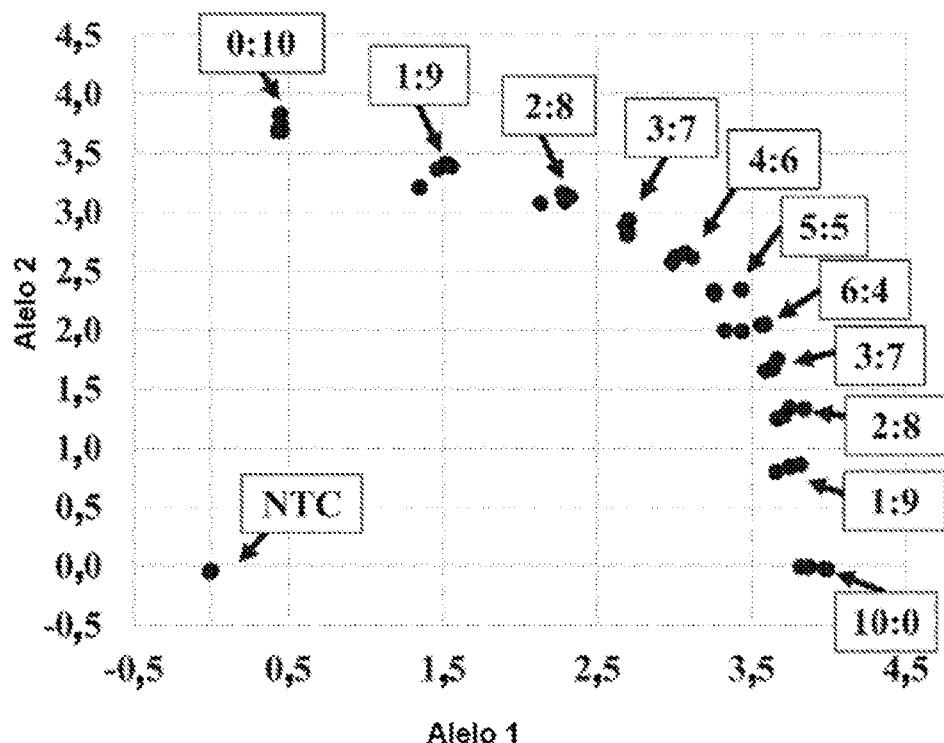
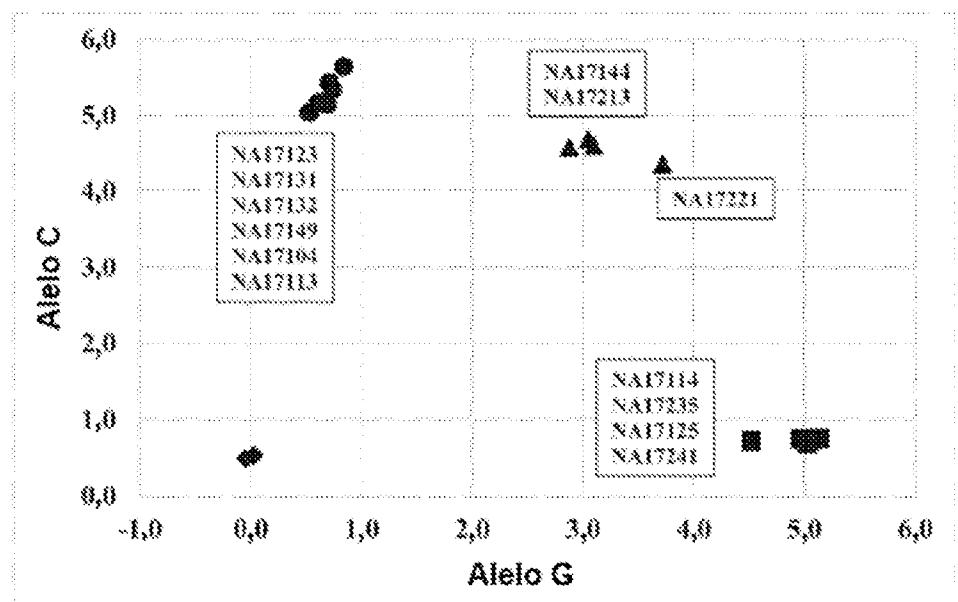
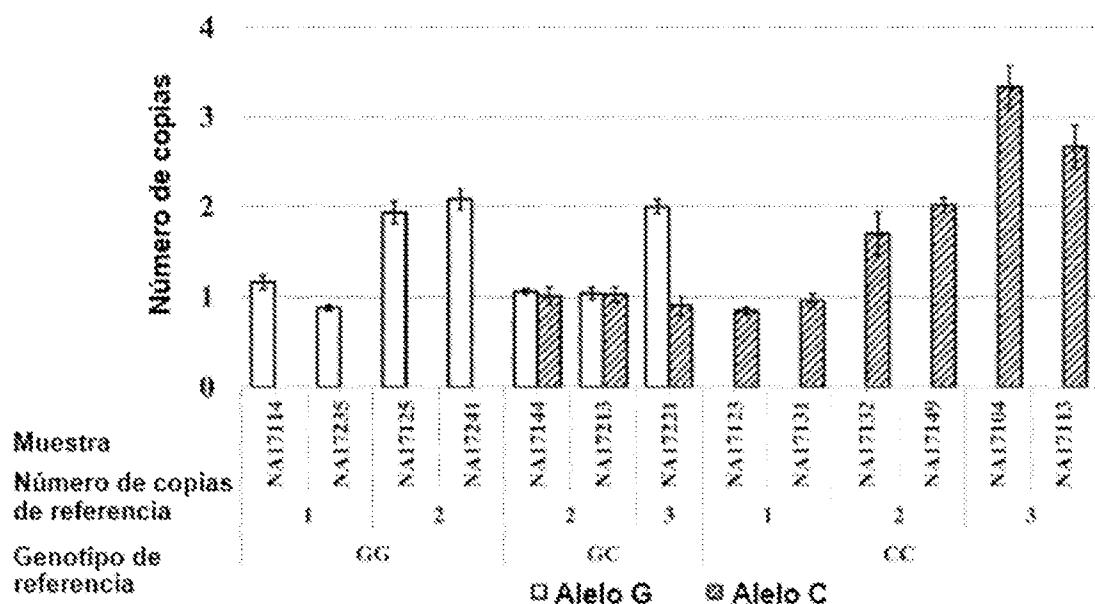


FIGURA 7

# ES 2 989 461 T3

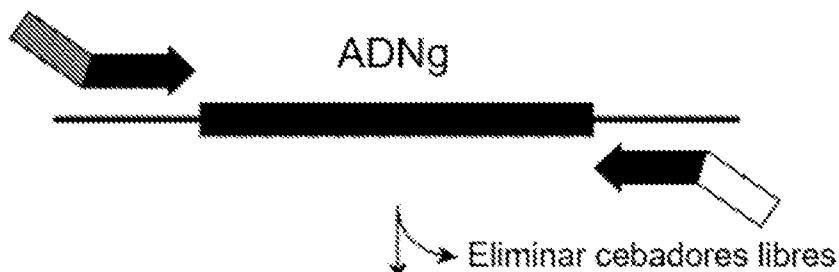


**FIGURA 8A**



**FIGURA 8B**

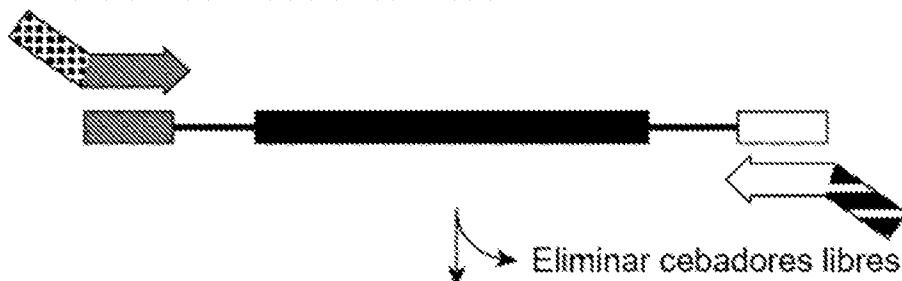
Paso 1: Multiplexado por rhPCR



Paso 2: Purificación



Paso 3: PCR universal



Paso 4: Purificación



FIGURA 9

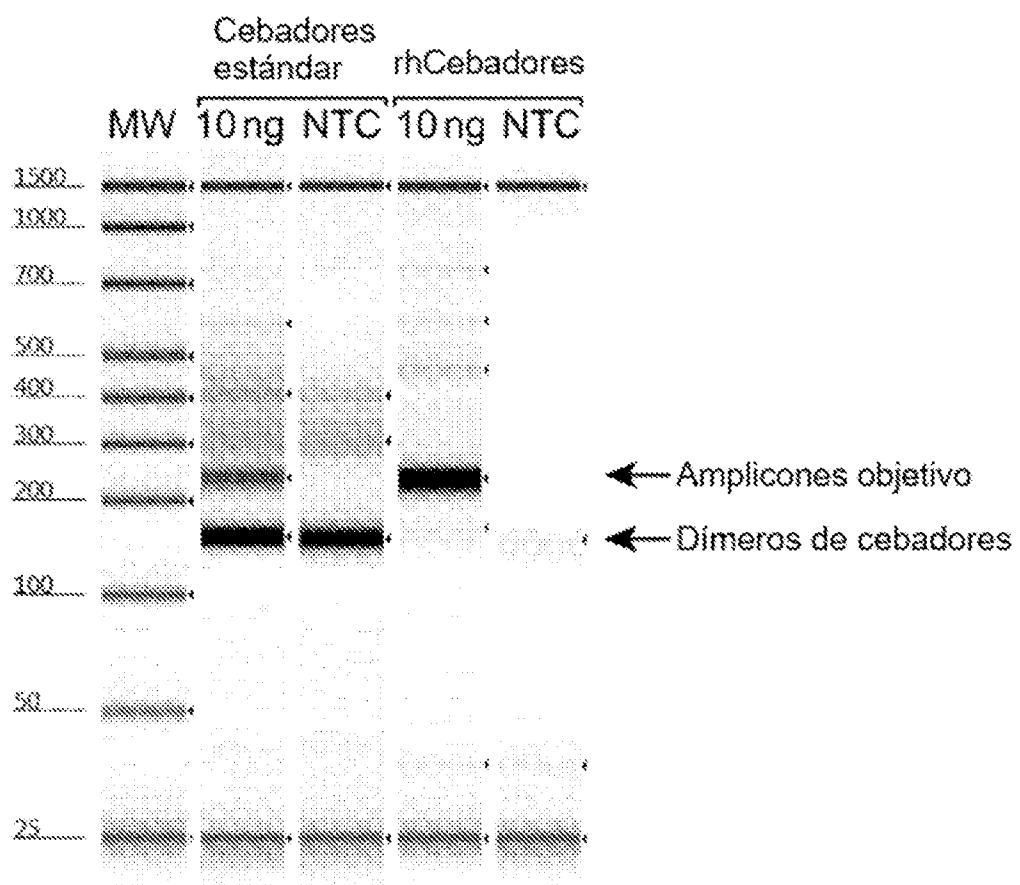


FIGURA 10

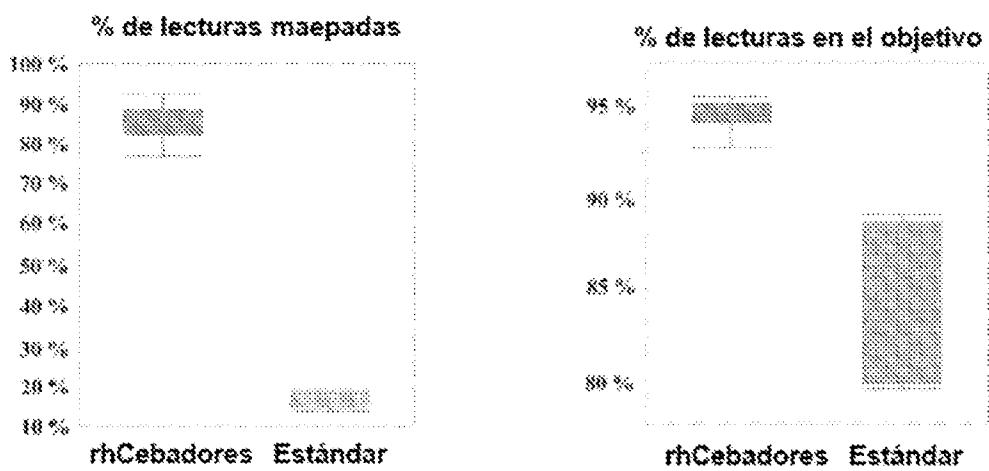


FIGURA 11

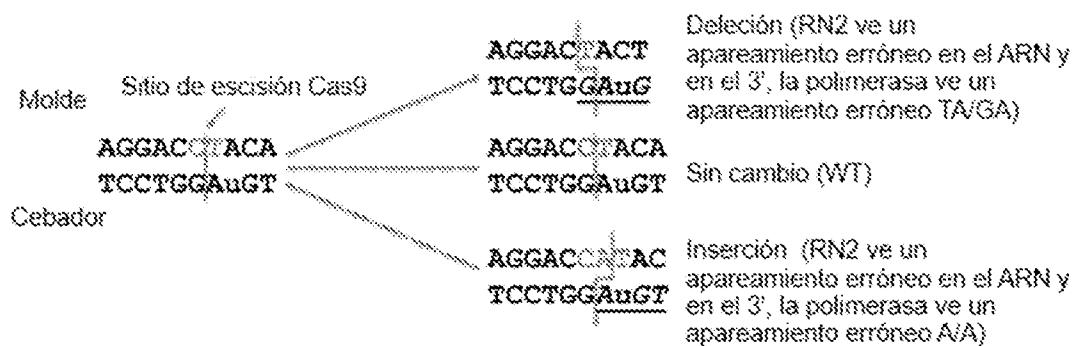


FIGURA 12

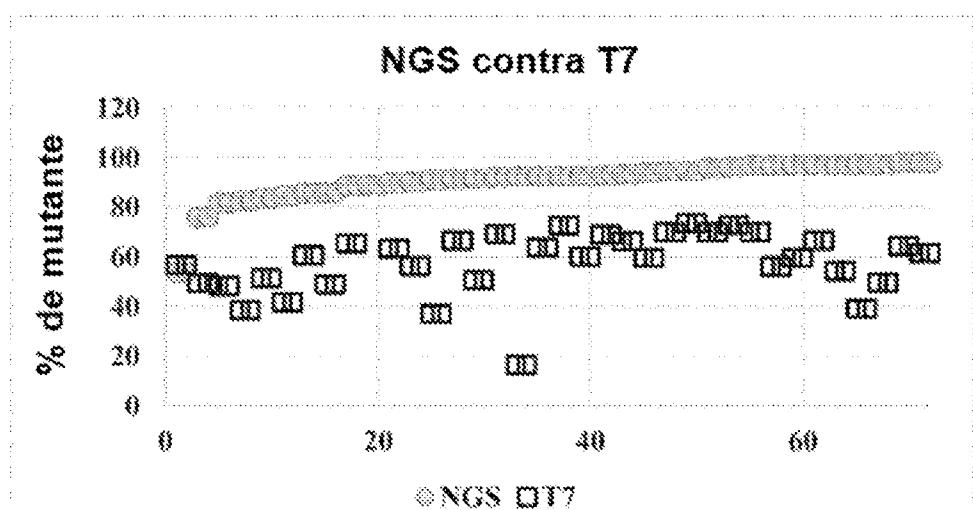


FIGURA 13A

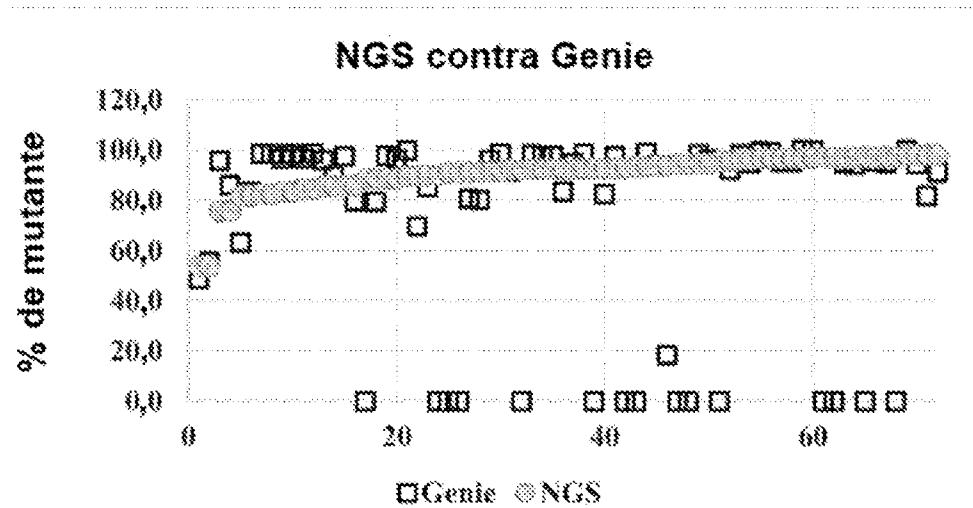


FIGURA 13B