

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 924 953**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6844 (2008.01)

C12Q 1/6862 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2020 E 20181513 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2022 EP 3842549**

54 Título: **Método simplificado de detección de secuencias de polinucleótidos**

30 Prioridad:

23.12.2019 GB 201919186

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

11.10.2022

73 Titular/es:

**BIOFIDELITY LTD (100.0%)
330 Cambridge Science Park, Milton Road
Cambridge CB4 0WN, GB**

72 Inventor/es:

**POWALOWSKA, PAULINA KLAUDYNA;
DA SILVA-WEATHERLEY, ANA LUISA BRAS DOS
SANTOS R;
STOLAREK-JANUSZKIEWICZ, MAGDALENA y
BALMFORTH, BARNABY WILLIAM**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 924 953 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

Método simplificado de detección de secuencias de polinucleótidos

5 Esta invención se refiere a un método simplificado de detección de secuencias de polinucleótidos adecuado para probar la presencia de un gran número de marcadores de diagnóstico, incluidos los utilizados en la identificación de cáncer, enfermedades infecciosas y rechazo de órganos trasplantados. También es útil para las pruebas diagnósticas complementarias en las que se debe identificar un panel de marcadores de forma fiable y económica.

10 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica muy conocida y potente para amplificar el ADN o el ARN presentes en muestras de laboratorio y de diagnóstico hasta un punto donde pueden detectarse y/o cuantificarse de forma fiable. Sin embargo, cuando se aplica con el fin de investigar muestras de analitos que contienen niveles bajos de dichas moléculas, adolece de una serie de limitaciones. En primer lugar, aunque la técnica puede detectar tan solo una única molécula objetivo, es propensa a generar resultados falsos positivos debido a la amplificación no deseada de otras secuencias de ácidos nucleicos presentes en la muestra. Esto hace que la elección de los cebadores de oligonucleótidos utilizados para iniciar la reacción sea clave; lo que a su vez hace que el diseño de cebadores con el nivel de especificidad requerido sea relativamente complejo. Como consecuencia, muchas pruebas basadas en PCR disponibles en el mercado hoy en día tienen una especificidad limitada.

15 Un segundo inconveniente es que la multiplexación de los métodos basados en PCR se limita en la práctica a un máximo de decenas de secuencias objetivo (con frecuencia, no más de 10) y se evitan las interacciones cebador-cebador, lo que da como resultado la necesidad de ventanas operativas relativamente estrechas.

20 Otro problema es que, debido a que los ciclos de reacción de PCR son exponenciales, la cuantificación del objetivo es difícil; pequeñas variaciones en la eficiencia de la reacción que tienen un gran impacto en la cantidad de material detectable generado. Incluso con los controles y calibraciones apropiados, la cuantificación generalmente se limita a una precisión dentro de un factor de alrededor de 3.

25 Finalmente, las mutaciones en la región objetivo de la investigación mediante métodos de amplificación por PCR pueden tener efectos secundarios no deseados. Por ejemplo, ha habido casos en los que las pruebas aprobadas por la FDA tuvieron que retirarse porque el organismo objetivo experimentó una mutación en la región genética objetivo de los cebadores de la prueba, lo que resultó en una gran cantidad de falsos negativos. Por el contrario, si un polimorfismo de nucleótido único (SNP) específico es el objetivo de la amplificación, el método de PCR a menudo dará un falso positivo cuando esté presente la variante de tipo silvestre. Evitar esto requiere un diseño de cebador muy cuidadoso y limita aún más la eficacia de la multiplexación. Esto es particularmente relevante cuando se buscan paneles de SNP, ya que es un requisito común en las pruebas/detección de cáncer o diagnósticos complementarios.

Resumen de la invención

35 Ahora se ha desarrollado un nuevo método simplificado que se basa en nuestra experiencia utilizando el método de pirofosforólisis empleado en nuestra patente anterior (PCT/GB2019/052017) para superar muchas de estas limitaciones. Al hacerlo, se aprovecha la especificidad de doble cadena de la pirofosforólisis; una reacción que no procederá de manera eficiente con sustratos de oligonucleótidos de cadena sencilla o sustratos de cadena doble que incluyen grupos bloqueantes o faltas de coincidencia de nucleótidos. El nuevo método es más rápido, menos complejo y menos costoso de realizar que el divulgado en el documento PCT/GB2019/052017. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para detectar una secuencia de polinucleótidos objetivo en un analito de ácido nucleico dado, comprendiendo el método las etapas de:

- 40 (a) introducir uno o más analitos de ácido nucleico en una primera mezcla de reacción que comprende:
- i. una oligonucleótido sonda A_0 de cadena sencilla;
 - ii. una enzima de pirofosforólisis; y
 - iii. una ligasa

45 donde el analito se hibrida con la oligonucleótido sonda A_0 de cadena sencilla para crear un primer producto intermedio que sea al menos parcialmente de cadena doble y en el que el extremo 3' de A_0 forma un complejo de doble cadena con la secuencia objetivo del analito y donde A_0 se pirofosforoliza en la dirección 3'-5' desde el extremo 3' para crear al menos una cadena de A_1 parcialmente digerida y A_1 se somete a ligación usando una férula para formar A_2 , donde la férula incluye el polinucleótido objetivo o un oligonucleótido D, y donde someterse a ligación incluye:

- 50 ligación del extremo 3' de A_1 al extremo 5' de A_1 para formar una construcción circular; o
ligación del extremo 3' de A_1 al extremo 5' de una sonda de ligación de oligonucleótido C; y

(a) detectar una señal derivada de los productos de la etapa anterior, donde los productos son A_2 o una porción del mismo, o múltiples copias de A_2 o múltiples copias de una porción del mismo, e inferir de ello la presencia o ausencia de la secuencia objetivo del polinucleótido en el analito.

Los analitos a los que se puede aplicar el método de la invención son aquellos ácidos nucleicos, tales como moléculas de ADN o ARN de origen natural o sintético, que incluyen las secuencia o secuencias de polinucleótidos objetivo que se buscan. En una realización, el analito estará típicamente presente en una solución acuosa que lo contiene y otro material biológico y en una realización el analito estará presente junto con otras moléculas de ácido nucleico de fondo que no son de interés para los fines de la prueba. En algunas realizaciones, el analito estará presente en cantidades bajas en relación con estos otros componentes de ácido nucleico. Preferiblemente, por ejemplo, cuando el analito se deriva de una muestra biológica que contiene material celular, antes de realizar la etapa (a) del método, algunos o todos estos otros ácidos nucleicos y material biológico extraño se habrán eliminado utilizando técnicas de preparación de muestras tales como filtración, centrifugación, cromatografía o electroforesis. Convenientemente, el analito se deriva de una muestra biológica tomada de un sujeto mamífero (especialmente un paciente humano) tal como sangre, plasma, esputo, orina, piel o una biopsia. En una realización, la muestra biológica se someterá a lisis para que el analito se libere mediante la ruptura de cualquier célula presente. En otras realizaciones, el analito ya puede estar presente en forma libre dentro de la propia muestra; por ejemplo, ADN fuera de las células que circula en sangre o plasma.

15 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Protocolos para métodos simplificados de detección de secuencias de polinucleótidos.

Figura 2: Un gráfico que compara el nivel de fluorescencia detectado (que representa la presencia de una secuencia de analito objetivo particular) cuando la etapa de digestión con exonucleasa 5'-3' ocurre durante la etapa de amplificación previa y cuando se mueve a la etapa de pirofosforólisis/ligación del protocolo (como en los protocolos 3-5). En este ejemplo, la exonucleasa 5'-3' es Lambda.

Figura 3: Los inventores han probado el método del Protocolo 3 de la presente invención utilizando una gama de diferentes enzimas PPL. La Figura 3 (A) muestra la detección de T790M del 1 % de MAF utilizando Mako, Klenow y Bsu. La Figura 3 (B) muestra la detección de T790M del 0.5 % de MAF usando Bst L.F. en un intervalo de diferentes concentraciones de Ppi. Las cuatro enzimas funcionaron muy bien incluso sin una optimización extendida.

Figura 4: Resultados para la detección de 1% de MAF, T790M, usando los métodos del Protocolo 4 de la presente invención usando cuatro diferentes enzimas pirofosforilizantes (PPL): Mako, Klenow, Bsu y Bst L.F..

Figura 5: Gráficos que muestran el nivel de fluorescencia detectado (que representa la presencia de una secuencia de analito objetivo particular) del_6223 en el Exon19 de 0.5 %, 0.10 % y 0.05 % de MAF detectado según el Protocolo 1 y el Protocolo 4.

Figura 6: Los inventores han detectado T790M en el exón 20 del EGFR en 0.10 %, 0.50 % y 1 % de MAF de acuerdo con el Protocolo 4.

Figura 7: Muestra la detección de T790M en el exón 20 del EGFR en 1% de MAF con y sin la presencia de una exonucleasa en la etapa de RCA.

Figura 8: Los inventores han investigado qué efecto tiene la relación de la mezcla PPL:RCA sobre la intensidad de la señal detectada para el para T790M en el exón 20 del EGFR en 0.5 % de MAF, cuyos resultados se muestran en la Fig. 8. Como se puede observar, una relación de mezcla de PPL:RCA 1:2 da como resultado la intensidad de señal más baja pero en el punto de tiempo más temprano. A esto le sigue de cerca en el tiempo la mezcla de PPL:RCA 1:4 que tiene una mayor intensidad de señal. La mayor intensidad de señal se observa para la mezcla de PPL:RCA 1:8 en el último momento de la reacción.

Figura 9: Muestra los resultados de los experimentos de comparación realizados de acuerdo con el Protocolo 4 utilizando SYBER Green I (50 °C y 60 °C) y Syto82 (50 °C y 60 °C).

Figura 10: Los inventores han investigado el uso de dos enzimas diferentes, BST L.F y BST 2.0 WS, para RCA de acuerdo con el Protocolo 4.

Figura 11: Los inventores han investigado el efecto de diferentes enzimas PPL en la reacción de RCA en diferentes proporciones de mezcla de reacción de PPL:RCA. Los resultados pueden observarse en la Fig. 11(A) PPL:RCA 1:4 y la Fig. 11(B) PPL:RCA 1:8. Todas las enzimas PPL impactan la reacción de RCA en una proporción de PPL:RCA 1:4, distinta de BST L.F. Con una relación de PPL:RCA 1:8, todas las enzimas, diferentes de BST L.F y Klenow, afectan la reacción de RCA.

Figura 12: Resultados de la medición de fluorescencia para el Ejemplo 11 que muestran que cuando están presentes los oligonucleótidos 3 y 4, la señal fluorescente aparece más rápido en la reacción, mostrando que se ha producido pirofosforólisis y ligación del oligonucleótido 3 en la primera mezcla de reacción.

Descripción de realizaciones.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar una secuencia de polinucleótidos objetivo en un analito de ácido nucleico dado presente en una muestra, comprendiendo el método las etapas de:

ES 2 924 953 T3

- (a) introducir uno o más analitos de ácido nucleico en una primera mezcla de reacción que comprende:
- i. una oligonucleótido sonda A_0 de cadena sencilla;
 - ii. una enzima de pirofosforólisis; y
 - iii. una ligasa
- 5 donde el analito se hibrida con la oligonucleótido sonda A_0 de cadena sencilla para crear un primer producto intermedio que sea al menos parcialmente de cadena doble y donde el extremo 3' de A_0 forma un complejo de doble cadena con la secuencia objetivo del analito y donde A_0 se pirofosforoliza en la dirección 3'-5' desde el extremo 3' para crear al menos una cadena de A_1 parcialmente digerida y A_1 se somete a ligación usando una férula para formar A_2 , donde la férula incluye el polinucleótido objetivo o un oligonucleótido D, y donde someterse a ligación incluye:
- 10 - ligación del extremo 3' de A_1 al extremo 5' de A_1 para formar una construcción circular; o
- ligación del extremo 3' de A_1 al extremo 5' de una sonda de ligación de oligonucleótido C; y
- (b) detectar una señal derivada de los productos de la etapa anterior, donde los productos son A_2 o una porción del mismo, o múltiples copias de A_2 o múltiples copias de una porción del mismo, e inferir de ello la presencia o ausencia de la secuencia objetivo del polinucleótido en el analito.
- 15 En algunas realizaciones, la primera mezcla de reacción comprende además una fuente de iones pirofosfato.
- En algunas realizaciones, la primera mezcla de reacción comprende además al menos un oligonucleótido cebador de cadena sencilla que es sustancialmente complementario a una porción de A_0 y trifosfatos de desoxirribonucleótido (dNTP).
- En algunas realizaciones, la primera mezcla de reacción comprende además una enzima de amplificación.
- 20 En algunas realizaciones, los productos de la etapa (a) se introducen en una segunda mezcla de reacción antes de la etapa (b), comprendiendo dicha segunda mezcla de reacción al menos un oligonucleótido cebador de cadena sencilla y dNTP.
- En algunas realizaciones, la segunda mezcla de reacción comprende además una enzima de amplificación.
- 25 En algunas realizaciones, se pueden introducir uno o más analitos de ácido nucleico en una primera y segunda mezcla de reacción al mismo tiempo.
- En algunas realizaciones, se pueden introducir uno o más analitos de ácido nucleico en una primera y segunda mezcla de reacción consecutivamente.
- En algunas realizaciones, los dNTP son dNTP de arranque en caliente.
- 30 En algunas realizaciones, durante la etapa (a) el analito se hibrida con un oligonucleótido sonda A_0 de cadena sencilla para crear un primer producto intermedio que sea al menos parcialmente de cadena doble y en el que el extremo 3' de A_0 forma un complejo de doble cadena con la secuencia objetivo del analito.
- En algunas realizaciones, durante la etapa (a) el primer producto intermedio se pirofosforoliza en la dirección 3'-5' desde el extremo 3' de A_0 para crear la cadena de A_1 parcialmente digerida y el analito.
- 35 En algunas realizaciones, la primera mezcla de reacción comprende además un oligonucleótido sonda C de ligación y la cadena de A_1 parcialmente digerida se liga en el extremo 3' al extremo 5' de C para crear un oligonucleótido A_2 .
- En algunas realizaciones, la cadena de A_1 parcialmente digerida se ciclizaba mediante la ligación de sus extremos 3' y 5'.
- En algunas realizaciones, la ligación de A_1 ocurre:
- durante la etapa (a); o
- 40 durante la etapa (b); o
- entre las etapas (a) y (b).
- En algunas realizaciones, la primera mezcla de reacción comprende además una exonucleasa 5'-3' y el extremo 5' de A_0 se vuelve resistente a la digestión con exonucleasa 5'-3'.
- 45 En algunas realizaciones, después de la amplificación del analito dado de ácido nucleico y antes de la adición de la primera mezcla de reacción (etapa (a)), la muestra se trata adicionalmente con una proteinasa.

- En algunas realizaciones, la primera mezcla de reacción comprende además una fosfatasa o fosfohidrolasa.
- En algunas realizaciones, antes o durante la etapa (b), los productos de la etapa anterior se tratan con una pirofosfatasa.
- 5 En algunas realizaciones, antes o durante la etapa (b), los productos de la etapa anterior se tratan con una exonucleasa.
- En algunas realizaciones, el oligonucleótido C comprende además una modificación 3' o interna que lo protege de la digestión con exonucleasa 3'-5'.
- En algunas realizaciones, el oligonucleótido C comprende además una modificación 5' que lo protege de la digestión con exonucleasa 5'-3'.
- 10 En algunas realizaciones, la primera o la segunda mezcla de reacción comprende además un oligonucleótido fórmula D.
- En algunas realizaciones, D comprende una región de oligonucleótidos complementaria al extremo 3' de A₁ y una región complementaria al extremo 5' del oligonucleótido C o al extremo 5' de A₁.
- 15 En algunas realizaciones, D no puede someterse a extensión contra A₁ en virtud de una modificación 3' o por una falta de coincidencia entre el extremo 3' de D y la región correspondiente de A₁.
- En algunas realizaciones, la enzima que realiza la pirofosforólisis de A₀ para formar la cadena de A₁ parcialmente digerida también amplifica A₂.
- En algunas realizaciones, la detección se logra usando uno o más colorantes de unión fluorescentes de oligonucleótidos o sondas moleculares.
- 20 En algunas realizaciones, un aumento en la señal a lo largo del tiempo como resultado de la generación de amplicones de A₂ se utiliza para inferir la concentración de la secuencia objetivo en el analito.
- En algunas realizaciones, múltiples sondas A₀ se emplean, cada una selectiva para una secuencia objetivo diferente y cada una incluye una región de identificación, y se caracteriza además porque los amplicones derivados de A₂ incluyen esta región de identificación y, por lo tanto, las secuencias objetivo presentes en el analito se infieren a través de la detección de la región o regiones de identificación.
- 25 En algunas realizaciones, la detección de la región o regiones de identificación se lleva a cabo utilizando sondas moleculares o mediante secuenciación.
- En algunas realizaciones, la etapa final del método comprende además las etapas de:
- 30 i. marcar los productos de la etapa (b) usando uno o más colorantes de unión fluorescentes de oligonucleótidos o sondas moleculares;
- ii. medir la señal fluorescente de los productos;
- iii. exponer los productos a un conjunto de condiciones desnaturalizantes; e
- identificar la secuencia objetivo del polinucleótido en el analito monitorizando los cambios en la señal fluorescente de los productos durante la exposición a las condiciones desnaturalizantes.
- 35 En algunas realizaciones, uno o más analitos de ácido nucleico se dividen en múltiples volúmenes de reacción, teniendo cada volumen una o más oligonucleótidos sonda A₀, introducidos para detectar diferentes secuencias objetivo.
- En algunas realizaciones, las diferentes sondas A₀ comprenden sitios de cebado comunes, lo que permite usar un solo cebador o conjunto de cebadores para la amplificación de una región de A₂.
- 40 En algunas realizaciones, se proporciona un método para detectar una secuencia de polinucleótidos objetivo en un analito de ácido nucleico dado presente en una muestra, comprendiendo el método las etapas de:
- (a) amplificar un analito de ácido nucleico dado presente en la muestra;
- (b) introducir los productos de la etapa (a) a una primera mezcla de reacción que comprende:
- 45 i. un oligonucleótido sonda A₀ de cadena sencilla;
- ii. una enzima de pirofosforólisis; y

iii. una ligasa

en donde A_0 se pirofosforoliza en la dirección 3'-5' desde el extremo 3' para crear al menos una cadena de A_1 parcialmente digerida y A_1 experimenta una ligación para formar A_2 ;

- 5 (c) detectar una señal derivada de los productos de la etapa anterior, donde los productos son A_2 o una porción del mismo, o múltiples copias de A_2 o múltiples copias de una porción del mismo, e inferir de ello la presencia o ausencia de la secuencia objetivo del polinucleótido en el analito.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para detectar una secuencia de polinucleótidos objetivo en un analito de ácido nucleico dado presente en una muestra, comprendiendo el método las etapas de:

(a) introducir uno o más analitos de ácido nucleico en una primera mezcla de reacción que comprende:

- 10 i. un oligonucleótido sonda A_0 de cadena sencilla;

ii. una enzima de pirofosforolisis; y

iii. una ligasa;

- 15 donde el analito se hibrida con el oligonucleótido sonda A_0 de cadena sencilla para crear un primer producto intermedio que sea al menos parcialmente de cadena doble y donde el extremo 3' de A_0 forma un complejo de doble cadena con la secuencia objetivo del analito y donde A_0 se pirofosforoliza en la dirección 3'-5' desde el extremo 3' para crear al menos una cadena de A_1 parcialmente digerida y A_1 experimenta ligación para formar A_2 ;

(b) detectar una señal derivada de los productos de la etapa anterior, donde los productos son A_2 o una porción del mismo, o múltiples copias de A_2 o múltiples copias de una porción del mismo, e inferir de ello la presencia o ausencia de la secuencia objetivo del polinucleótido en el analito.

- 20 En algunas realizaciones, la primera mezcla de reacción comprende además una fuente de iones pirofosfato.

En algunas realizaciones, la primera mezcla de reacción comprende además al menos un oligonucleótido cebador de cadena sencilla que es sustancialmente complementario a una porción de A_0 y trifosfatos de desoxirribonucleótidos (dNTP).

- 25 En algunas realizaciones, los productos de la etapa (a) se introducen en una segunda mezcla de reacción antes de la etapa (b), comprendiendo dicha segunda mezcla de reacción al menos un oligonucleótido cebador de cadena sencilla y dNTP.

En algunas realizaciones, la cadena de A_1 parcialmente digerida se cicla a través de la ligación de sus extremos 3' y 5' para crear un oligonucleótido A_2 .

- 30 En algunas realizaciones, la primera mezcla de reacción comprende además un oligonucleótido sonda C de ligación y la cadena de A_1 parcialmente digerida se liga en el extremo 3' al extremo 5' de C para crear un oligonucleótido A_2 .

En algunas realizaciones, la ligación ocurre:

durante la etapa (a); o

durante la etapa (b); o

entre las etapas (a) y (b).

- 35 En algunas realizaciones, la primera mezcla de reacción comprende además una exonucleasa 5'-3' y donde el extremo 5' de A_0 se vuelve resistente a la digestión con exonucleasa 5'-3'.

En algunas realizaciones, la primera mezcla de reacción comprende además una fosfatasa o fosfohidrolasa.

En algunas realizaciones, antes o durante la etapa (b), los productos de la etapa anterior se tratan con al menos uno de: una pirofosfatasa o una exonucleasa.

- 40 En algunas realizaciones, el oligonucleótido C comprende además una modificación 3' o interna que lo protege de la digestión con exonucleasa 3'-5'.

En algunas realizaciones, la primera o segunda mezcla de reacción comprende además un oligonucleótido férula D que comprende una región de oligonucleótido complementaria al extremo 3' de A_1 y una región complementaria al extremo 5' del oligonucleótido C o al extremo 5' de A_1

- 45 En algunas realizaciones, la enzima que realiza la pirofosforólisis de A_0 para formar la cadena de A_1 parcialmente digerida también amplifica A_2 .

En algunas realizaciones, la detección se logra usando uno o más colorantes de unión fluorescentes de oligonucleótidos o sondas moleculares y en donde un aumento en la señal a lo largo del tiempo como resultado de la generación de amplicones de A_2 se utiliza para inferir la concentración de la secuencia objetivo en el analito.

5 En algunas realizaciones, se emplean múltiples sondas A_0 , cada una selectiva para una secuencia objetivo diferente y cada una incluye una región de identificación, y se caracteriza además porque los amplicones de A_2 incluyen esta región de identificación y, por lo tanto, las secuencias objetivo presentes en el analito, se infieren a través de la detección de la región o regiones de identificación.

En algunas realizaciones, la detección de la región o regiones de identificación se lleva a cabo utilizando sondas moleculares o mediante secuenciación.

10 En algunas realizaciones, la etapa final del método comprende además las etapas de:

i. marcar los productos de la etapa (b) usando uno o más colorantes de unión fluorescentes de oligonucleótidos o sondas moleculares;

ii. medir la señal fluorescente de los productos;

iii. exponer los productos a un conjunto de condiciones desnaturalizantes; e

15 identificar la secuencia objetivo del polinucleótido en el analito monitorizando los cambios en la señal fluorescente de los productos durante la exposición a las condiciones desnaturalizantes.

En algunas realizaciones, uno o más analitos de ácido nucleico se dividen en múltiples volúmenes de reacción, teniendo cada volumen uno o más oligonucleótido sonda A_0 , introducidos para detectar diferentes secuencias objetivo.

20 En algunas realizaciones, las diferentes sondas A_0 comprenden un sitio de cebado común, lo que permite usar un solo cebador o conjunto de cebadores para la amplificación.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan métodos para detectar una secuencia de polinucleótidos objetivo en un analito de ácido nucleico dado. Los analitos a los que pueden aplicarse los diversos métodos de la invención pueden prepararse a partir de la muestra biológica mencionada anteriormente mediante una serie de etapas preliminares diseñadas para amplificar el analito y separarlo del ADN genómico de fondo que normalmente está presente en un exceso significativo. Este método es generalmente aplicable a la producción de analitos objetivo de cadena sencilla y, por lo tanto, es útil en situaciones distintas de cuando se integra con o comprende además parte del método del primer aspecto de la invención. En consecuencia, se proporciona un método para preparar al menos un analito de cadena sencilla de un ácido nucleico compuesto por una región polinucleotídica objetivo caracterizado por las etapas de (1) producir amplicones del analito o analitos sometiendo una muestra biológica compuesta por el analito o analitos y, opcionalmente, ADN genómico de fondo a ciclos de amplificación. En una realización preferida, la amplificación se lleva a cabo utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en presencia de una polimerasa, trifosfatos de nucleósidos y al menos un par de cebadores correspondientes donde uno de los cebadores incluye un grupo bloqueador de exonucleasa 5'-3' y (2) opcionalmente digerir el producto de la etapa (1) con una exonucleasa que tiene actividad exonucleolítica 5'-3'. En una realización, el método puede comprender además (3) hacer reaccionar el producto de la etapa (2) con una proteinasa para destruir la polimerasa y luego (4) desactivar la proteinasa calentando el producto de la etapa (3) a una temperatura superior a 50 °C.

25

30

35

En una realización preferida, las etapas (1) a (4) se llevan a cabo antes de la etapa (a) del método del primer aspecto de la invención para producir un método integrado para detectar secuencias objetivo derivadas de una muestra biológica. En otra realización, la muestra biológica ha sufrido lisis celular antes de llevar a cabo la etapa (1).

40 En algunas realizaciones de la etapa (1), los trifosfatos de nucleósidos son una mezcla de los cuatro trifosfatos de desoxinucleósidos característicos del ADN natural. En una realización preferida, la mezcla de trifosfatos de desoxinucleósidos comprende trifosfato de desoxiuridina (dUTP) en lugar de trifosfato desoxitimidina (dTTP) y la etapa (1) se lleva a cabo además en presencia de la enzima dUTP-ADN glicosasa (UDG) para eliminar cualquier amplicón contaminante de ensayos anteriores. En otra realización más, se usa una polimerasa de alta fidelidad en la etapa (1), por ejemplo, una de las vendidas con el nombre comercial Phusion® o Q5.

45

En algunas realizaciones, los trifosfatos de nucleósidos son una mezcla de trifosfatos de desoxinucleósidos sintéticos o modificados.

En algunas realizaciones, los trifosfatos de nucleósidos son una mezcla de los cuatro trifosfatos de desoxinucleósidos y trifosfatos de desoxinucleótidos sintéticos o modificados.

50 En algunas realizaciones, la etapa (1) se lleva a cabo utilizando una cantidad limitada de cebador y un exceso de ciclos de amplificación. De esta forma se produce una cantidad fija de amplicones independientemente de la cantidad inicial de analito. Por lo tanto, se evita la necesidad de cuantificar el analito antes de las etapas posteriores. En otra realización de la etapa (1), que tiene la ventaja de obviar la necesidad de la etapa (2), la amplificación se lleva a cabo

en presencia de un par de cebadores donde uno de los dos cebadores está presente en exceso sobre el otro, dando como resultado generación de amplicones de cadena sencilla una vez que se utiliza completamente un cebador.

5 En una realización preferida de la etapa (2), el cebador 5' se bloquea con un grupo bloqueador de exonucleasa seleccionado de enlaces fosforotioato, bases invertidas, espaciadores de ADN y otras modificaciones de oligonucleótidos comúnmente conocidas en la técnica. En otra realización, el otro cebador del par tiene un grupo fosfato en su extremo 5'.

10 En algunas realizaciones, en la etapa (3) la proteinasa empleada es la proteinasa K y la etapa (4) se lleva a cabo calentando a una temperatura de 80 °C a 100 °C por hasta 30 minutos. En una realización, en la etapa (3) la proteinasa empleada es la proteinasa K, la etapa (3) se lleva a cabo calentando a una temperatura de 55 °C durante 5 minutos y se realiza la etapa (4) calentando a una temperatura de 95 °C durante 10 minutos. En otra realización, en algún momento después de la etapa (2), el medio de reacción se trata con una fosfatasa o fosfodihidrolasa para eliminar cualquiera de los trifosfatos de nucleósidos residuales que puedan estar presentes.

15 En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos objetivo en el analito será un gen o región cromosómica dentro del ADN o ARN de una célula tumoral cancerosa y se caracterizará por la presencia de una o más mutaciones; por ejemplo, en forma de uno o más polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Por lo tanto, la invención será útil en la monitorización y/o tratamiento de la recurrencia de la enfermedad. Los pacientes que han sido declarados libres de enfermedad después del tratamiento pueden ser monitorizados a lo largo del tiempo para detectar la recurrencia de la enfermedad. Esto debe hacerse de forma no invasiva y requiere una detección sensible de las secuencias objetivo de las muestras de sangre. De manera similar, para algunos tipos de cáncer hay células cancerosas residuales que permanecen en el paciente después del tratamiento. La monitorización de los niveles de estas células (o ADN fuera de las células) presentes en la sangre del paciente, utilizando la presente invención, permite detectar la recurrencia de la enfermedad o el fracaso de la terapia actual y la necesidad de cambiar por una alternativa.

20 En algunas realizaciones, la detección de la secuencia de polinucleótidos objetivo permitirá repetir las pruebas de muestras de pacientes durante el tratamiento de la enfermedad para permitir la detección temprana de la resistencia desarrollada a la terapia. Por ejemplo, los inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), tales como gefitinib, erlotinib, se usan comúnmente como tratamientos de primera línea para el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Durante el tratamiento, el tumor a menudo desarrollará mutaciones en el gen del EGFR (por ejemplo, T790M, C797S) que le confieren resistencia al tratamiento. La detección temprana de estas mutaciones permite la transferencia del paciente a terapias alternativas.

25 En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos objetivo en el analito será un gen o región cromosómica dentro del ADN o ARN de origen fetal y se caracterizará por la presencia de una o más mutaciones; por ejemplo, en forma de uno o más polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Por lo tanto, la invención puede usarse para detectar mutaciones en fracciones alélicas muy bajas, en una etapa más temprana del embarazo que otras técnicas de prueba disponibles.

30 En otra realización, la secuencia de polinucleótidos objetivo puede ser un gen o una región genómica derivada de un individuo por lo demás sano, pero la información genética obtenida puede ayudar a generar valiosa información complementaria de diagnóstico que permita extraer conclusiones médicas o terapéuticas a través de uno o más grupos definidos dentro de la población humana.

35 En aún otra realización, la secuencia de polinucleótidos objetivo puede ser característica de una enfermedad infecciosa, o de la resistencia de una enfermedad infecciosa al tratamiento con ciertas terapias; por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos característica de un gen o una región cromosómica de una bacteria o un virus, o una mutación en el mismo que confiere resistencia a la terapia.

40 En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos objetivo puede ser característica del ADN del donante. Cuando el paciente rechaza un órgano trasplantado, el ADN de este órgano se vierte en el torrente sanguíneo del paciente. La detección temprana de este ADN permitiría la detección temprana del rechazo. Esto podría lograrse usando paneles personalizados de marcadores específicos del donante, o usando paneles de variantes conocidas por ser comunes en la población, algunas de las cuales estarán presentes en el donante y otras en el receptor. Por tanto, el método reivindicado permite la monitorización rutinaria de los receptores de órganos a lo largo del tiempo.

45 En otra realización más, se emplean en paralelo varias versiones del método que usan diferentes combinaciones de sondas (véase a continuación) de modo que el analito pueda detectarse simultáneamente en busca de múltiples secuencias objetivo; por ejemplo, fuentes de cáncer, indicadores de cáncer o múltiples fuentes de infección. En este enfoque, los productos amplificados obtenidos mediante la aplicación paralela del método se ponen en contacto con un panel de detección compuesto por uno o más colorantes de unión a oligonucleótidos o sondas moleculares específicas de secuencia, tal como una baliza molecular, una sonda de horquilla o similares. Por lo tanto, en otro aspecto de la invención se proporciona el uso de al menos una sonda y opcionalmente un oligonucleótido de ligación en combinación con una o más sondas químicas y biológicas selectivas para las secuencias de polinucleótidos objetivo o con el uso de secuenciación para identificar las regiones amplificadas de la sonda.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido sonda A₀ de cadena sencilla comprende una región de cebado y un extremo 3' que es complementario a la secuencia de polinucleótidos objetivo a detectar. De esta manera, se crea un primer producto intermedio que es al menos parcialmente de cadena doble. En una realización, esta etapa se lleva a cabo en presencia de un exceso de A₀ y en un medio acuoso que contiene el analito y cualquier otra molécula de ácido nucleico.

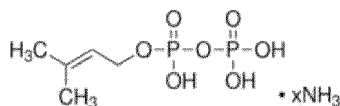
Durante la etapa (a), la región de doble cadena del primer producto intermedio se pirofosforoliza en la dirección 3'-5' desde el extremo 3' de su cadena de A₀. En consecuencia, la cadena de A₀ se digiere progresivamente para crear una cadena parcialmente digerida; en lo sucesivo denominada A₁. Cuando el oligonucleótido sonda se hibrida erróneamente con una secuencia que no es la objetivo, la reacción de pirofosforólisis se detendrá ante cualquier falta de coincidencia, evitando que continúen las etapas posteriores del método. En otra realización, esta digestión continúa hasta que A₁ carece de complementariedad suficiente con el analito o una región objetivo del mismo para formar un dúplex estable. En este punto, las diversas cadenas se separan por fusión, produciendo así A₁ en forma de una cadena sencilla. En condiciones típicas de pirofosforólisis, esta separación se produce cuando hay entre 6 y 20 nucleótidos complementarios entre el analito y A₀.

Convenientemente, la pirofosforólisis se lleva a cabo en el medio de reacción a una temperatura en el intervalo de 20 a 90 °C en presencia de al menos una polimerasa que muestre actividad de pirofosforólisis y una fuente de ion pirofosfato. Se puede encontrar más información sobre la reacción de pirofosforólisis aplicada a la digestión de polinucleótidos, por ejemplo, en J. Biol. Chem. 244 (1969) págs. 3019 - 3028 o nuestra solicitud de patente anterior.

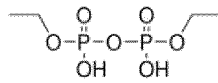
En algunas realizaciones, la etapa de pirofosforólisis está impulsada por la presencia de una fuente de polipirofosfato en exceso, incluyendo las fuentes adecuadas aquellos compuestos que contienen 3 o más átomos de fósforo.

En algunas realizaciones, la primera mezcla de reacción comprende una fuente de polipirofosfato en exceso.

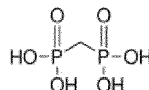
En algunas realizaciones, la etapa de pirofosforólisis está impulsada por la presencia de una fuente de pirofosfato modificado en exceso. Los pirofosfatos modificados adecuados incluyen aquellos con otros átomos o grupos sustituidos en lugar del oxígeno que forma puente, o pirofosfato (o polipirofosfato) con sustituciones o grupos modificadores en los otros oxígenos. El experto en la materia comprenderá que existen muchos ejemplos de pirofosfato modificado que serían adecuados para su uso en la presente invención, una selección no limitativa de los cuales son:



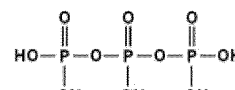
Sal de amonio de pirofosfato de γ,γ -dimetilalilo



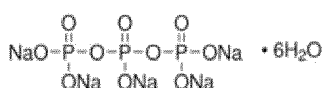
Pirofosfato de ácido dietílico



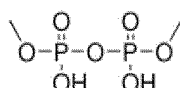
PCP



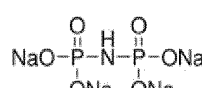
Ácido tripilifosfórico (PPPi)



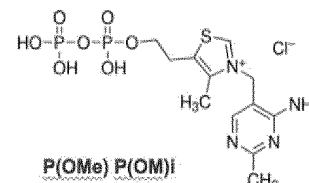
Tripilifosfato pentasódico hexahidratado



Pirofosfato de ácido dimetilico



PNP



P(OMe)P(OM)I

En algunas realizaciones, la primera mezcla de reacción comprende una fuente de polipirofosfato modificado en exceso.

En una realización preferida, la fuente de ión pirofosfato es PNP, PCP o Acido tripilifosfórico (PPPi).

Además, pero sin limitarse a ello, se pueden encontrar ejemplos de fuentes de ión pirofosfato para su uso en la etapa (b) de pirofosforólisis en los documentos WO2014/165210 y WO00/49180.

En algunas realizaciones, la fuente de pirofosfato modificado en exceso se puede representar como Y-H en donde Y corresponde a la fórmula general (X-O)₂P(=B)-(Z-P(=B)(O-X))_n donde n es un número entero de 1 a 4; cada Z se selecciona independientemente de -O-, -NH- o -CH₂-; cada B es independientemente O o S; los grupos X se seleccionan independientemente de -H-, -Na-, -K-, alquilo, alquenoilo o un grupo heterocíclico con la condición de que cuando Z y B correspondan a -O- y cuando n sea 1, al menos un grupo X no sea H

En algunas realizaciones, Y corresponde a la fórmula general (X-O)₂P(=B)-(Z-P(=B)(O-X))_n donde n es 1, 2, 3 o 4. En otra realización, el grupo Y corresponde a la fórmula general (X-O)₂P(=O)-Z-P(=O)(O-H)- donde uno de los grupos X es -H. En otra realización preferida, Y corresponde a la fórmula general (X-O)₂P(=O)-Z-P(=O)(O-X)- donde al menos uno de los grupos X se selecciona de metilo, etilo, alilo o dimetilalilo.

En una realización alternativa, Y corresponde a cualquiera de las fórmulas generales $(H-O)_2P(=O)-Z-P(=O)(O-H)-$ donde Z es $-NH-$ o $-CH_2-$ o $(X-O)_2P(=O)-Z-P(=O)(O-X)-$ donde los grupos X son todos Na o $-K$ y Z es $-NH-$ o $-CH_2-$.

En otra realización, Y corresponde a la fórmula general $(H-O)_2P(=B)-O-P(=B)(O-H)-$ donde cada grupo B es independientemente O o S, siendo al menos uno S.

5 Los ejemplos específicos de realizaciones preferidas de Y incluyen aquellos de fórmula $(X1-O)(HO)P(=O)-Z-P(=O)(O-X2)$ donde Z es O, NH o CH_2 y (a) X1 es γ,γ -dimetilalilo y X2 es $-H$; o (b) X1 y X2 son ambos metilo; o (c) X1 y X2 son ambos etilo; o (d) X1 es metilo y X2 es etilo o viceversa. En algunas realizaciones, donde se van a utilizar sondas moleculares para la detección, el oligonucleótido sonda A_0 está configurado para incluir una región de identificación de oligonucleótidos en el lado 5' de la región complementaria a la secuencia objetivo, y las sondas moleculares
10 empleadas están diseñadas para hibridarse con esta región de identificación. En una realización, solo la región 3' de A_0 es capaz de hibridarse con el objetivo; es decir, cualquier otra región carece de complementariedad suficiente con el analito para que exista un dúplex estable a la temperatura a la que se lleva a cabo la etapa de pirofosforólisis. En el presente documento y en todas partes, por el término "suficiente complementariedad" se entiende que, en la medida en que una región dada tiene complementariedad con una región dada en el analito, la región de complementariedad
15 tiene más de 10 nucleótidos de largo.

En otro aspecto de los métodos de la divulgación, se proporcionan realizaciones alternativas en las que la etapa de fosforólisis de cualquier realización anterior se reemplaza con una etapa de digestión con exonucleasa utilizando una exonucleasa específica de doble cadena. El experto en la materia entenderá que las exonucleasas específicas de
20 doble cadena incluyen aquellas que se leen en la dirección 3'-5', tales como ExoIII, y aquellas que se leen en la dirección 5'-3', tales como Lambda Exo, entre muchas otras.

En algunas realizaciones de la divulgación en las que la etapa de digestión con exonucleasa utiliza una exonucleasa 5'-3' específica de doble cadena, es el extremo 5' de A_0 que es complementario al analito objetivo y la secuencia de cebado común y el grupo de bloqueo están ubicados en el lado 3' de la región complementaria al objetivo. En una realización adicional, donde se van a utilizar sondas moleculares para la detección del oligonucleótido sonda A_0 está configurado para incluir una región de identificación de oligonucleótidos en el lado 3' de la región complementaria a la
25 secuencia objetivo, y las sondas moleculares empleadas están diseñadas para hibridarse con esta región de identificación.

En realizaciones de la divulgación en las que la etapa de digestión con exonucleasa utiliza una exonucleasa 5'-3' específica de doble cadena, se puede agregar opcionalmente una exonucleasa que tiene actividad exonucleolítica de 3' a 5' a la primera mezcla de reacción con el fin de digerir cualquier otra molécula de ácido nucleico presente mientras salen de A_0 y cualquier material que comprenda la cadena de A_1 parcialmente digerida intacta. Convenientemente, esta resistencia a la exonucleólisis se logra como se describe en otra parte de esta solicitud.

En una realización preferible de la divulgación, el extremo 5' de A_0 o un sitio interno en el lado 5' de la región de cebado se vuelve resistente a la exonucleólisis. De esta forma y después o simultáneamente con la etapa de pirofosforólisis, se puede añadir opcionalmente al medio de reacción una exonucleasa con actividad exonucleolítica 5'-3' con el fin de digerir cualquier otra molécula de ácido nucleico presente dejando A_0 y cualquier material que comprenda la cadena de A_1 parcialmente digerida intacta. Convenientemente, esta resistencia a la exonucleólisis se logra introduciendo uno o más grupos de bloqueo en el oligonucleótido A_0 en el punto requerido. En una realización, estos grupos de bloqueo pueden seleccionarse de enlaces fosforotioato y otras modificaciones de la cadena principal comúnmente utilizadas en la técnica, espaciadores C3, grupos fosfato, bases modificadas y similares.

En algunas realizaciones, la región de identificación comprenderá o estará incrustada dentro de una región de código de barras que tiene una secuencia única y está adaptada para identificarse indirectamente usando una sonda molecular específica de secuencia aplicada a los componentes A_2 amplificados o directamente por la secuenciación de estos componentes. Los ejemplos de sondas moleculares que se pueden usar incluyen, entre otros, balizas moleculares, sondas TaqMan[®], sondas Scorpion[®] y similares.

En todas las realizaciones, la cadena de A_2 o una región deseada de la misma experimenta una amplificación de manera que se hagan múltiples, típicamente muchos millones, de copias. Esto se logra cebando una región de A_2 y posteriormente cualquier amplificación derivado de la misma con oligonucleótidos cebadores de cadena sencilla, proporcionados, por ejemplo, en forma de un par directo/inverso o sentido/antisentido, que puede hibridarse con una
50 región complementaria en el mismo. La cadena cebada se convierte entonces en el punto de origen de la amplificación. Los métodos de amplificación incluyen, pero no se limitan a, ciclos térmicos y métodos isotérmicos tales como la reacción en cadena de la polimerasa, la amplificación de la recombinasa polimerasa y la amplificación del círculo rodante; el último de estos siendo aplicable cuando A_2 está ciclado. Por cualquiera de estos medios, muchas copias de amplificación de una región de A_2 y en algunos casos se puede crear rápidamente su complemento de secuencia. Las metodologías exactas para realizar cualquiera de estos métodos de amplificación serán bien conocidas por los expertos en la materia y las condiciones exactas y los regímenes de temperatura empleados están fácilmente disponibles en la literatura general a la que se dirige el lector. En concreto, en el caso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la metodología generalmente comprende extender el oligonucleótido cebador contra la cadena de A_2 en la dirección 5'-3' usando una polimerasa y una fuente de varios trifosfatos de nucleósidos simples hasta que se
55

produzca una cadena complementaria; deshibridar el producto de cadena doble producido para regenerar la cadena de A_2 y la cadena complementaria; volver a cebar la cadena de A_2 y cualquiera de sus amplicones y luego repetir estas etapas de extensión/deshibridación/recebado varias veces para acumular una concentración de amplicones de A_2 a un nivel donde puedan detectarse de forma fiable.

- 5 En algunas realizaciones, la primera mezcla de reacción comprende además un oligonucleótido C de sonda de ligación, y la cadena de A_1 parcialmente digerida está ligada en el extremo 3' al extremo 5' de C, mientras que en otra realización, A_1 se cicla por ligación de sus extremos 3' y 5';

en cada caso para crear un oligonucleótido A_2 .

En una realización, la ligación de A_1 ocurre:

- 10 durante la etapa (a); o
durante la etapa (b); o
entre las etapas (a) y (b).

En una realización, A_1 se extiende opcionalmente en dirección 5'-3' antes de la ligación.

- 15 En algunas realizaciones, esta extensión opcional y la ligación se realizan contra el oligonucleótido objetivo, mientras que en otra realización se realizan mediante la adición de un oligonucleótido férula D adicional con el cual se hibrida A_1 antes de la extensión y/o ligación. En una realización, D comprende una región de oligonucleótidos complementaria al extremo 3' de A_1 y una región complementaria al extremo 5' del oligonucleótido C o al extremo 5' de A_1 . En otra realización, D no puede extenderse contra A_1 en virtud de una modificación del extremo 3' o a través de una falta de coincidencia de nucleótidos entre el extremo 3' de D y la región correspondiente de A_1 .

- 20 En algunas realizaciones, la sonda de ligación C tiene una región 5' complementaria a al menos parte de una región del extremo 5' de un oligonucleótido férula D o al oligonucleótido objetivo. De esta manera, se forma un segundo producto intermedio en el que la cadena de A_2 está compuesta por A_1 , C y opcionalmente una región intermedia formada por extensión de A_1 en la dirección 5'-3' para encontrar el extremo 5' de C. En tal realización, los cebadores empleados en la etapa (c) (véase a continuación) se eligen para amplificar al menos una región de A_2 que incluye el sitio en el que ha ocurrido la ligación de A_1 con C. En esta realización, se ha encontrado que es ventajoso incluir un grupo de bloqueo de 3' en C para que se pueda usar una exonucleasa 3'-5' para digerir cualquier A_1 no ligado antes de la amplificación. Las polimerasas adecuadas que se pueden usar incluyen, entre otras, Hemo KlenTaq, Mako y el fragmento Stoffel.

- 30 En algunas realizaciones, la primera mezcla de reacción comprende además una fosfatasa o fosfohidrolasa para eliminar por hidrólisis los trifosfatos de nucleósidos producidos por la reacción de pirofosforólisis, asegurando así que la reacción de pirofosforólisis pueda continuar y no sea superada por la reacción de polimerización directa.

En algunas realizaciones, antes o durante la etapa (b), los productos de la etapa anterior se tratan con una pirofosfatasa para hidrolizar el ión pirofosfato, evitando que ocurra más pirofosforólisis y favoreciendo la reacción de polimerización directa.

- 35 En algunas realizaciones, antes o durante la etapa (b), los productos de la etapa anterior se tratan con una exonucleasa.

En algunas realizaciones, la enzima que realiza la pirofosforólisis de A_0 para formar la cadena de A_1 parcialmente digerida también amplifica A_2 . El experto en la materia apreciará que existen muchas enzimas de este tipo.

- 40 Los amplicones se detectan y la información obtenida se usa para inferir si la secuencia objetivo del polinucleótido está presente o ausente en el analito original y/o una propiedad asociada con el mismo. Por ejemplo, por este medio puede detectarse una secuencia objetivo característica de una célula tumoral cancerosa con referencia a los SNP específicos que se buscan. En otra realización, se puede detectar una secuencia objetivo característica del genoma de un virus de bacteria (incluyendo nuevas mutaciones del mismo). Se pueden emplear muchos métodos para detectar los amplicones o las regiones de identificación que incluyen, por ejemplo, un colorante de unión a oligonucleótidos, una sonda molecular específica de secuencia tal como una baliza molecular marcada con fluorescencia o una sonda de horquilla. Alternativamente, la secuenciación directa de los amplicones de A_2 se pueden realizar utilizando uno de los métodos de secuenciación directa empleados o informados en la técnica. Cuando se emplean colorantes de unión a oligonucleótidos, balizas o sondas marcadas con fluorescencia, es conveniente detectar los amplicones utilizando una disposición que comprenda una fuente de radiación electromagnética estimulante (láser, LED, lámpara, etc.) y un fotodetector dispuesto para detectar la luz fluorescente emitida y generar de ahí una señal que comprende un flujo de datos que puede ser analizado por un microprocesador o un ordenador usando algoritmos diseñados específicamente.

- 50 En algunas realizaciones, la detección se logra usando uno o más colorantes de unión fluorescentes de oligonucleótidos o sondas moleculares. En tales realizaciones, un aumento en la señal a lo largo del tiempo como

resultado de la generación de amplicones de A_2 se utiliza para inferir la concentración de la secuencia objetivo en el analito. En una realización, la etapa final del método comprende además las etapas de:

i. marcar los productos de la etapa (b) usando uno o más colorantes de unión fluorescentes de oligonucleótidos o sondas moleculares;

5 ii. medir la señal fluorescente de los productos;

iii. exponer los productos a un conjunto de condiciones desnaturalizantes; e

identificar la secuencia objetivo del polinucleótido en el analito monitorizando los cambios en la señal fluorescente de los productos durante la exposición a las condiciones desnaturalizantes.

10 En algunas realizaciones, se emplean múltiples sondas A_0 , cada una selectiva para una secuencia objetivo diferente y cada una incluye una región de identificación, y se caracteriza además porque los amplicones de A_2 incluyen esta región de identificación y, por lo tanto, las secuencias objetivo presentes en el analito se infieren a través de la detección de la región o regiones de identificación. En dichas realizaciones, la detección de la región o regiones de identificación se lleva a cabo utilizando sondas moleculares o mediante secuenciación.

15 En algunas realizaciones, uno o más analitos de ácido nucleico se dividen en múltiples volúmenes de reacción, cada volumen tiene uno o más oligonucleótido sonda A_0 , introducidos para detectar diferentes secuencias objetivo.

En algunas realizaciones, en donde se utilizan diferentes sondas A_0 , las diferentes sondas A_0 comprenden uno o más sitios de cebado comunes, lo que permite usar un solo cebador o un solo conjunto de cebadores para la amplificación.

20 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para identificar una secuencia de polinucleótidos objetivo en un analito de ácido nucleico dado, caracterizado por las etapas de cualquier realización anterior de la invención, donde las múltiples copias de A_2 , o una región de A_2 , se marcan usando uno o más colorantes de unión fluorescentes de oligonucleótidos o sondas moleculares. La señal fluorescente de estas múltiples copias se mide y las múltiples copias se exponen a un conjunto de condiciones desnaturalizantes. La secuencia de polinucleótidos objetivo se identifica monitorizando un cambio en la señal fluorescente de las múltiples copias durante la exposición a las condiciones desnaturalizantes.

25 En algunas realizaciones, las condiciones de desnaturalización pueden proporcionarse variando la temperatura, por ejemplo, aumentando la temperatura hasta un punto donde la doble cadena comienza a disociarse. Adicional o alternativamente, las condiciones desnaturalizantes también pueden proporcionarse variando el pH de manera que las condiciones sean ácidas o alcalinas, o agregando aditivos o agentes tales como un ácido o base fuerte, una sal inorgánica concentrada o un disolvente orgánico, por ejemplo, alcohol.

30 En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de los métodos descritos anteriormente para detectar sujetos mamíferos, especialmente pacientes humanos, para determinar la presencia de enfermedades infecciosas, cáncer o con el fin de generar información de diagnóstico complementaria.

35 En otro aspecto de la divulgación, se proporcionan sondas de control para uso en los métodos descritos anteriormente. Las realizaciones de la divulgación actual incluyen aquellas en las que la presencia de una secuencia o secuencias objetivo específicas se aclara mediante la generación de una señal fluorescente. En tales realizaciones, inevitablemente puede haber un nivel de señal generada a partir de ADN no objetivo presente en la muestra. Para una muestra dada, esta señal de fondo tiene un inicio posterior a la señal 'verdadera', pero este inicio puede variar entre muestras. La detección precisa de la presencia de bajas concentraciones de la secuencia o secuencias objetivo depende, por lo tanto, del conocimiento de qué señal se espera en su ausencia. Para las muestras artificiales hay referencias disponibles, pero para las verdaderas muestras 'ciegas' de pacientes, este no es el caso. Las sondas de control (E_0) se utilizan para determinar el perfil de señal de fondo esperado para cada sonda de ensayo. La sonda de control se dirige a una secuencia que no se espera que esté presente en la muestra y la señal generada a partir de esta sonda se puede usar para inferir la tasa esperada de generación de señal de la muestra en ausencia de la secuencia objetivo.

45 Por lo tanto, se proporciona un método para detectar una secuencia de polinucleótidos objetivo en un analito de ácido nucleico dado de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente, caracterizado por las etapas de:

a. ya sea subsecuentemente o simultáneamente repitiendo las etapas de los métodos usando un segundo oligonucleótido sonda E_0 de cadena sencilla que tiene una región del extremo 3' que no coincide al menos parcialmente con la secuencia objetivo, ya sea usando una alícuota separada de la muestra o en la misma alícuota y usando un segundo canal de detección;

50 b. inferir la señal de fondo que se espera que se genere a partir de A_0 en ausencia de cualquier analito objetivo en la muestra; y

c. a través de la comparación de la señal de fondo esperada inferida en (a) con la señal real observada en presencia del analito objetivo infiriendo la presencia o ausencia de la secuencia objetivo del polinucleótido en el analito.

En algunas realizaciones, la sonda de control (E_0) y A_0 se agregan a porciones separadas de la muestra mientras que en otra realización el E_0 y A_0 se agregan a la misma porción de la muestra y se usan diferentes canales de detección (por ejemplo, colorantes de diferentes colores) para medir sus respectivas señales.

5 La señal generada por E_0 luego se puede utilizar para inferir y corregir la señal de fondo que se espera que sea generada por A_0 en ausencia de la secuencia objetivo del polinucleótido en la muestra.

Por ejemplo, una corrección de la señal de fondo puede implicar la sustracción de la señal observada de E_0 de aquella observada de A_0 , o mediante la calibración de la señal observada de A_0 usando una curva de calibración de las señales relativas generadas por A_0 y E_0 bajo condiciones variables.

10 En algunas realizaciones, una sola E_0 se puede utilizar para calibrar todas las sondas de ensayo que se puedan producir.

En algunas realizaciones, una E_0 separada puede usarse para calibrar cada amplicón de la muestra de ADN generada en una etapa de amplificación inicial. Cada amplicón puede contener múltiples mutaciones/secuencias objetivo de interés, pero una sola E_0 será suficiente para calibrar todas las sondas de ensayo frente a un único amplicón.

15 En otra realización, una E_0 separada puede usarse para cada secuencia objetivo. Por ejemplo, si el objetivo es una mutación C>T, una E_0 podría diseñarse para que dirija una mutación C>G en el mismo sitio que no se sabe que ocurre en los pacientes. El perfil de señal generado por E_0 bajo diversas condiciones se puede evaluar en reacciones de calibración y estos datos se utilizan para inferir la señal esperada de la sonda de ensayo dirigida a la variante C>T cuando esta variante no está presente.

20 La especificidad de los métodos de la divulgación actual se puede mejorar bloqueando al menos una porción del ADN de tipo silvestre, promoviendo la hibridación de A_0 sólo con las secuencias de polinucleótidos objetivo. Los oligonucleótidos de bloqueo se pueden utilizar para mejorar la especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La técnica general utilizada consiste en diseñar un oligonucleótido que se hibrida entre los cebadores de la PCR y no puede ser desplazado ni digerido por la polimerasa de la PCR. El oligonucleótido está diseñado para hibridarse con la secuencia no objetivo (generalmente sana), mientras que exista una falta de coincidencia (a menudo por una sola base) con la secuencia objetivo (mutante). Este falta de coincidencia da como resultado una temperatura de fusión diferente frente a las dos secuencias, estando diseñado el oligonucleótido para permanecer hibridado con la secuencia no objetivo a la temperatura de extensión de la PCR mientras se disocia de la secuencia objetivo.

25 Los oligonucleótidos de bloqueo a menudo pueden tener modificaciones para evitar su digestión por la actividad exonucleasa de la polimerasa de la PCR, o para mejorar la diferencia de temperatura de fusión entre la secuencia objetivo y la no objetivo.

La incorporación de un ácido nucleico bloqueado (LNA) u otra modificación que altere la temperatura de fusión en un oligonucleótido de bloqueo puede aumentar significativamente la diferencia en la temperatura de fusión del oligonucleótido frente a las secuencias objetivo y no objetivo.

35 Por lo tanto, se proporciona una realización de la divulgación en la que se utilizan oligonucleótidos de bloqueo. Los oligonucleótidos de bloqueo deben ser resistentes a la reacción de pirofosforólisis (PPL) para garantizar que no sean digeridos o desplazados. Esto se puede lograr de varias formas diferentes, por ejemplo, a través de faltas de coincidencia en sus extremos 3' o mediante modificaciones tales como enlaces fosforotioato o espaciadores.

40 En tales realizaciones o en un aspecto de la presente divulgación donde se usan oligonucleótidos de bloqueo, el método para detectar una secuencia de polinucleótidos objetivo en un analito de ácido nucleico dado se caracteriza por hibridar oligonucleótidos de bloqueo de cadena sencilla con al menos un subconjunto de secuencias de polinucleótidos no objetivo antes o durante la misma etapa donde la secuencia objetivo del analito se hibrida con un oligonucleótido sonda A_0 de cadena sencilla para crear un primer producto intermedio que sea al menos parcialmente de cadena doble y en el que el extremo 3' de A_0 forma un complejo de doble cadena con la secuencia objetivo del analito.

45 En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de bloqueo se hacen resistentes a la reacción de pirofosforólisis a través de faltas de coincidencia en sus extremos 3'. En otra realización, los oligonucleótidos de bloqueo se hacen resistentes mediante la presencia de un grupo de bloqueo en 3'. En otra realización, los oligonucleótidos de bloqueo se hacen resistentes mediante la presencia de espaciadores u otras modificaciones internas. En una realización adicional, los oligonucleótidos de bloqueo incluyen una modificación que aumenta la temperatura de fusión o una base de nucleótido modificada y se vuelven resistentes a la pirofosforólisis.

50 Las referencias en el presente documento a "enzimas fosfatasa" se refieren a cualquier enzima, o fragmentos funcionales de las mismas, con la capacidad de eliminar por hidrólisis los trifosfatos de nucleósidos producidos por los métodos de la presente invención. Esto incluye cualquier enzima, o fragmentos funcionales de la misma, con la capacidad de escindir un monoéster de ácido fosfórico en un ion fosfato y un alcohol.

Las referencias en el presente documento a "enzimas pirofosfatasa" se refieren a cualquier enzima, o fragmentos funcionales de las mismas, con la capacidad de catalizar la conversión de un ion de pirofosfato en dos iones de fosfato.

Esto también incluye pirofosfatasas inorgánicas y difosfatasas inorgánicas. Un ejemplo no limitativo es el pirofosfato inorgánico termoestable (TIPP).

- 5 En algunas realizaciones se proporciona una versión modificada de cualquier realización descrita anteriormente en la que el uso de una pirofosfatasa es opcional.

En algunas realizaciones de la divulgación, se proporciona un kit que comprende:

(a) una oligonucleótido sonda A_0 de cadena sencilla, capaz de formar un primer producto intermedio con una secuencia de polinucleótidos objetivo, siendo dicho producto intermedio al menos parcialmente de cadena doble;

- 10 (b) una ligasa;

(c) una enzima pirofosforolizante capaz de digerir el primer producto intermedio en la dirección 3'-5' desde el extremo de A_0 para crear una cadena de A_1 parcialmente digerida;

(d) al menos un oligonucleótido cebador de cadena sencilla que es sustancialmente complementario a una porción de A_0 ;

- 15 (e) una enzima de amplificación; y

f) tampones adecuados.

En algunas realizaciones de la divulgación, se proporciona un kit para usar en un método de detección de una secuencia de polinucleótidos objetivo en un analito de ácido nucleico dado presente en una muestra, que comprende:

- 20 (g) un oligonucleótido sonda A_0 de cadena sencilla, capaz de formar un primer producto intermedio con una secuencia de polinucleótidos objetivo, siendo dicho producto intermedio al menos parcialmente de cadena doble;

(h) una ligasa;

(i) una enzima pirofosforolizante capaz de digerir el primer producto intermedio en la dirección 3'-5' desde el extremo de A_0 para crear una cadena de A_1 parcialmente digerida;

- 25 (j) al menos un oligonucleótido cebador de cadena sencilla que es sustancialmente complementario a una porción de A_0 ;

(k) una enzima de amplificación; y

(l) tampones adecuados.

En algunas realizaciones, el kit comprende además una fuente de ión pirofosfato.

La fuente o fuentes adecuadas de ion pirofosfato son las descritas previamente.

- 30 En algunas realizaciones, el kit comprende además controles positivos y negativos adecuados.

En algunas realizaciones, el kit puede comprender además una o más sondas de control (E_0) que son como se ha descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, el kit puede comprender además uno o más oligonucleótidos de bloqueo que son como se describieron previamente.

- 35 En algunas realizaciones, el kit puede comprender además una o más sondas de control (E_0) y uno o más oligonucleótidos bloqueantes.

En algunas realizaciones, el extremo 5' de A_0 puede volverse resistente a la digestión con exonucleasa 5'-3' y el kit puede comprender además una exonucleasa 5'-3'.

En algunas realizaciones, un kit puede comprender además un oligonucleótido sonda C de ligación.

- 40 En algunas realizaciones, un kit puede comprender además un oligonucleótido férula D.

En algunas realizaciones, un kit puede comprender tanto C como D.

La sonda de ligación C puede comprender una modificación 3' o interna que la protege de la digestión con exonucleasa 3'-5'.

D puede comprender una región de oligonucleótidos complementaria al extremo 3' de A₁ y una región complementaria al extremo 5' del oligonucleótido C o al extremo 5' de A₁.

En algunas realizaciones, es posible que D no pueda someterse a una extensión contra A₁ en virtud de una modificación 3' o por una falta de coincidencia entre el extremo 3' de D y la región correspondiente de A₁ o C.

- 5 En algunas realizaciones, el kit puede comprender además dNTP, una polimerasa y tampones adecuados para la amplificación inicial de una secuencia de polinucleótidos objetivo presente en una muestra.

En algunas realizaciones, el kit puede comprender además un dUTP que incorpora polimerasa de alta fidelidad, dUTP y uracil-ADN N-glicosilasa (UDG).

En algunas realizaciones, el kit puede comprender además una fosfatasa o una fosfohidrolasa.

- 10 En algunas realizaciones, el kit puede comprender además una pirofosfatasa. La pirofosfatasa puede ser un inicio rápido.

En algunas realizaciones, el kit puede comprender además una proteinasa.

En algunas realizaciones, el kit puede comprender además uno o más colorantes de unión a oligonucleótidos o sondas moleculares.

- 15 En algunas realizaciones, el kit puede comprender además múltiples A₀, cada uno selectivo para una secuencia objetivo diferente y cada uno incluyendo una región de identificación.

En algunas realizaciones, la enzima de amplificación de (e) y la enzima pirofosforolizante son las mismas.

- 20 El kit puede comprender además dispositivos de purificación y reactivos para aislar y/o purificar una porción de polinucleótidos, siguiendo el tratamiento descrito en el presente documento. Los reactivos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen columnas de filtración en gel y tampones de lavado.

En una realización de la divulgación, se proporciona un dispositivo que comprende: al menos una ruta de fluido entre una primera región, una segunda región y una tercera región, donde la primera región comprende uno o más pozos, donde cada pozo comprende:

dNTP;

- 25 al menos un oligonucleótido cebador de cadena sencilla;

una enzima de amplificación para la amplificación inicial del ADN presente en una muestra; y

donde la segunda región comprende uno o más pozos, donde cada pozo comprende:

un oligonucleótido sonda A₀ de cadena sencilla, capaz de formar un primer producto intermedio con una secuencia de polinucleótidos objetivo, siendo dicho producto intermedio al menos parcialmente de cadena doble;

- 30 una enzima pirofosforolizante capaz de digerir el primer producto intermedio en la dirección 3'-5' desde el extremo de A₀ para crear una cadena de A₁ parcialmente digerida; y

donde la tercera región comprende uno o más pozos, donde cada pozo comprende:

dNTP;

tampones;

- 35 una enzima de amplificación;

un medio para detectar una señal derivada de A₂ o una porción del mismo, o múltiples copias de A₂ o múltiples copias de una porción del mismo; y

donde los pozos de la segunda región o los pozos de la tercera región comprenden además al menos un oligonucleótido cebador de cadena sencilla que es sustancialmente complementario a una porción de A₀.

- 40 En algunas realizaciones, los dNTP de cada pozo de la primera región pueden ser dUTP, dGTP, dATP y dCTP y cada pozo puede comprender además un dUTP que incorpora polimerasa de alta fidelidad y uracil-ADN N-glicosilasa (UDG).

En algunas realizaciones, cada pozo de la segunda región puede comprender además una fuente de ión pirofosfato.

- 45 En algunas realizaciones, el extremo 5' de A₀ puede volverse resistente a la digestión con exonucleasa 5'-3' y los pozos de la segunda región pueden comprender además una exonucleasa 5'-3'.

ES 2 924 953 T3

En algunas realizaciones, cada pozo de la segunda o tercera región puede comprender además una ligasa y un oligonucleótido sonda C de ligación o un oligonucleótido férula D.

La sonda de ligación C puede comprender una modificación 3' o interna que la protege de la digestión con exonucleasa 3'-5'.

- 5 El oligonucleótido férula D puede comprender una región de oligonucleótido complementaria al extremo 3' de A_1 y una región complementaria al extremo 5' del oligonucleótido C o al extremo 5' de A_1 . D puede ser incapaz de someterse a una extensión contra A_1 en virtud de una modificación 3' o por una falta de coincidencia entre el extremo 3' de D y la región correspondiente de A_1 o C.

- 10 En algunas realizaciones, los dNTP pueden ser un inicio rápido y cada pozo de la segunda región puede comprender además una fosfatasa o una fosfohidrolasa.

En algunas realizaciones, cada pozo de la segunda región puede comprender además una pirofosfatasa.

En algunas realizaciones, la pirofosfatasa puede ser un inicio rápido.

En algunas realizaciones, cada pozo de la tercera región puede comprender además uno o más colorantes de unión a oligonucleótidos o sondas moleculares.

- 15 En algunas realizaciones, cada pozo de la segunda región puede comprender al menos una o más A_0 diferentes que son selectivos para una secuencia objetivo que incluye una región de identificación.

En algunas realizaciones, la enzima de amplificación y la enzima pirofosforolizante en la segunda región pueden ser las mismas.

- 20 En algunas realizaciones, puede haber una cuarta región que comprenda uno o más pozos, donde cada pozo puede comprender una proteinasa y donde dicha cuarta región puede ubicarse entre la primera y la segunda regiones.

En algunas realizaciones, las regiones segunda y tercera del dispositivo pueden combinarse de manera que los pozos de la segunda región comprendan además:

dNTP;

tampones;

- 25 una enzima de amplificación; y

un medio para detectar una señal derivada de A_1 o una porción del mismo, o múltiples copias de A_1 o múltiples copias de una porción del mismo.

En algunas realizaciones, la primera región se puede conectar de forma fluida a un recipiente de muestras a través de una interfaz de fluidos.

- 30 En algunas realizaciones, los elementos de calentamiento y/o enfriamiento pueden estar presentes en una o más regiones del dispositivo.

En algunas realizaciones, se puede aplicar calentamiento y/o enfriamiento a una o más regiones del dispositivo.

En algunas realizaciones, cada región del dispositivo puede comprender independientemente al menos 100 o 200 pozos.

- 35 En algunas realizaciones, cada región del dispositivo puede comprender independientemente entre aproximadamente 100 y 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 o más pozos. Los pozos pueden tener cualquier forma y sus ubicaciones pueden estar dispuestas en cualquier formato o patrón sobre un sustrato.

- 40 En algunas realizaciones, el sustrato del pozo se puede construir a partir de un metal (por ejemplo, aleación de oro, platino o níquel como ejemplos no limitativos), cerámica, vidrio u otro material polimérico compatible con PCR, o un material compuesto. El sustrato del pozo incluye una pluralidad de pozos.

En algunas realizaciones, los pozos se pueden formar en un sustrato de pozo como agujeros ciegos o agujeros pasantes. Los pozos se pueden crear dentro de un sustrato de pozo, por ejemplo, mediante perforación con láser (por ejemplo, láser excimer o de estado sólido), estampado ultrasónico, litografía de estampado en caliente, electroformado de un molde de níquel, moldeo por inyección y moldeo por inyección y compresión.

- 45 En algunas realizaciones, el volumen de pozo individual puede oscilar entre 0.1 y 1500 nL. En una realización, de 0.5 a 50 nL. Cada pozo puede tener un volumen de aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55,

ES 2 924 953 T3

60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 nL.

- 5 **[0179]** En algunas realizaciones, las dimensiones del pozo pueden tener cualquier forma, por ejemplo, circular, elíptica, cuadrada, rectangular, ovoide, hexagonal, octogonal, cónica y otras formas bien conocidas por los expertos en la técnica.
- En algunas realizaciones, las formas de los pozos pueden tener áreas de sección transversal que varían a lo largo de un eje. Por ejemplo, un agujero cuadrado puede disminuir de un primer tamaño a un segundo tamaño que es una fracción del primer tamaño.
- 10 En algunas realizaciones, las dimensiones del pozo pueden ser cuadradas con diámetros y profundidades aproximadamente iguales.
- En algunas realizaciones, las paredes que definen los pozos pueden no ser paralelas.
- En algunas realizaciones, las paredes que definen los pozos pueden converger en un punto. Las dimensiones del pozo se pueden derivar de la capacidad de volumen total del sustrato del pozo.
- En algunas realizaciones, las profundidades de los pozos pueden oscilar entre 25 μm y 1000 μm .
- 15 En una realización, los pozos pueden tener una profundidad de 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 μm .
- En algunas realizaciones, el diámetro del pozo puede oscilar entre aproximadamente 25 μm y aproximadamente 500 μm .
- 20 En algunas realizaciones, los pozos pueden tener un ancho de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 μm .
- En algunas realizaciones, se pueden modificar partes de una o más regiones del dispositivo para estimular o desalentar la adherencia de fluido. Las superficies que definen los pozos pueden recubrirse con un material hidrofílico (o modificarse para que sean hidrofílicos), y así fomentar la retención de fluido.
- 25 En algunas realizaciones, las porciones de una o más regiones del dispositivo pueden recubrirse con un material hidrófobo (o modificarse para que sea hidrófobo) y, por lo tanto, desalentar la retención de fluidos en el mismo. El experto en la materia comprenderá que se pueden realizar otros tratamientos superficiales de modo que el fluido se mantenga preferentemente dentro de los pozos, pero no en las superficies superiores para favorecer el drenaje del exceso de fluido.
- 30 En algunas realizaciones, los pozos del sustrato del pozo pueden estar modelados para tener un patrón geométrico simple de filas y columnas alineadas, o patrones dispuestos en forma diagonal o hexagonal. En una realización, los pozos del sustrato del pozo pueden estar modelados para tener patrones geométricos complejos, tales como patrones caóticos o patrones de diseño isogeométrico.
- En algunas realizaciones, los pozos pueden estar separados geoméricamente entre sí y/o tener relaciones grandes de profundidad a anchura para ayudar a evitar la contaminación cruzada de los reactivos.
- 35 En algunas realizaciones, el dispositivo puede comprender una o más regiones auxiliares que pueden usarse para proporcionar fluidos de proceso, tales como aceite u otras soluciones químicas, a una o más de las regiones del dispositivo. Dichas regiones auxiliares pueden estar conectadas por fluido a una o más de las regiones del dispositivo a través de una o más membranas, válvulas y/o sustratos separables por presión (es decir, materiales que se rompen cuando se someten a una cantidad predeterminada de presión del fluido dentro de una región auxiliar o porción adyacente de la ruta del fluido) tal como una lámina de metal o una película delgada.
- 40 En algunas realizaciones, la ruta de fluido del dispositivo puede incluir extensas porciones tortuosas. Una ruta tortuosa entre la etapa de entrada de la ruta del fluido y una o más de las regiones del dispositivo puede ser útil para el control y manejo de procesos de fluidos. Una ruta tortuosa puede ayudar a reducir la formación de burbujas de gas que pueden interferir con el flujo de aceite a través de la ruta del fluido.
- 45 En algunas realizaciones, el dispositivo puede comprender además una membrana permeable al gas que permite evacuar el gas de los pozos de una o más regiones del dispositivo, mientras que no permite que pase el fluido. La membrana permeable a los gases se puede adherir al sustrato del pozo del dispositivo mediante un adhesivo permeable a los gases. En una realización, la membrana se puede construir a partir de polidimetilsiloxano (PDMS) y tiene un grosor que oscila entre 20 y 1000 μm . En algunas realizaciones, la membrana puede tener un grosor que
- 50 oscila entre 100 y 200 μm .

En algunas realizaciones, la totalidad o porciones del sustrato del pozo pueden contener porciones de metal conductor (por ejemplo, oro) para permitir la transferencia de calor del metal a los pozos. En una realización, las superficies interiores de los pozos se pueden recubrir con un metal para permitir la transferencia de calor.

5 En algunas realizaciones, después de que los reactivos apropiados hayan llenado los pozos de una o más regiones del dispositivo, se puede aplicar un aceite de aislamiento o un líquido térmicamente conductor al dispositivo para evitar la diafonía.

10 En algunas realizaciones, los pozos de una o más regiones del dispositivo pueden tener una forma que se estrecha desde un diámetro grande a un diámetro más pequeño, similar a un cono. Los pozos en forma de cono con paredes inclinadas permiten el uso de un método de deposición sin contacto para reactivos (por ejemplo, inyección de tinta). La forma cónica también ayuda en el secado y se ha encontrado que evita burbujas y fugas cuando hay presente una membrana permeable al gas.

15 En algunas realizaciones, los pozos de una o más regiones del dispositivo pueden llenarse haciendo avanzar un fluido de muestra (por ejemplo, mediante presión) a lo largo de la ruta de fluido del dispositivo. A medida que el fluido pasa por los pozos de una o más regiones del dispositivo, cada pozo se llena de fluido, que se retiene principalmente dentro de los pozos a través de la tensión superficial. Como se describió anteriormente, partes del sustrato del pozo del dispositivo se pueden recubrir con una sustancia hidrofílica/hidrófoba según se desee para fomentar el llenado completo y uniforme de los pozos a medida que pasa el fluido de muestra.

20 En algunas realizaciones, los pozos de una o más regiones del dispositivo pueden "cubrirse" con aceite después del llenado. Esto puede ayudar a reducir la evaporación cuando el sustrato del pozo se somete a ciclos de calor. En una realización, después del recubrimiento con aceite, una solución acuosa puede llenar una o más regiones del dispositivo para mejorar la conductividad térmica.

En algunas realizaciones, la solución acuosa estacionaria se puede presurizar dentro de una o más regiones del dispositivo para detener el movimiento del fluido y cualquier burbuja.

25 En algunas realizaciones, se puede usar aceite como el aceite mineral para el aislamiento de los pozos de una o más regiones del dispositivo y para proporcionar conductividad térmica. Sin embargo, se puede utilizar cualquier líquido termoconductor, como líquidos fluorados (por ejemplo, FC-40 3M). Debe entenderse que las referencias al aceite en esta divulgación incluyen tales alternativas como aplicables como lo apreciará un experto en la técnica.

En algunas realizaciones, el dispositivo puede comprender además uno o más conjuntos de sensores.

30 En algunas realizaciones, uno o más conjuntos de sensores pueden comprender un detector de dispositivo acoplado de carga (CCD)/semiconductor de óxido de metal complementario (CMOS) acoplado a una placa frontal de fibra óptica (FOFP). Se puede colocar en capas un filtro sobre la FOFP y colocarse contra o junto al sustrato del pozo. En una realización, el filtro puede colocarse en capas (unirse) directamente encima del CCD con el FOFP colocado encima.

35 En algunas realizaciones, un fluido de hidratación, tal como agua destilada, puede calentarse dentro de la primera región o una de las regiones auxiliares de modo que una o más regiones del dispositivo tengan hasta el 100 % de humedad, o al menos suficiente humedad para evitar el exceso de evaporación durante el ciclo térmico.

En algunas realizaciones, después de completar el llenado del dispositivo, el sustrato del pozo puede calentarse mediante un dispositivo externo que está en contacto térmico con el dispositivo para realizar ciclos térmicos para PCR.

40 En algunas realizaciones, se pueden emplear métodos de calentamiento sin contacto, tales como RFID, punto de Curie, calentamiento inductivo o por microondas. Estos y otros métodos de calentamiento sin contacto serán bien conocidos por el experto en la materia. Durante los ciclos térmicos, el dispositivo puede ser monitorizado en busca de reacciones químicas a través de las disposiciones de sensores descritas anteriormente.

En algunas realizaciones, los reactivos que se depositan en uno o más de los pozos de una o más de las regiones del dispositivo se depositan en una disposición predeterminada.

45 En algunas realizaciones, se proporciona un método que comprende:
proporcionar un fluido de muestra a una ruta de fluidos de un dispositivo donde el dispositivo comprende al menos una ruta de fluidos entre una primera región, una segunda región y una tercera región, donde la primera, segunda y tercera regiones comprenden independientemente uno o más pozos;

llenar la segunda región con el fluido amplificado de la primera región de manera que uno o más pozos de la segunda región se recubran con el fluido amplificado;

50 evacuar el fluido amplificado de la segunda región de modo que uno o más pozos permanezcan humectados con al menos algo del fluido amplificado;

llenar la tercera región con el fluido evacuado de la segunda región de manera que uno o más pozos de la tercera región se recubran con este fluido; y

evacuar el fluido de la tercera cámara de modo que uno o más pozos permanezcan humectados con al menos algo de este fluido.

En algunas realizaciones del método, la ruta del fluido puede ser sin válvula.

En algunas realizaciones del método, la segunda región evacuada puede llenarse con una sustancia hidrófoba.

- 5 En algunas realizaciones del método, la tercera región evacuada puede llenarse con una sustancia hidrófoba.

En algunas realizaciones del método, la sustancia hidrófoba se puede suministrar desde una cámara de aceite que está en comunicación fluida con la segunda y tercera regiones.

En algunas realizaciones del método, el fluido de muestra puede enrutarse a lo largo de la ruta del fluido en forma de serpentina.

- 10 En algunas realizaciones, el método puede comprender además aplicar ciclos de calentamiento y enfriamiento a una o más de las regiones primera, segunda o tercera.

Diversos aspectos y realizaciones adicionales de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica en vista de la presente divulgación.

- 15 "Y/o" cuando se usa en este documento debe tomarse como una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se estableciera individualmente en este documento.

Ejemplo 1 - Protocolos simplificados

Para el propósito de esta sección y las siguientes, las realizaciones de la invención se ejemplifican y se denominan Protocolo 1-5 respectivamente.

- 20 La Figura 1 proporciona una descripción general de los diferentes protocolos.

La siguiente tabla muestra una descripción general del tiempo necesario para realizar cada Protocolo:

Etapa de protocolo	Tiempo [min]				
	1	2	3	4	5
PCR	60-100				
Exo 5-3'	30		-		
Proteinasa K	70		15		-
PPL	30	30	30	15	
Ligadura	20	20			
TIPP	10	10	10	50*	
Exo	10				
RCA	50				
Tiempo Total	280-320	270-310	165-205	140-180	125-165

Las siguientes tablas muestran una descripción general de las enzimas utilizadas en cada Protocolo:

Etapa de protocolo	Enzima				
	1	2	3	4	5
PCR	Polimerasa de alta fidelidad, uracil-DNA glicosilasa				
exo	Exonucleasa 5-->3'		-		
Proteinasa	Proteinasa				-
PPL	Pplasa, difosfatasa		Pplasa, Ligasa, exo 5-->3', difosfatasa		
Ligadura	Ligasa	Ligasa, Pirofosfatasa			
TIPP	Pirofosfatasa		Exonucleasa 3-->5' o/y 5->3',	Pirofosfatasa, ADN polimerasa	
Exo	Exonucleasa 3-->5' o/y 5->3'				

ES 2 924 953 T3

Etapa de protocolo	Enzima				
	1	2	3	4	5
			Pirofosfatasa		
Amplificación	ADN polimerasa				
Número de enzimas	12	12	10	9	8
Etapa de protocolo	Enzima				
	1	2	3	4	5
PCR	Phusion U/Q5, UDG				
exo 5-3'	Lambda, PNK	-			
Proteinasa K	Proteinasa K				
PPL	Mako/Klenow/BST L.F./Bsu, Apirasa	Mako/Klenow/BST L.F./Bsu, Ligasa de <i>E. coli</i> /Ligasa T4/Ligasa T3/Ligada HiFi/Ligasa 9oN, Lambda exo, Apirasa			
Ligadura	Ligasa de <i>E. coli</i> / Ligasa T4/Ligasa T3/ Ligasa HiFi/Ligasa 9oN	Ligasa de <i>E. coli</i> / Ligasa T4/Ligasa T3/ Ligasa HiFi/Ligasa 9oN, TIPP			
TIPP	TIPP		ExoIII, TIPP	TIPP, BST L.F./BST 2.0 WS/Klenow/phi29/ AmpliTaq/Taq Polimerasa/Q5/PhusionFlex	
Exo	T5, Exo III				
Amplificación	BST L.F./BST 2.0 WS/Klenow/phi29				
Número de enzimas	12	12	10	9	8

5 Como puede observarse, los inventores han reducido el número total de enzimas necesarias, reduciendo así el coste y la complejidad del método. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que mover la adición de exonucleasa 5'-3' de la etapa de amplificación previa a la etapa de pirofosforólisis/ligación del protocolo (como en los protocolos 3-5) da como resultado una señal fluorescente más alta (que representa la detección de una secuencia de analito objetivo particular) como se muestra en la Fig. 2.

Ejemplo 2: Enzimas pirofosforilizantes (PPL)

10 Los inventores han probado el método del Protocolo 3 de la presente invención usando una variedad de diferentes enzimas PPL, cuyos resultados se pueden observar en la Fig. 3. La Fig. 3 (A) muestra la detección de T790M del 1% de MAF usando Mako, Klenow y Bsu. La Fig. 3(B) muestra la detección de T790M del 0.5 % de MAF usando Bst L.F. en un intervalo de diferentes concentraciones de PPI.

Los inventores han probado el método del Protocolo 4 de la presente invención usando una variedad de diferentes enzimas PPL, cuyos resultados se pueden observar en la Fig. 4.

Ejemplo 3: Protocolo 1 frente al Protocolo 4

15 Los inventores han detectado del_6223 en el exón 19 en el 0.5 %, 0.10 % y 0.05 % de MAF, que se puede observar en la Fig. 5, utilizando tanto el Protocolo 1 como el Protocolo 4. Como puede observarse, los picos fluorescentes son mayores cuando se utiliza el Protocolo 4.

Ejemplo 4: Protocolo 4 - Sensibilidad

20 Los inventores han detectado mutaciones T790M en el exón 20 del EGFR en 0.10 %, 0.50 % y 1 % de MAF como se muestra en la Fig. 6 de acuerdo con el Protocolo 4.

Ejemplo 5: Protocolo 4: ¿Se necesita una etapa de digestión con exonucleasa durante la RCA?

25 Los inventores han demostrado que una etapa de digestión con exonucleasa durante la RCA no es esencial. Sin embargo, se detecta una señal detectable posteriormente en la RCA si se omite la etapa de digestión con exonucleasa. La Fig. 7 muestra la detección de T790M en el exón 20 del EGFR en 1% de MAF con y sin la presencia de una exonucleasa en la etapa de RCA.

Ejemplo 6: Protocolo 4 - Relación de mezcla PPL:RCA

Los inventores han investigado qué efecto tiene la relación de mezcla PPL:RCA sobre la intensidad de la señal detectada para T790M en el exón 20 del EGFR en 0.5% de MAF, cuyos resultados se muestran en la Fig. 8. Como se puede observar, una relación de mezcla de PPL:RCA 1:2 da como resultado la intensidad de señal más baja pero en el punto de tiempo más temprano.

A es seguido de cerca en el tiempo por la mezcla de PPL:RCA 1:4 que tiene una mayor intensidad de señal. La mayor intensidad de señal se observa para la mezcla de PPL:RCA 1:8 en el último momento de la reacción.

Ejemplo 7: Protocolo 4 - Elección del colorante

Los inventores han investigado si se puede optimizar el colorante utilizado durante la RCA. La Fig. 9 muestra los resultados de los experimentos de comparación realizados de acuerdo con el Protocolo 4 utilizando SYBER Green I (50 °C y 60 °C) y Syto82 (50 °C y 60 °C). El colorante Syto82 permite que la RCA funcione a una temperatura más baja de 50 °C, mientras que SYBER Green I requiere una temperatura más alta de 60 °C. Se necesita una temperatura de RCA más baja para el Protocolo 5 que elimina la adición de Proteinasa K a la mezcla de reacción. La enzima de amplificación utilizada para preparar al menos un analito de cadena sencilla de un ácido nucleico compuesto por una región polinucleotídica objetivo, para la detección mediante los métodos de la presente invención, requiere una temperatura superior a 50 °C para funcionar. El uso de SYBER Green I requiere una temperatura de reacción de 60 °C y, por lo tanto, se debe agregar proteinasa K en algún momento durante el método para desactivar la enzima de amplificación antes de la RCA.

Una temperatura de RCA más baja puede permitir que los métodos de la invención se lleven a cabo en un lector de placas en lugar de qPCR.

La reacción que utiliza Syto82 es más rápida, como se puede observar en la Fig. 9, y aunque la cantidad total de fluorescencia es menor para Syto82, esto puede aliviarse mediante el uso de una concentración más alta de colorante Syto82.

Ejemplo 8: Protocolo 4 - BST L.F. frente a BST 2.0 WS

Los inventores han investigado el uso de dos enzimas diferentes, BST L.F. y BST 2.0 WS, para RCA de acuerdo con el Protocolo 4 para detectar la mutación T790M en el exón 20 del EGFR en 0,5% de MAF. Los resultados de esto se muestran en la Fig. 10 donde se puede observar que la reacción es más rápida con BST 2.0 WS. BST 2.0 WS está diseñado para incorporar dUTP, lo que ayuda con la velocidad de la reacción. Hay una diferencia insignificante en la intensidad de señal total lograda entre BST L.F. y BST 2.0 WS. De acuerdo con su descripción, proporcionada por New England Biolabs (NEB), BST 2.0 WS debería ser más estable y activo solo por encima de los 45 °C.

Ejemplo 9: Efecto de las enzimas PPL en la detección de señales

Los inventores han investigado el efecto de diferentes enzimas PPL en la reacción de RCA en diferentes proporciones de mezcla de reacción PPL:RCA. Los resultados pueden observarse en la Fig. 11(A) PPL:RCA 1:4 y la Fig. 11(B) PPL:RCA 1:8. Todas las enzimas PPL, excepto BST, impactan en la reacción de RCA en una relación PPL:RCA 1:4. Con una relación PPL:RCA 1:8, BST y Klenow no tienen impacto en la reacción de RCA.

Ejemplo 10: Pirofosforólisis, especificidad de ligación contra faltas de coincidencia de un solo nucleótido

Se preparó un primer oligonucleótido 1 de cadena sencilla (SEQ ID NO 1), que tenía la siguiente secuencia de nucleótidos:

5'-

/5Phos/A*T*G*TTTCGATGAGCTTTGACAATACTTGAAGCTCGCAGATATAGGATGTTGCGATAGT
CCAGGAGGCTGC-3'

Se preparó un oligonucleótido 2 de ligación de cadena sencilla (SEQ ID NO 2), que tenía la siguiente secuencia de nucleótidos:

5'- TGTCAAAGCTCATCGAACATCCTGGACTATGTCTCC-3' donde A, C, G y T representan nucleótidos que portan la nucleobase característica relevante de ADN, /5Phos/ representa fosfato en el extremo 5'

* representan enlace fosforotioato

También se preparó un conjunto de oligonucleótidos 3-4 de cadena sencilla (SEQ ID NOs 3-4), que tenían las siguientes secuencias de nucleótidos en la dirección 5' a 3':

3:

TGCTGGGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAGCTCATCACGCAGCTCATGCCCTTCGGCAGCCTCCTGGACT

ATG

4:

TGCTGGGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAGCTCATCACGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCTCCTGGACT

ATG

- 5 donde el oligonucleótido 3 incluye una región de 17 bases complementarias a las 17 bases en el extremo 3' del oligonucleótido 1 y el oligonucleótido 4 incluye la misma región con faltas de coincidencia de un solo nucleótido en las posiciones 3.

A continuación, se preparó una primera mezcla de reacción, que tenía una composición correspondiente a la derivada de la siguiente formulación:

- 10 0.5 µL tampón 20X pH 7.0
 0.25 µL tampón 5X pH 8.0
 0.25 µL tampón HF 5X
 0.2 µL de oligonucleótido 1, 1000 nM
 0.3 µL de oligonucleótido 2, 1000 nM
 1 µL de oligonucleótido 2 (500 nM) o mezcla de oligo 2 y 3 (500 y 0.5 nM respectivamente),
 15 0.3U de Fragmento Klenow exo- (NEB)
 0.01 µL de pirofosfato inorgánico, 10 mM
 0.0132 U de Apirasa (ex. NEB)
 1 U de ADN ligasa de *E. coli* (ex. NEB)
 Agua hasta 10 µL

- 20 donde el tampón 20x comprendía la siguiente mezcla:

200 µL Tris Acetato, 1M, pH 7.0
 342.5 µL de Acetato de magnesio acuoso, 1 M
 120 µL de Acetato de potasio acuoso, 5M
 50 µL del tensioactivo Triton X-100 (10%)
 25 Agua hasta 1mL

donde el tampón 5x comprendía la siguiente mezcla:

- 30 50µL Acetato de Trizma, 1M, pH 8.0
 25µL de Acetato de magnesio acuoso 1M
 25µL de Acetato de potasio acuoso 5M
 50µL del tensioactivo Triton X-100 (10%)
 Agua hasta 1mL

A continuación, se llevó a cabo la pirofosforólisis, seguida de la ciclación, mediante ligación del oligonucleótido 1, incubando la mezcla a 45 °C durante 15 minutos y la mezcla de productos resultante se usó en la reacción de amplificación (Ejemplo 11).

- 35 Ejemplo 11: Amplificación de sonda ciclada

Se prepararon un par de cebadores 1 de oligonucleótidos de cadena sencilla (SEQ ID NO 5) y 2 (SEQ ID NO 6), que tenían las siguientes secuencias de nucleótidos:

1: TCGCAACATCCTATATCTGC
 2: TGAGCTTTGACAATACTTGA

- 40 donde A, C, G y T representan nucleótidos que portan la nucleobase característica relevante del ADN.

Luego se preparó una segunda mezcla de reacción, que tenía una composición correspondiente a la derivada de la siguiente formulación:

- 45 3 µL de tampón Thermopol 10X
 3.2 U de BST 2.0 WS
 0.32 µL de oligonucleótido 1, 10 µM
 0.32 µL de oligonucleótido 2, 10 µM
 1.125 µL de Syto82, 30 µM
 0.165 U de Pirofosfatasa inorgánica
 1.2 µL de mezcla de dNTP, 10 mM

1.25 µL de mezcla de reacción en el Ejemplo 10
 Agua hasta 11.25 µL

donde el tampón Thermopol 10X comprendía la siguiente mezcla:

- 5 200 µL Tris-HCl pH = 8.8, 1 M
- 100 µL de (NH₄)₂SO₄, 1 M
- 100 µL de KCl, 1 M
- 20 µL de MgSO₄, 1 M
- 10 10 µL de Tritón® X-100, 10%
- Agua hasta 1 mL

15 A continuación, la mezcla de reacción se incubó a 50 °C durante 40 minutos y luego se analizó el producto de reacción resultante mediante fluorescencia en tiempo real. Cuyos resultados se muestran en la Fig. 12. A partir de este análisis se puede observar que cuando están presentes los oligonucleótidos 3 y 4, la señal fluorescente aparece más rápido en la reacción, mostrando que se ha producido pirofosforólisis y ligación del oligonucleótido 3 en la primera mezcla de reacción.

Listado de Secuencias

<110> Biofidelity Ltd.

<120> MÉTODO SIMPLIFICADO DE DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE POLINUCLEÓTIDOS

20 <130> P32007EP1

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 69

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> A en la posición 1 tiene un fosfato 5'.

A (posición 1), T (posición 2), G (posición 3) y T (posición 4) son todos enlaces fosforotioato unidos.

30 <400> 1

atgttcgatg agctttgaca atacttgaag ctgcgagata taggatgttg cगतatgcca 60

ggaggctgc 69

<210> 2

<211> 36

35 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de ADN

<400> 2

40 **tgtcaaagct catgaacat cctggactat gtctcc 36**

<210> 3

<211> 75

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> secuencia de ADN

<400> 3

tgtctgggcat ctgcctcacc tccaccgtgc agctcatcac gcagctcatg cccttcggca 60

gcctcctgga ctatg 75

ES 2 924 953 T3

<210> 4
<211> 75
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> secuencia de ADN

<400> 4

10

tgctgggcat ctgcctcacc tccaccgtgc agtcatcac gcagctcatg cccttoggct 60

gcctcctgga ctatg 75

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<223> secuencia de ADN

20

<400> 5
tcgcaacatc ctatatctgc 20

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25

<220>
<223> secuencia de ADN

30

<400> 6
tgagcttga caatactga 20

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una secuencia de polinucleótidos objetivo en un analito de ácido nucleico dado presente en una muestra, comprendiendo el método las etapas de:
- (a) introducir uno o más analitos de ácido nucleico en una primera mezcla de reacción que comprende:
- 5 i. un oligonucleótido sonda A_0 de cadena sencilla;
 ii. una enzima de pirofosforólisis; y
 iii. una ligasa;
- donde el analito se hibrida con el oligonucleótido sonda A_0 de cadena sencilla para crear un primer producto intermedio que sea al menos parcialmente de cadena doble y en el que el extremo 3' de A_0 forma un complejo de doble cadena con la secuencia objetivo del analito y donde A_0 se pirofosforoliza en la dirección 3'-5' desde el extremo 3' para crear al menos una cadena de A_1 parcialmente digerida y A_1 se somete a ligación usando una férula para formar A_2 , donde la férula incluye el polinucleótido objetivo o un oligonucleótido D, y donde someterse a ligación incluye:
- 10 - ligación del extremo 3' de A_1 al extremo 5' de A_1 para formar una construcción circular; o
 - ligación del extremo 3' de A_1 al extremo 5' de un oligonucleótido sonda C de ligación; y
- 15 (b) detectar una señal derivada de los productos de la etapa anterior, donde los productos son A_2 o una porción del mismo, o múltiples copias de A_2 o múltiples copias de una porción del mismo, e inferir de ello la presencia o ausencia de la secuencia objetivo del polinucleótido en el analito.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 además caracterizado porque la primera mezcla de reacción comprende además una fuente de iones pirofosfato.
- 20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, además caracterizado porque la primera mezcla de reacción comprende además al menos un oligonucleótido cebador de cadena sencilla que es sustancialmente complementario a una porción de A_0 y trifosfatos de desoxirribonucleótidos (dNTP).
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, además caracterizado porque los productos de la etapa (a) se introducen en una segunda mezcla de reacción antes de la etapa (b), comprendiendo dicha segunda mezcla de reacción al menos un oligonucleótido cebador de cadena sencilla y dNTP.
- 25 5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, además caracterizado porque la cadena de A_1 parcialmente digerida se cicla a través de la ligación de sus extremos 3' y 5' para crear un oligonucleótido A_2 .
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, además caracterizado porque la primera mezcla de reacción comprende además un oligonucleótido sonda C de ligación y que la cadena de A_1 parcialmente digerida se liga en el extremo 3' al extremo 5' de C para crear un oligonucleótido A_2 .
- 30 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, además caracterizado porque se produce la ligación:
- 35 durante la etapa (a); o
 durante la etapa (b); o
 entre las etapas (a) y (b).
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 además caracterizado porque la primera mezcla de reacción comprende además una exonucleasa 5'-3' y donde el extremo 5' de A_0 se vuelve resistente a la digestión con exonucleasa 5'-3'.
- 40 9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente además caracterizado porque la primera mezcla de reacción comprende además una fosfatasa o fosfohidrolasa.
10. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente además caracterizado porque antes o durante la etapa (b) los productos de la etapa anterior se tratan con al menos una de: una pirofosfatasa o una exonucleasa.
- 45 11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, además caracterizado porque el oligonucleótido C comprende además una modificación 3' o interna que lo protege de la digestión con exonucleasa 3'-5'.
12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, además caracterizado porque la primera o segunda mezcla de reacción comprende además un oligonucleótido férula D que comprende una región de oligonucleótido complementaria al extremo 3' de A_1 y una región complementaria al extremo 5' del oligonucleótido C o al extremo 5' de A_1 .
- 50

- 13 Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, además caracterizado porque la enzima que realiza la pirofosforólisis de A_0 para formar la cadena de A_1 parcialmente digerida también amplifica A_2 .
- 5 14 Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, además caracterizado porque la detección se logra usando uno o más colorantes de unión fluorescentes de oligonucleótidos o sondas moleculares y donde se utiliza un aumento en la señal a lo largo del tiempo que resulta de la generación de amplicones de A_2 para inferir la concentración de la secuencia objetivo en el analito.
- 10 15. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores además caracterizado porque se emplean múltiples sondas A_0 , cada una selectiva para una secuencia objetivo diferente y cada una incluye una región de identificación, y además caracterizado porque los amplicones de A_2 incluyen esta región de identificación y, por lo tanto, las secuencias objetivo presentes en el analito, se infieren a través de la detección de la región o regiones de identificación.
16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15 además caracterizado porque la detección de la región o regiones de identificación se lleva a cabo usando sondas moleculares o mediante secuenciación.
- 15 17 Un método de acuerdo con la reivindicación 14 además caracterizado porque la etapa final del método comprende además las etapas de:
- i. marcar los productos de la etapa (b) usando uno o más colorantes de unión fluorescentes de oligonucleótidos o sondas moleculares;
 - ii. medir la señal fluorescente de los productos;
 - iii. exponer los productos a un conjunto de condiciones desnaturalizantes; e
- 20 identificar la secuencia objetivo del polinucleótido en el analito monitorizando los cambios en la señal fluorescente de los productos durante la exposición a las condiciones desnaturalizantes.
18. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 15, además caracterizado porque el uno o más analitos de ácido nucleico se dividen en múltiples volúmenes de reacción, teniendo cada volumen uno o más oligonucleótido sonda A_0 , introducidos para detectar diferentes secuencias objetivo.
- 25 19. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 15 a 18 además caracterizado porque las diferentes sondas A_0 comprenden un sitio de cebado común, lo que permite usar un solo cebador o conjunto de cebadores para la amplificación.

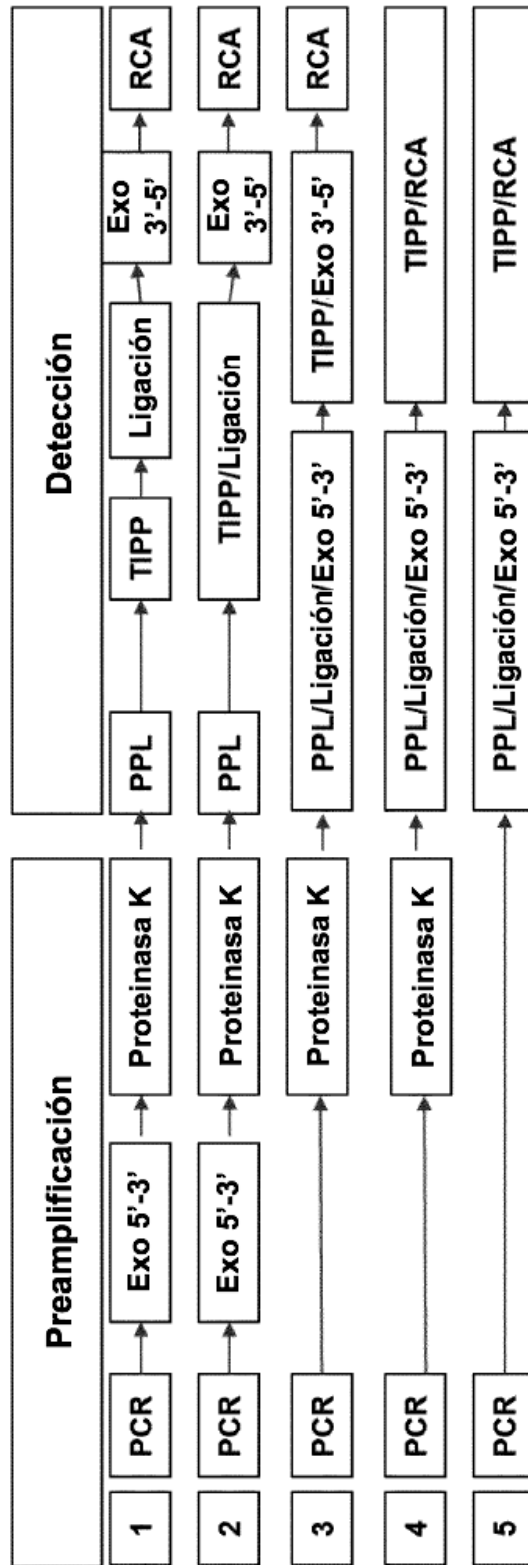


Fig. 1

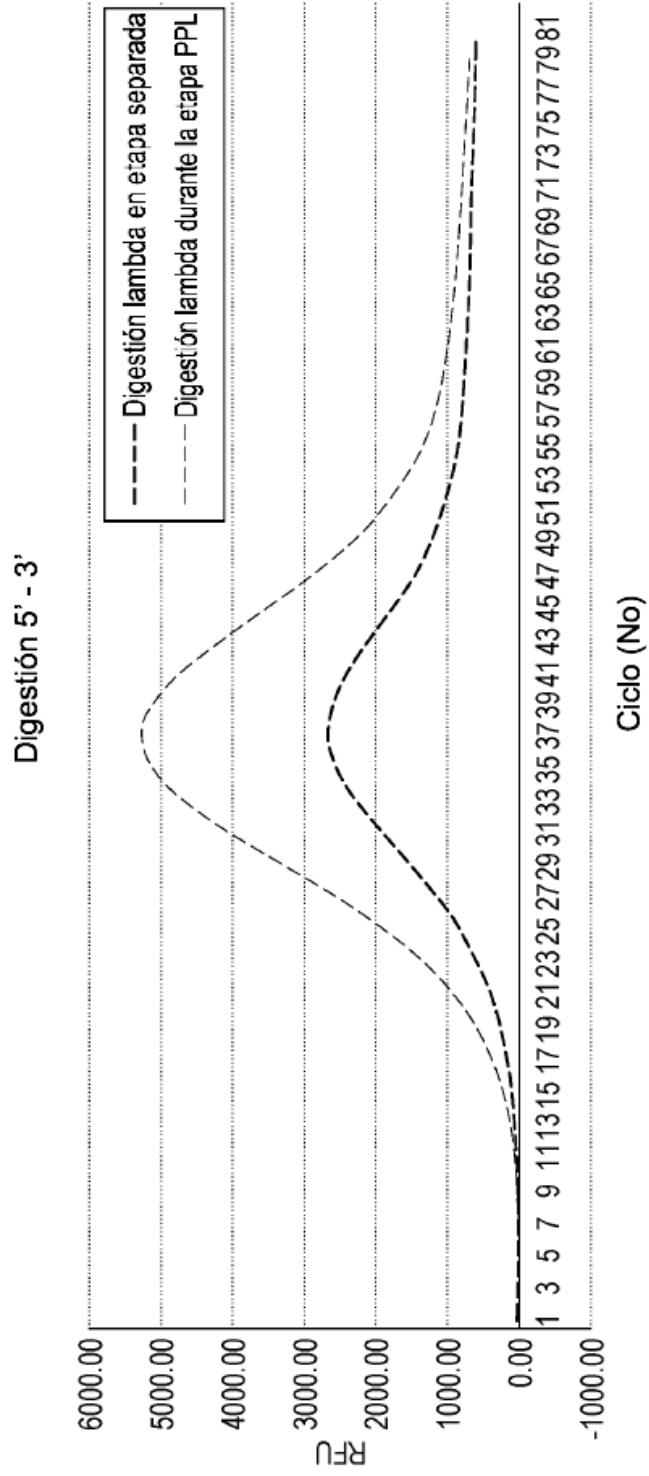
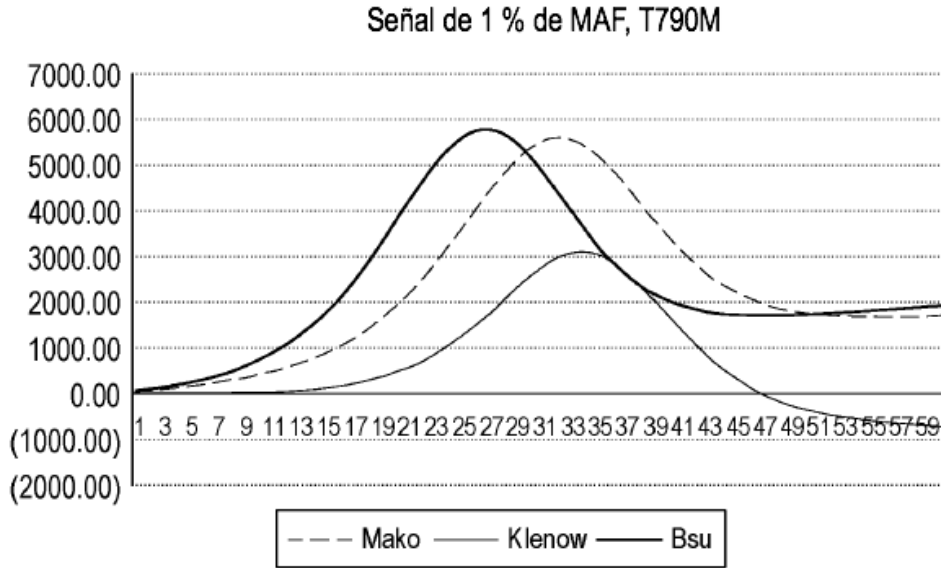


Fig. 2

(A)



(B)

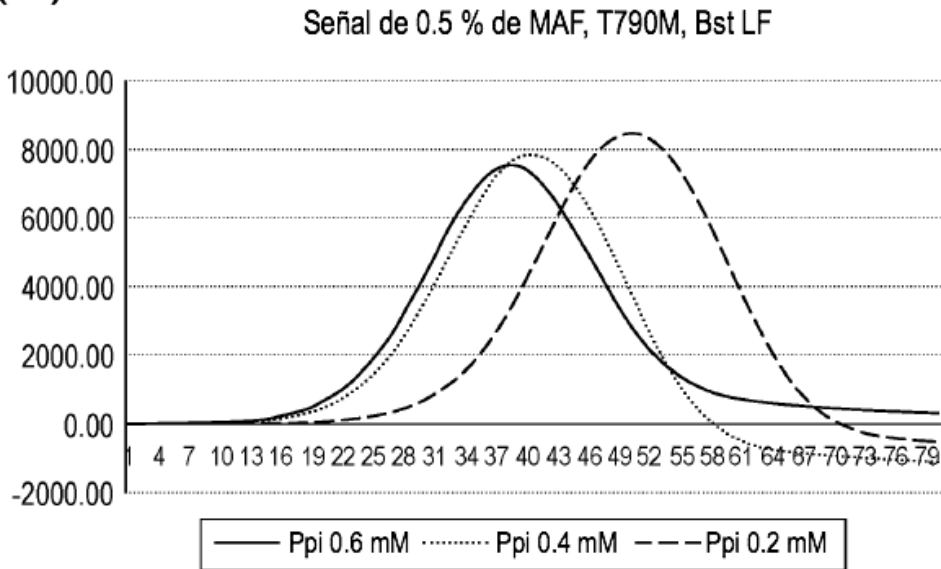


Fig. 3

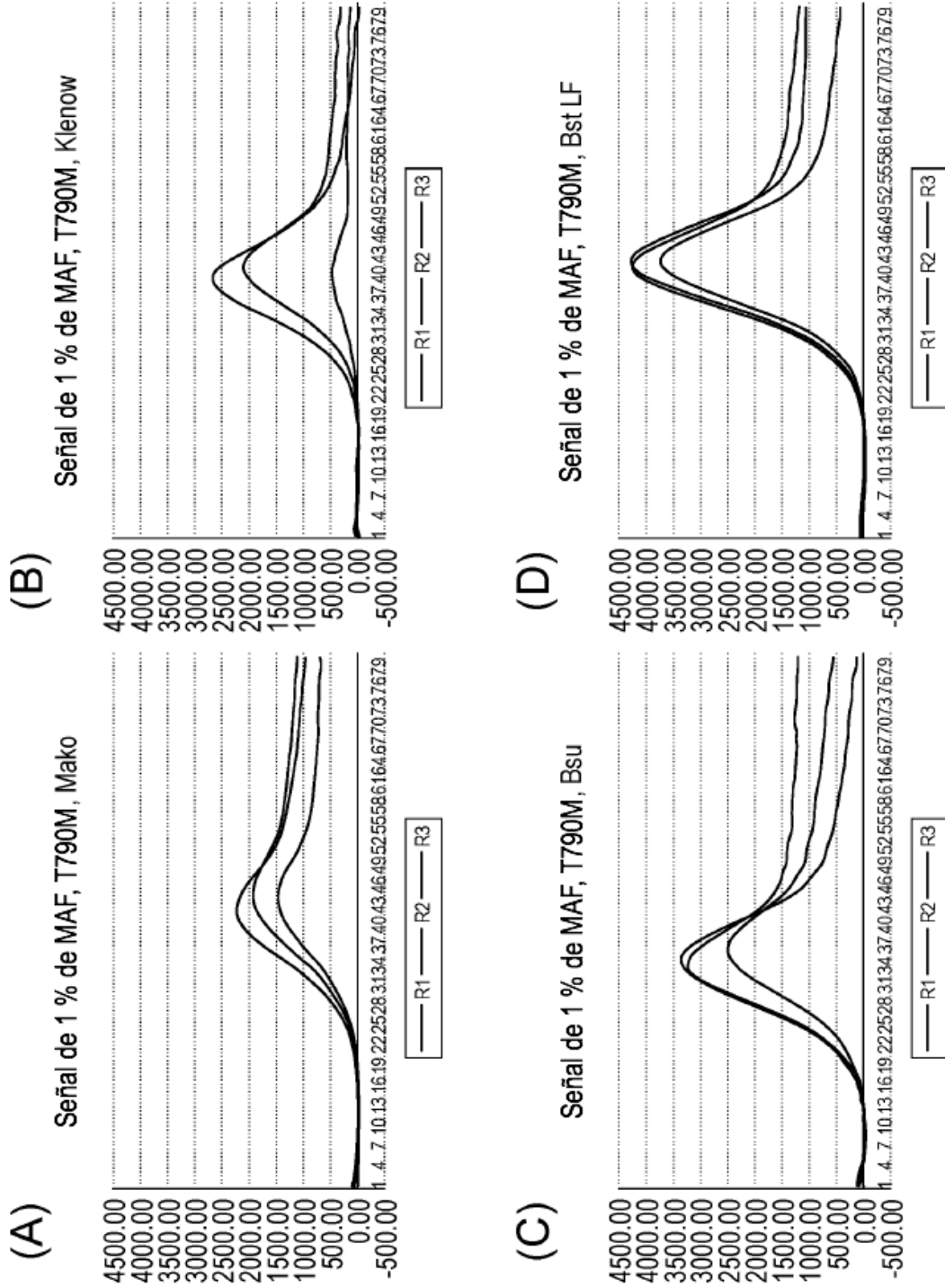


Fig. 4

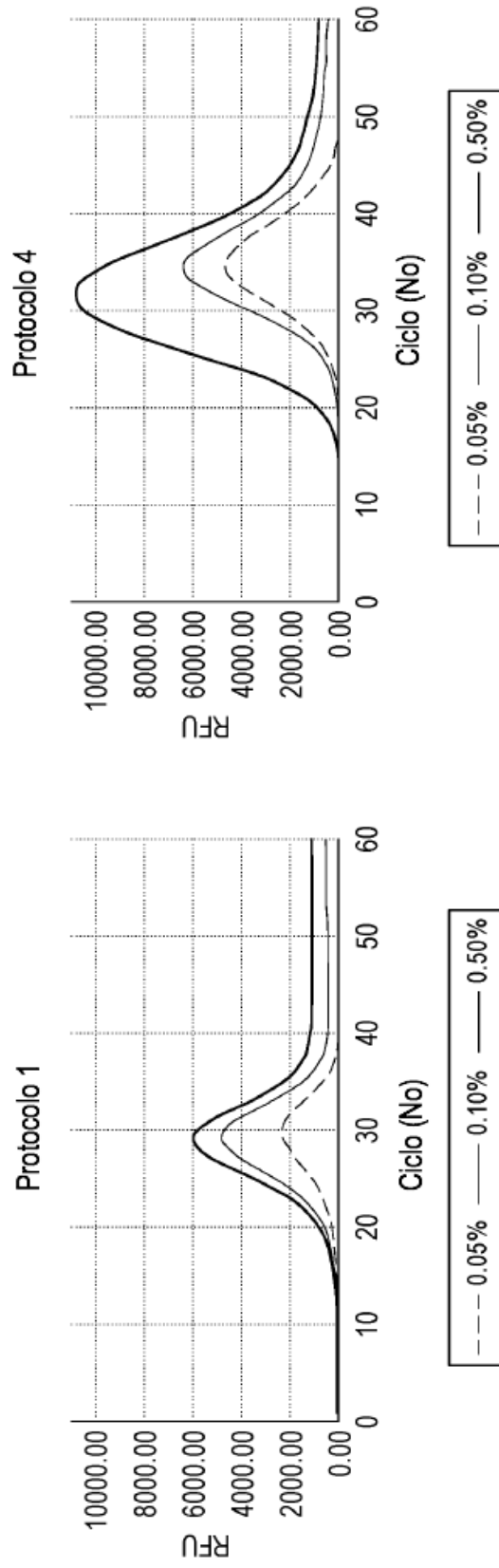


Fig. 5

Detección de T790M en el exón 20 del EGFR en 1% de MAF

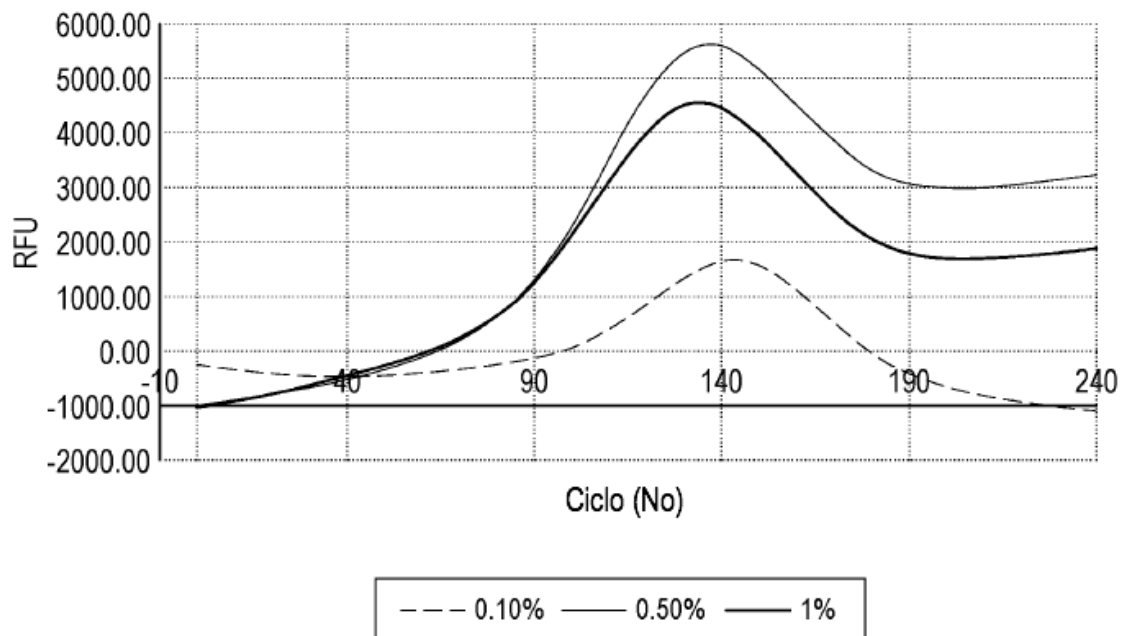


Fig. 6

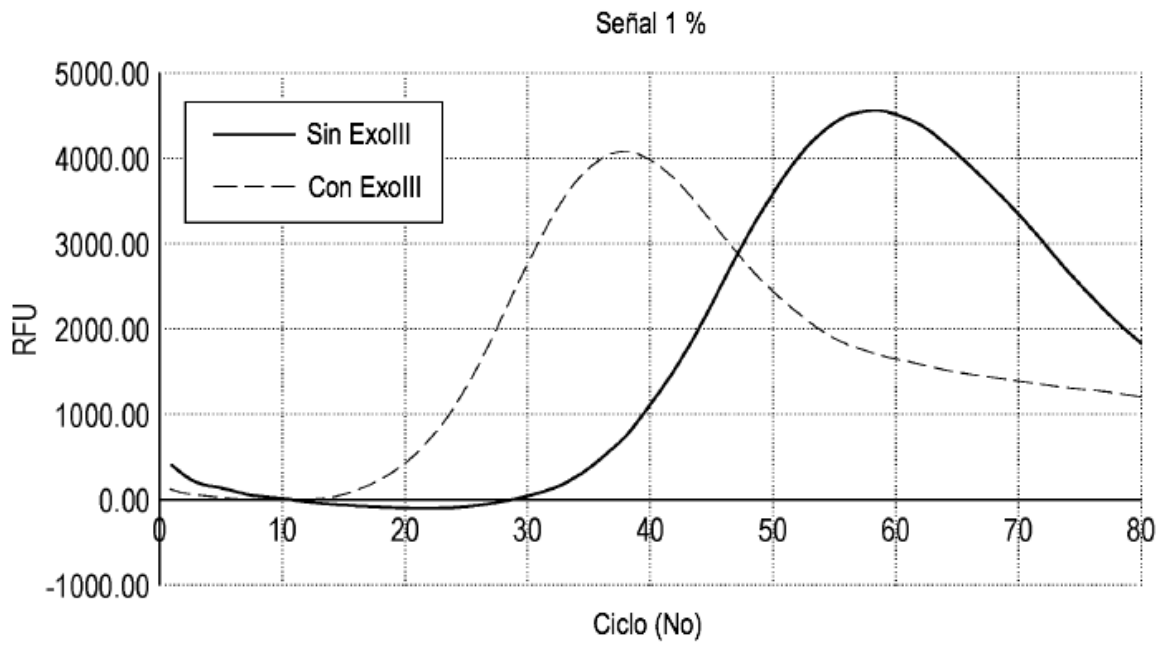


Fig. 7

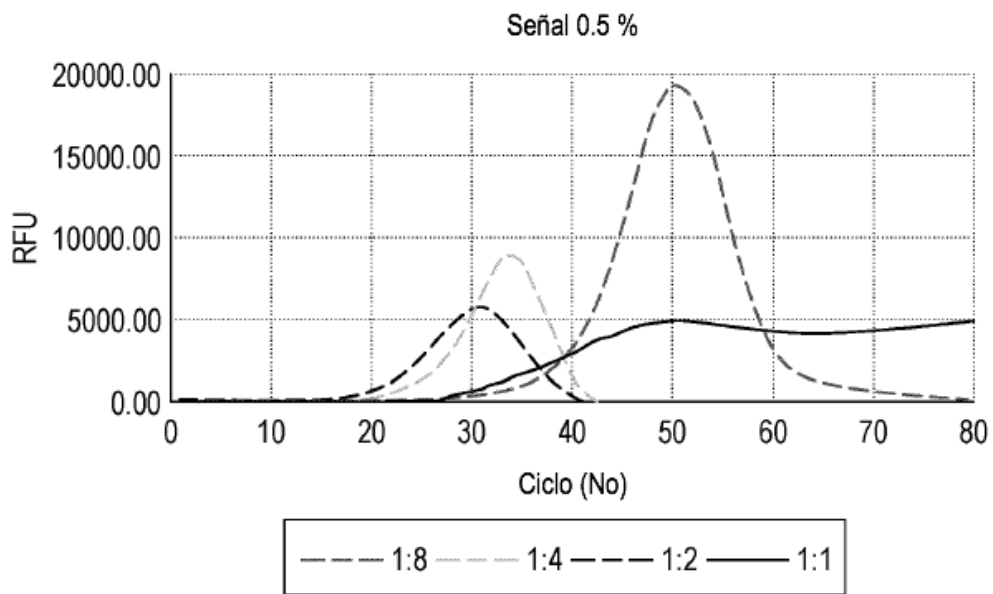


Fig. 8

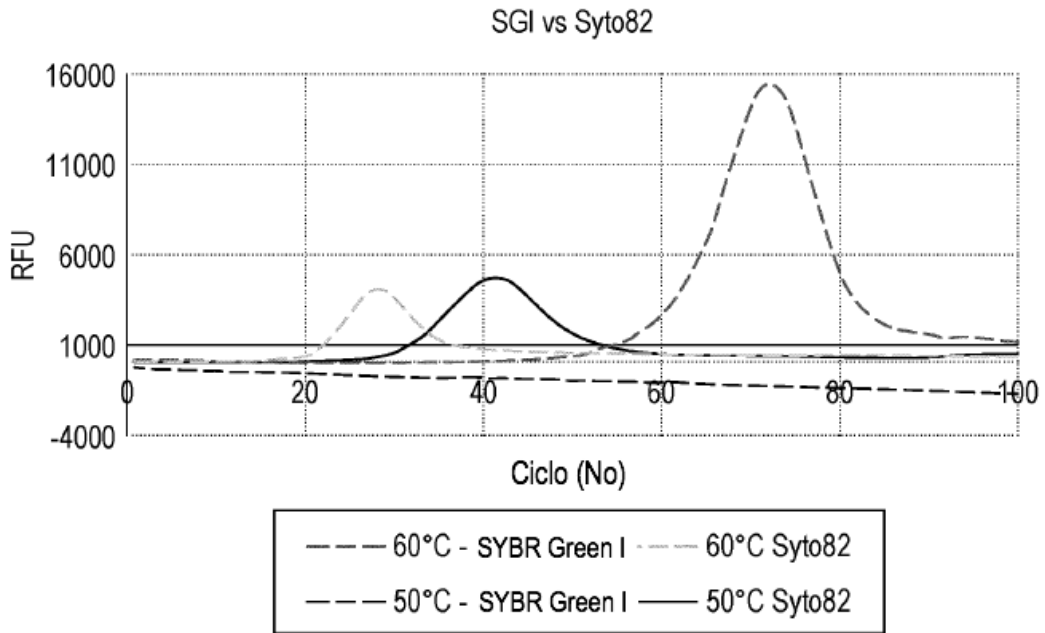


Fig. 9

Mutación T790M en el exón 20 del EGFR en 0.5 % de MAF

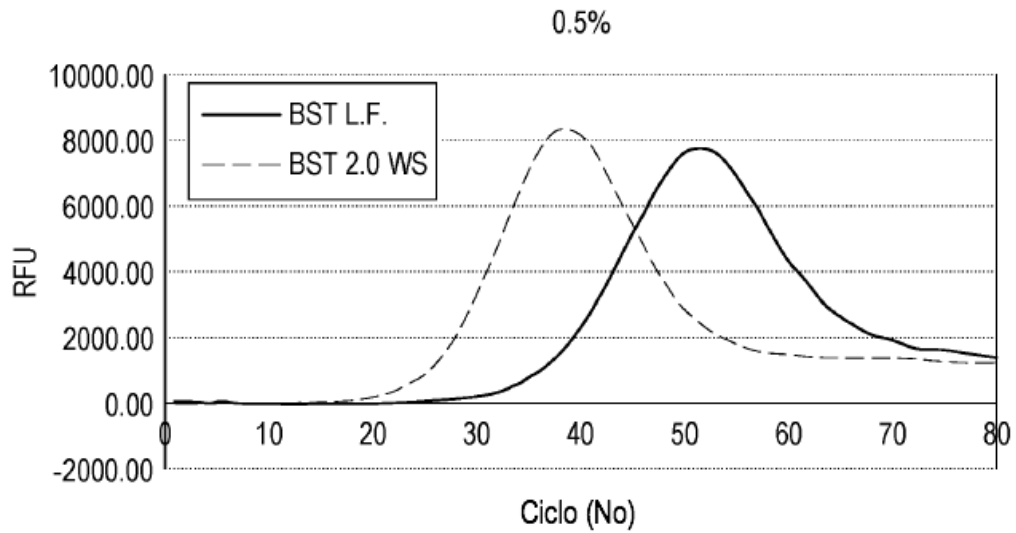


Fig. 10

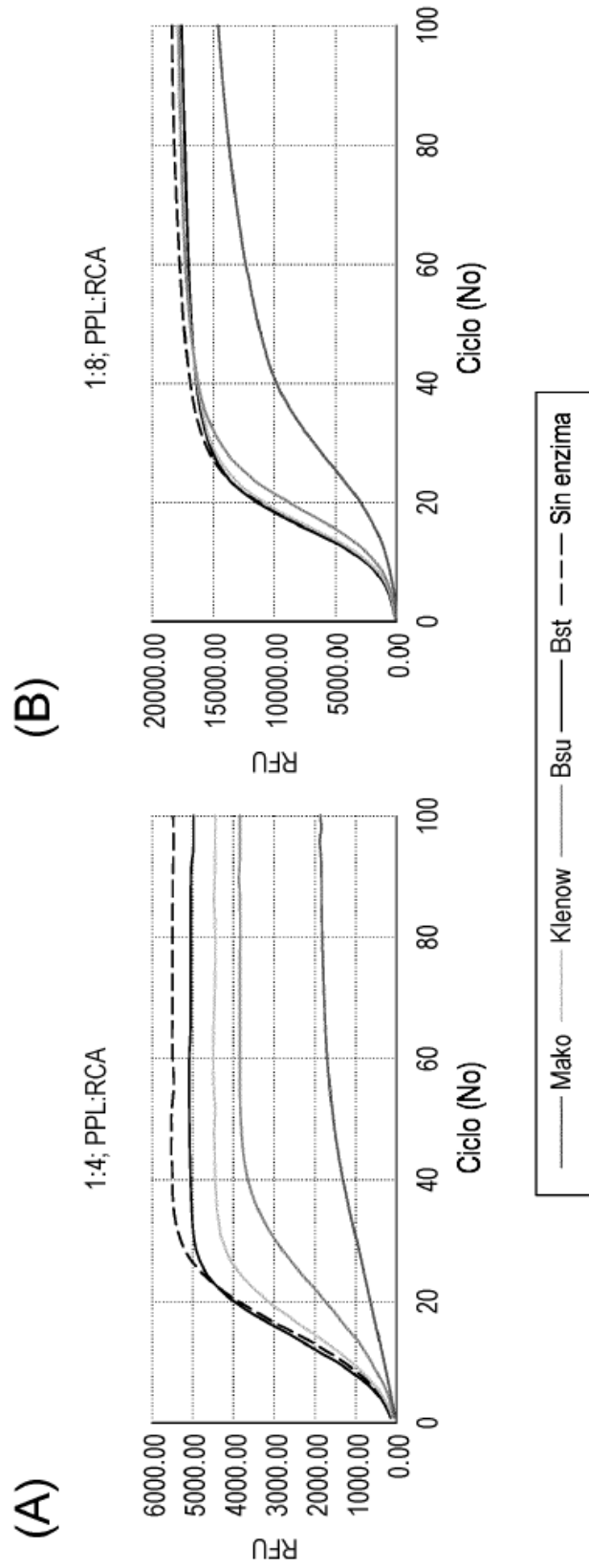


Fig. 11

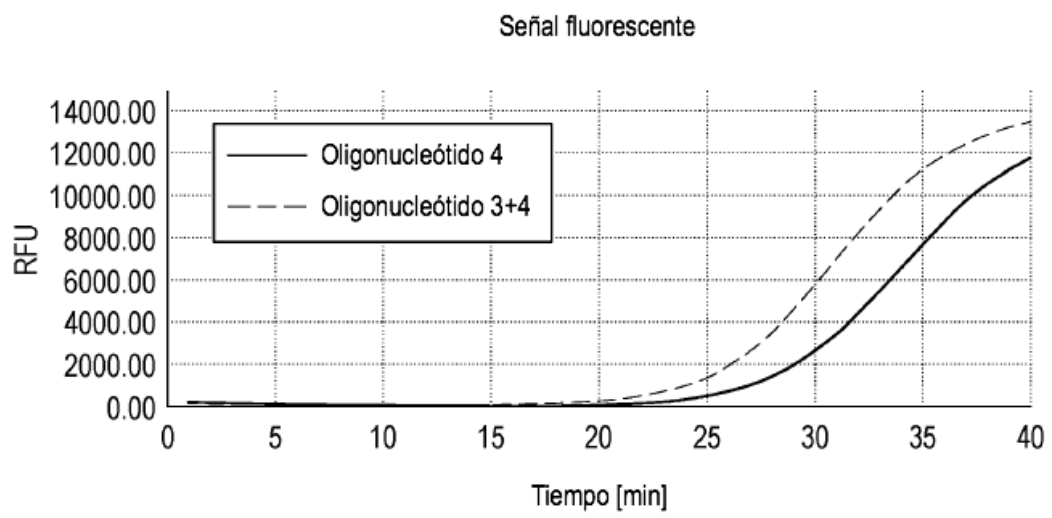


Fig. 12