



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 348 724**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04806369 .7**

(96) Fecha de presentación : **16.12.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1694862**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.2006**

(54) Título: **Métodos y composiciones para analizar mutaciones en ácidos nucleicos y sus utilizaciones en el diagnóstico de enfermedades genéticas y cánceres.**

(30) Prioridad: **16.12.2003 PCT/IB03/06016**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.12.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.12.2010

(73) Titular/es: **Institut Curie
26, rue d'Ulm
75248 Paris Cédex 05, FR
Centre National de la Recherche Scientifique**

(72) Inventor/es: **Viovy, Jean-Louis**

(74) Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para analizar mutaciones en ácidos nucleicos y sus utilidades en el diagnóstico de enfermedades genéticas y cánceres.

La presente invención se refiere a métodos mejorados para analizar una mutación o mutaciones en ácidos nucleicos, en particular la mutación puntual en ácidos nucleicos de doble cadena.

Los recientes desarrollos en genómica han alcanzado considerables esperanzas de mejoras en la salud humana y en biotecnología.

En medicina, por ejemplo, la comprensión y el diagnóstico de enfermedades genéticas y cánceres, o el estudio de organismos infecciosos, se basan cada vez más en el análisis del ADN y de los ácidos nucleicos.

La biotecnología depende cada vez más de la genética molecular y del análisis de alta resolución de ácidos nucleicos. En particular, la cartografía de las diferencias genéticas entre individuos es de creciente importancia en las investigaciones forenses, aplicaciones médicas, biotecnología e industria alimentaria.

Por ejemplo, detectar mutaciones que conducen a proteínas anómalas puede ser esencial para identificar el origen genético de una enfermedad. Numerosos procesos patológicos hereditarios, pueden diagnosticarse antes del comienzo de los síntomas, utilizando métodos de análisis estructural de ADN. En la investigación del cáncer, por ejemplo, la investigación de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, reconocidos por conducir al aumento fuerte en el cáncer de mama, se realiza actualmente a gran escala. El gen APC es también conocido por conducir a fuerte predisposición al cáncer colorrectal. La identificación genética puede realizarse también en la primera edad, o incluso en el útero, para numerosas enfermedades hereditarias. Actualmente, se han identificado 700 enfermedades genéticas, entre ellas, la talasemia o la miopatía.

La identificación y el análisis detallado de trastornos genéticos adquiridos, tales como los que se presentan en particular en el cáncer, y también aumentando las expectativas de tratamientos más eficaces y personalizados, mediante “cartografía genética” de tumores. La selección genética a gran escala de mutaciones y de variabilidad genética, denominada también “genotipado”, es también de importancia primordial para determinar las correlaciones entre las enfermedades y los genes, con objeto de encontrar nuevas dianas para la terapia en un enfoque farmacogenómico.

La identificación genética puede utilizarse también para detectar patógenos, incluyendo la identificación de variedades patógenas específicas de aplicaciones en medicina, industria alimentaria, veterinaria o bioterrorismo. Por ejemplo, en la industria alimentaria, la detección del organismo “GMO” modificado genéticamente en el material de partida o en artículos alimenticios es de creciente interés.

Por tanto, existe la necesidad de una metodología para detectar mutaciones en un fragmento de ADN en relación con el tipo natural de manera precisa, reproducible y fiable.

Las moléculas de ADN son polímeros lineales de subunidades llamadas nucleótidos. Cada nucleótido comprende una molécula de azúcar cíclico normal, que está unida por el grupo fosfato al azúcar del nucleótido adyacente, y uno de los diferentes sustituyentes cíclicos denominados bases. La combinación del fosfato y la base se denomina nucleósido. Las cuatro bases encontradas habitualmente en los ADN de procedencia natural son adenina, guanina, citosina y timidina, en lo sucesivo denominadas A, G, C y T, respectivamente. La secuencia lineal de estas bases en el ADN de un individuo es su “genoma”. Esto implica zonas de codificación, que llevan la información para la síntesis de proteínas, zonas de regulación de la expresión génica y las zonas denominadas “no codificadoras”, cuyo papel no ha sido comprendido completamente.

En el ADN bicatenario, la forma adoptada por el ADN de los cromosomas de todos los organismos celulares, las dos cadenas de ADN están entrelazadas en una configuración helicoidal precisa con las bases orientadas hacia adentro, permitiendo interacciones entre las bases de las cadenas opuestas. Las dos cadenas se mantienen juntas en alineación precisa principalmente por los enlaces de hidrógeno que se permiten entre las bases por una complementariedad de estructuras de pares específicos de bases. Esta complementariedad estructural está determinada por la naturaleza química y las posiciones de los sustituyentes en cada una de las bases, conduciendo en particular a un número definitivo y orientación de los enlaces de hidrógeno. De este modo, en el ADN bicatenario, normalmente cada A en una cadena tiene una interacción de atracción con una T de la cadena opuesta, lo que implica dos enlaces de hidrógeno, y cada G tiene una interacción de atracción con una C opuesta lo que implica tres enlaces de hidrógeno. En principio, garantizan que las moléculas de ADN se replican y se pasan copias exactas a los descendientes de las células durante la reproducción celular (mitosis) o a la descendencia del individuo, cuando la replicación se refiere a los gametos (meiosis).

Ocasionalmente, un emparejamiento de bases incorrecto se produce durante la replicación de la nueva cadena, lo que, después de la replicación posterior de la nueva cadena, produce una descendencia de ADN bicatenario con una secuencia que contiene una diferencia en una sola base hereditaria procedente de la de la molécula de ADN original. Dichos cambios hereditarios se denominan mutaciones genéticas o más específicamente en el presente caso “mutacio-

nes puntuales”. La cartografía de las mutaciones genéticas implica tanto la detección de diferencias de secuencia entre las moléculas de ADN que comprenden sustancialmente secuencias de bases idénticas (es decir, homólogas), como también la localización física de esas diferencias dentro de algún subconjunto de las secuencias en las moléculas que se comparan. Las variaciones en las secuencias de ADN, pueden afectar además a zonas no codificadoras. En particular, muy variables, tales como las repeticiones en tándem corto (STR) o el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), existen en zonas no codificadoras, y son muy útiles en el genotipado.

La detección de mutaciones puntuales, y en particular de sustituciones, es particularmente un reto, porque están muy localizadas, y con mucha frecuencia su posición no puede ser conocida de antemano. Realmente, para muchas mutaciones asociadas a enfermedades, la posición exacta de la mutación no es conocida *a priori*, y la secuencia de codificación completa del gen (que representa generalmente varios millares o decenas de millares de bases) puede ser identificada completamente.

Las tecnologías más destacadas actualmente para el análisis nucleico son la electroforesis capilar y las matrices de hibridación, denominadas también “chips de ADN o ARN”. Las dos técnicas son más bien complementarias: Los métodos de hibridación están bien adaptados a evaluaciones de ultra-alta resolución y semicuantitativas en pequeñas secuencias, mientras que la electroforesis permanece incuestionable para alta resolución, para reproducibilidad y para el análisis de grandes moléculas o fragmentos. Otros sistemas, denominados “laboratorios en chips” o “sistemas microfluídicos”, están también en desarrollo, y son prometedores de análisis más sencillos, más rentables y de mayor rendimiento en el análisis de ácidos nucleicos.

Si se conoce la posición de la mutación, se utiliza la mayoría de las veces la ampliación del cebador de un solo nucleótido, matrices de hibridación o PCR cuantitativa.

En la ampliación del cebador de un solo nucleótido, se realiza la reacción de secuenciado, en condiciones en las que la ampliación del cebador puede empezar solamente si una base dada (A, T, G o C) sigue al cebador. La misma reacción se lleva a cabo para cada base, y la detección de la ampliación se lleva a cabo mediante una electroforesis de secuenciado convencional.

En las matrices de hibridación, diferentes fragmentos de ADN “sonda” u oligonucleótidos que comprenden la mutación puntual, y que llevan todas las mutaciones esperadas, se disponen en una matriz sobre la superficie de un “chip”, y se ponen en presencia del ácido nucleico diana para la prueba (ADN o ARN). En condiciones de hibridación adecuadas, es de esperar que la diana se hibride solamente con la sonda que lleva la frecuencia exactamente complementaria, identificando de este modo la secuencia de la diana. La principal dificultad con este método, es que la diferencia de energía de hibridación entre la sonda mutada y la normal (natural) puede ser bastante baja, especialmente en el caso de sustituciones. De este modo, es difícil encontrar condiciones óptimas para obtener respuestas “sí o no”, y la diferencia en la señal puede ser algo débil. Esta dificultad, combinada con la reproducibilidad relativamente baja de las matrices de hibridación, conduce a una tasa de error significativa. Además, la energía libre de hibridación depende de manera bastante contundente de la secuencia. Por ejemplo, es mayor para las secuencias con un alto contenido en GC. De este modo, una doble cadena con un alto contenido en GC y una incompatibilidad, puede tener una afinidad realmente mayor que una doble cadena perfecta con la misma longitud, pero un contenido en GC bajo. De este modo, es muy difícil, sino imposible, conseguir un único conjunto de condiciones de hibridación (temperatura y tampón), para analizar en paralelo muchas secuencias diferentes en una sola matriz.

Se han propuesto varios métodos para mejorar la selectividad entre pares emparejados y con emparejamientos erróneos en matrices de hibridación. En Maskos *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 21, 4663-4669, 1993, por ejemplo, se puso empeño en la selección de la severidad de un tampón, pero solamente con éxito limitado. En Chiari *et al.*, (HPCE 2003, San Diego, CA, 17 a 22 de enero de 2003) se propone un procedimiento de hibridación, en el que las sondas de ADN son reemplazadas por ácidos peptidonucleicos (APN). Los APN son ácidos nucleicos homólogos, que presentan un esqueleto peptídico (en lugar de fosfato). La energía de hibridación por cada par de bases es mayor en el par APN/ADN que en un par ADN/ADN equivalente, porque el esqueleto de APN es neutro, de modo que la repulsión eléctrica está suprimida. También parece que la utilización del APN permite la utilización de oligonucleótidos más cortos, aumentando de este modo la diferencia de la energía de asociación entre el par emparejado y con emparejamiento erróneo, en el caso de mutaciones puntuales. Los APN, sin embargo, son muy costosos, y las principales estrategias para construir matrices de alta densidad no son transponibles a la química del APN. En el documento WO 00/56916 Mogens *et al.*, describen la utilización de otra clase de análogos de ADN, los ácidos nucleicos cerrados (ALN). Los ALN son ácidos nucleicos en los que el esqueleto es bicíclico. Los ALN tienen una afinidad más fuerte por el ADN complementario que por el ADN natural, y también presentan mayor selectividad frente a los emparejamientos erróneos. Sin embargo, las dificultades planteadas por el APN, tales como el coste y las dificultades para preparar matrices de alta densidad están también presentes en el ALN.

De hecho, los procedimientos de ampliación del cebador o de hibridación parece que no se adaptan bien a la búsqueda de mutaciones cuya posición en el genoma no se conoce.

Por consiguiente, se han hecho esfuerzos previos e importantes para encontrar procedimientos eficaces, rápidos y económicos para la detección de la mutación puntual por electroforesis capilar (para estudios, véase por ejemplo, Righetti, P.G., Gelfi, C., en “Analysis of Nucleic Acids by Capillary Electrophoresis”, Heller, C., Ed., Chromatographia

CE series, Vol. 1 Vieweg press, 1997, 225-271). Las técnicas principales disponibles actualmente se denominan entre “secuenciado directo” y “polimorfismo con configuración monocatenaria (SSCP)”.

En el enfoque “secuenciado directo” el gen completo se secuencia totalmente en cada paciente, procedimiento potente pero costoso. Además, debido a la presencia de heterocigosidad, las secuencias mutadas del paciente no son “puras”, y la interpretación de los datos no es sencilla como en el secuenciado convencional. Aún más significativamente, este procedimiento es largo y costoso, ya que el gen completo y las zonas adyacentes pueden secuenciarse completamente en cada paciente o individuo a identificar.

En el método, “polimorfismo con configuración monocatenaria” (SSCP) que se ha utilizado extensamente debido a su sencillez, el ADN bicatenario se desnaturaliza, y a continuación se renaturaliza rápidamente en condiciones tales que cada cadena individual se deshace. A continuación, se analizan por electroforesis las diferencias de movilidad entre las cadenas natural y mutada. Desgraciadamente, la diferencia de movilidad puede variar mucho dependiendo de la secuencia específica del ADN, y de la posición de la mutación. Por ejemplo, una mutación que conduce ADN de plegamiento en un paso diferente conducirá a una fuerte diferencia de movilidad mientras que una mutación, por ejemplo, en la parte superior de un bucle, conducirá esencialmente a ningún cambio. Esta falta de consistencia en la sensibilidad hace a esta técnica no muy atractiva para el diagnóstico, ya que proporciona un número relativamente alto de falsos negativos. En el documento WO 00/20853, se propone un procedimiento mejorado de SSCP en el que se realizan varias separaciones de SSCP en condiciones seleccionadas en cada muestra. La sensibilidad mejora significativamente, pero la duración y complejidad del análisis aumenta también considerablemente.

Por último, cabe destacar que una serie de otros procedimientos de detección de mutación se basa en la formación o disociación de dobles cadenas heterogéneas.

Una doble cadena heterogénea al contrario que una doble cadena homogénea es un ADN bicatenario cuya secuencia de bases de una cadena no es totalmente complementaria con la secuencia de bases de la otra cadena. En otras palabras, contiene por lo menos un par de bases que no es complementario, denominado también “emparejamiento erróneo”. Una doble cadena heterogénea puede formarse durante la replicación del ADN cuando una enzima ADN polimerasa hace un error y se añade una base no complementaria a una cadena polinucleotídica que se está replicando. Una doble cadena heterogénea puede formarse también durante la reparación de una lesión de ADN. Más repeticiones de una doble cadena heterogénea, teóricamente, producirán dobles cadenas homogéneas que son heterocigóticas, es decir estas dobles cadenas homogéneas tendrán una secuencia alterada en comparación con la cadena de ADN del precursor original.

Una mayoría de enfermedades genéticas o predisposición genética a enfermedades son tales que las personas afectadas tienen precisamente en el gen implicado una copia normal y una copia mutada. Cuando un fragmento de ADN que incluye la posición del gen se amplía por PCR, ambos genes se amplían. Cuando el ADN ampliado se desnaturaliza y a continuación se renaturaliza lentamente, se obtienen cuatro tipos diferentes de ADN bicatenario, es decir: dos dobles cadenas homogéneas, correspondientes al ADN de los dos alelos iniciales (el normal y el mutado), y dos dobles cadenas heterogéneas, mezclando una cadena de un alelo y la cadena (casi) complementaria del otro alelo. Estas dobles cadenas heterogéneas contienen, en la posición de la mutación, una “burbuja” de emparejamiento erróneo. Estas “burbujas” de emparejamientos erróneos se investigan generalmente por una de las técnicas siguientes:

En el procedimiento denominado “electroforesis en gel en gradiente desnaturizante (DGGE)”, los ADN bicatenarios se separan en un gel que contiene un gradiente de condiciones de desnaturización, de modo que se funden durante la electroforesis. Dado que la movilidad del ADN bicatenario y fundido es diferente, este método es muy sensible a la posición exacta de la fusión. Las dobles cadenas heterogéneas tienden a fundir más rápido que las dobles cadenas homogéneas correspondientes, y pueden distinguirse de este modo. Se han propuesto varias variantes de esta técnica, en gel o formato capilar y algunas consiguen gran sensibilidad. Sin embargo, las dobles cadenas con diferentes contenidos de pares de bases funden a diferentes temperaturas, de modo que para cada fragmento el intervalo de gradiente debe ajustarse con precisión. Además, la preparación de los geles con gradiente es en sí misma muy exigente y laboriosa, de modo que no es práctica la utilización de esta técnica para el diagnóstico o la identificación a gran escala.

Se han propuesto también otras técnicas basadas en la escisión enzimática o química, por ejemplo, cleavasa, endonucleasa T4 o tetróxido de osmio. El principio de la escisión enzimática descrito por ejemplo, en el documento US 1996/0714626 es para obtener escisión específicamente en el punto de emparejamiento erróneo, y para analizar al fin el tamaño de los fragmentos. Se describieron grandes sensibilidades, pero esta técnica implica etapas extraquímicas y, como para la SSCP, la reacción depende de la secuencia. Un procedimiento relacionado, descrito en el documento US 1994/0334612, implica el reconocimiento de la mutación por proteínas específicas, y analizar el complejo ADN-proteína resultante. Este procedimiento, además, conlleva enzimas costosas, y el protocolo es muy complejo.

Un tercer procedimiento, denominado “cromatografía en un gradiente de condiciones desnaturizantes” (DHPLC) obedece a un principio relativamente similar al DGGE, pero el gradiente de condiciones de desnaturización es temporal y puede automatizarse en un aparato de HPLC. Los ADN renaturalizados (doble cadena homogénea y, cuando proceda, doble cadena heterogénea) se absorben en una columna de HPLC, y la desnaturización del ADN (que se produce ligeramente antes para las dobles cadenas heterogéneas) conduce a la liberación del ADN y a la detección a la salida de la columna (véase, por ejemplo, Wagner, T., Stoppa-Lyonnet, D., Fleischmann, E., Muhr, D.,

Pages, S., Sandberg, T., Caux, V., Moeslinger, R., Langbauer, G., Borg, A., Oefner, P., *Genomics*, 1999, 62, 369-376). Sin embargo, el proceso completo de DHPLC es largo cuando se han de identificar genes largos, debido a la naturaleza de la frecuencia de HPLC, que puede analizar solamente una muestra a la vez.

Una mejora del procedimiento de DHPLC se propone en el documento WO 03/031580. La presente invención se refiere a un método cromatográfico para separar moléculas de ADN de doble cadena heterogénea y doble cadena homogénea en una mezcla de ensayo. En una forma de realización, el procedimiento incluye: (a) aplicar la mezcla de ensayo a un medio de separación en fase inversa; (b) eluir el medio de la etapa (a) con una fase móvil que comprende por lo menos un aditivo de fase móvil que contiene nitrógeno, en el que la elución se lleva a cabo en condiciones eficaces, para desnaturalizar por lo menos parcialmente, las dobles cadenas heterogéneas y en la que la elución da como resultado la separación, o por lo menos la separación parcial, de las dobles cadenas heterogéneas de las dobles cadenas homogéneas. La elución se lleva a cabo preferiblemente a una concentración preseleccionada del aditivo y a una temperatura preseleccionada. Ejemplos de un aditivo que contiene nitrógeno incluyen betaína, cloruro de tetrametilamonio, cloruro de tetraetilamonio, hidrócloruro de trietilamina y colina. Esta mejora aumenta la sensibilidad de DHPLC para las mutaciones puntuales difíciles de detectar, tales como las sustituciones A/T, pero no mejora la velocidad de separación, ni alivia el tedioso requisito de tener que adaptar el gradiente de desnaturalización para cada fragmento a analizar.

Otro procedimiento, denominado “análisis electroforético de dobles cadenas heterogéneas”, (EHDA) mide directamente, por electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, la diferencia de movilidad producida por una “burbuja de desnaturalización” o “bucle” asociado al emparejamiento erróneo que aparece en las parejas de dobles cadenas heterogéneas. Cuando la muestra se separa por electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, la presencia de una “burbuja de emparejamiento erróneo” local en las moléculas de dobles cadenas heterogéneas conduce a una diferencia en la geometría de flexibilidad de la doble cadena, lo que conduce a una diferencia de movilidad, en comparación con las dobles cadenas homogéneas. Si el ADN a analizar presenta un fragmento doble normal y un fragmento mutado (es decir, si el organismo del que se ha extraído el ADN es heterocigoto para el correspondiente fragmento de ADN), aparecerá una diversidad de picos (dos a cuatro) en el electroforegrama. La potencia del método EHDA se basa principalmente en la capacidad para detectar la ligera diferencia en la velocidad de migración, debida a la presencia de la burbuja de emparejamiento erróneo. Esta técnica es sencilla, y rápida, pero hasta ahora su sensibilidad de detección fue más débil que la de DGGE o DHPLC, y no se consideró adecuada para diagnóstico.

Las mejoras en este método, han consistido en utilizar aditivos tales como urea, conocida por reducir el punto de fusión de los ácidos nucleicos de doble cadena y aumentar el tamaño de las burbujas de desnaturalización. Sin embargo, dichos aditivos, realmente conducen a una disminución en la resolución de los emparejamientos erróneos tal como se ilustra en el Ejemplo 5 siguiente.

Otro tipo de mejora para EHDA implica la utilización de un medio de separación de líquido que comprende copolímero(s) de bloque con un esqueleto de acrilamida y cadenas laterales de PDMA para la separación electroforética de doble cadena homogénea y doble cadena heterogénea. El bloque PDMA, bastante hidrófobo, se utiliza para unir el polímero a la pared, y el esqueleto, hidrófilo, se extiende en el tampón como un “cepillo”, y repele otras macromoléculas (Barbier, Solicitud de Pat. Fr. 00/08526 incluida en la presente por alusión). Esto permite una mejor resolución que el EHDA convencional, y una sensibilidad a las mutaciones comparables a la DHPLC. Además, este procedimiento puede realizarse en electroforesis de matriz capilar, conduciendo de este modo a alta resolución. Sin embargo, a pesar de esta mejora, no todas las mutaciones pueden detectarse, y son necesarias más mejoras.

Por último, el documento US 2002/0055109 da a conocer un procedimiento de aislamiento de dobles cadenas heterogéneas que contiene por lo menos una zona monocatenaria interna con una proteína de unión monocatenaria. La proteína de unión monocatenaria que tiene una afinidad preferente por el ADN monocatenario en comparación con el ADN bicatenario se selecciona de entre el SSB de *E. coli*, el producto del gen 32 del fago T4, la DBP de adenovirus y UP1 del timo de vaca. Sin embargo, dicho procedimiento no es adecuado para detectar mutaciones muy locales, tales como las relativas a un solo emparejamiento erróneo de bases, o a una inserción o eliminación de sólo un nucleótido o un número muy pequeño de nucleótidos.

Por consiguiente, existe la necesidad de proporcionar un procedimiento sencillo y muy específico para detectar directamente por lo menos una sola diferencia de bases en los ácidos nucleicos tal como el ADN genómico en el que las etapas de detección están minimizadas dando como resultado un procedimiento que puede realizarse rápida, precisa y fácilmente con mínima experiencia del operador. El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones.

Un objetivo de la invención consiste precisamente en proporcionar nuevos procedimientos para mejorar la detección de mutaciones, en particular mutaciones desconocidas, en ácidos nucleicos.

En uno de sus aspectos, la invención se refiere a un procedimiento para analizar la presencia o ausencia de por lo menos una mutación en una cadena de ácidos nucleicos emparejados en forma de doble cadena que comprende por lo menos las etapas siguientes en:

- poner en contacto en un medio líquido dicha doble cadena, susceptible de incluir por lo menos un emparejamiento erróneo, con por lo menos un compuesto que puede experimentar una interacción específica de empa-

ES 2 348 724 T3

reajamiento de bases con dicho emparejamiento erróneo, estando dicho compuesto a una concentración de por lo menos 1 g/l en dicho medio y eligiéndose de entre un oligonucleótido que tiene una longitud inferior a 5 nucleótidos, un nucleótido, una base o una mezcla de los mismos y,

- 5 - analizar dicho emparejamiento erróneo por un método analítico.

Las cadenas de ácido nucleico emparejadas en forma de doble cadena son dos cadenas de ADN que son total o parcialmente complementarias.

- 10 De acuerdo con una forma de realización, el método conlleva la utilización de un análisis electroforético como método analítico.

De acuerdo con otra forma de realización, el método conlleva la utilización de matrices de hibridación, como chips de ADN por ejemplo, como método analítico.

- 15 De acuerdo con otro aspecto, un método para realizar el análisis electroforético de doble cadena heterogénea "EHDA" en una muestra de ácido nucleico susceptible de incluir por lo menos una doble cadena heterogénea comprendiendo dicho método por lo menos las etapas siguientes:

- 20 - poner en contacto en un medio líquido dicha muestra de ácido nucleico susceptible de incluir por lo menos una doble cadena heterogénea, con por lo menos un compuesto que puede experimentar una interacción específica de emparejamiento de bases con por lo menos un emparejamiento erróneo de dicha doble cadena heterogénea, estando dicho compuesto a una concentración de por lo menos 1 g/l de dicho medio

- 25 - analizar la presencia de dicha doble cadena heterogénea gracias a su movilidad electroforética.

- 30 En el caso en que la muestra de ácido nucleico incluya inicialmente cadenas homólogas correspondientes a diferentes alelos, el método según la invención comprende una etapa preliminar de desnaturalizar la muestra de ácido nucleico y renaturalizarla en condiciones convenientes para conseguir dobles cadenas tanto heterogéneas como homogéneas.

En otro aspecto, el método conlleva analizar la presencia o ausencia de por lo menos una mutación en una cadena individual de ácido nucleico en un medio líquido y que comprende por lo menos las etapas siguientes:

- 35 a) poner en contacto dicho ácido nucleico susceptible de incluir por lo menos una mutación con por lo menos una sonda de ácido nucleico injertada en un soporte sólido,
- b) permitir la hibridación de por lo menos una parte de dicha cadena de ácido nucleico con la sonda de ácido nucleico injertada,
- 40 c) lavar las cadenas no hibridadas, y
- d) analizar dicha mutación por un método analítico,

- 45 en el que las etapas a) y/o c) se realizan en presencia de por lo menos un compuesto que puede experimentar una interacción específica de emparejamiento de bases con un emparejamiento erróneo, estando dicho(s) compuesto(s) a una concentración de por lo menos 1 g/l.

- 50 Los métodos dados a conocer son particularmente útiles para el diagnóstico de la predisposición a enfermedades asociadas o supuestamente asociadas a mutación o mutaciones puntual(es) específica(s) o al diagnóstico o pronóstico de dicha(s) enfermedad(es).

- 55 Por consiguiente, se refiere además a sus utilizaciones en el diagnóstico de la predisposición a enfermedades genéticas o cánceres o al diagnóstico o pronóstico de dichas enfermedades o cánceres.

Se refiere además a la utilización de dichos métodos en la terapia de dichas enfermedades.

- 60 En particular, las enfermedades afectadas pueden incluir muchos cánceres en cuanto están asociados o supuestamente asociados a mutación o mutaciones puntual(es) específica(s) tales como melanoma, melanoma ocular, leucemia, astrocitoma, glioblastoma, linfoma, glioma, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple, sarcoma, miosarcoma, colangiocarcinoma, carcinoma espino-celular y cánceres de páncreas, mama, cerebro, próstata, vejiga, tiroides, ovarios, útero, testículos, riñón, estómago, colon y recto.

- 65 Según otro aspecto, se describe un método para analizar una mutación en un ácido nucleico que comprende por lo menos las etapas siguientes:

- realizar una reacción en cadena de la polimerasa en dicho ácido nucleico en presencia de por lo menos dos cebadores y una mezcla de compuestos que puede experimentar interacción por emparejamiento de bases con

nucleótidos o un análogo de los mismos, estando dichos compuestos a una concentración combinada de por lo menos 1 g/l y siendo incapaces de interferir con la reacción en cadena de la polimerasa y,

- analizar y/o cuantificar los fragmentos de ADN obtenidos de este modo.

Según otro aspecto, la composición se describe incluyendo por lo menos un compuesto que puede experimentar interacción específica por emparejamiento de bases a una concentración de por lo menos 1 g/l, y un par de moléculas o grupos que actúan como una sonda de ADN denominada "baliza molecular" en el que dicho compuesto es como se define según la invención.

En una forma de realización preferida, por lo menos una de las moléculas o grupos implicados en el par de baliza molecular está asociada a un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico.

Se describe además una composición que incluye por lo menos un compuesto que puede experimentar interacción específica de emparejamiento de bases a una concentración de por lo menos 1 g/l, y por lo menos un medio líquido de separación.

En particular, una composición que incluye por lo menos un compuesto que puede experimentar interacción específica de emparejamiento de bases a una concentración de por lo menos 1 g/l, y por lo menos un compuesto polimérico, siendo dicho polímero tal como se define según la invención.

Más específicamente, dicho medio líquido de separación puede incluir además por lo menos un compuesto seleccionado de entre:

- un polímero tamizador
- un polímero hidrófilo, y
- un polímero tensioactivo.

En particular, se describe además un kit útil para la identificación de un ácido nucleico o un análogo del mismo que tiene una secuencia nucleica relacionada con un gen en el que la mutación o mutaciones puntual(es) está asociada o supuestamente asociada con una enfermedad o un aumento de la predisposición a una enfermedad, comprendiendo dicho kit por lo menos una composición tal como la definida anteriormente, es decir incluyendo por lo menos un compuesto que puede experimentar interacción específica de emparejamiento de bases a una concentración de por lo menos 1 g/l y un polímero, tal como define según la invención.

En particular, el kit puede comprender por lo menos un compuesto que puede experimentar interacción específica de emparejamiento de bases a una concentración de por lo menos 1 g/l y por lo menos un medio líquido de separación, tal como define según la invención.

En particular, los kits son particularmente útiles para la identificación de los genes que predisponen al cáncer de mama humano, (BRCA) como BRCA1 y BRCA2, para mutaciones, principalmente para por lo menos una mutación puntual.

Según otro aspecto, se describe la composición que incluye por lo menos un fragmento de ADN que tiene una secuencia nucleica relacionada con un gen en el que las mutaciones puntuales han estado asociadas o supuestamente asociadas a una enfermedad o a un aumento de predisposición a una enfermedad, y por lo menos un compuesto que puede experimentar interacción específica de emparejamiento de bases a una concentración de por lo menos 1 g/l.

En particular, dicha composición puede incluir por lo menos un fragmento de ADN que tiene una secuencia nucleica relacionada con un gen (BRCA) con predisposición al cáncer de mama humano y por lo menos un compuesto que puede experimentar interacción específica de emparejamiento de bases a una concentración de por lo menos 1 g/l.

Compuestos capaces de experimentar interacciones específicas de emparejamiento de bases

Según la invención, "compuesto que puede experimentar interacción específica de emparejamiento de bases" en particular con un nucleótido implicado en un emparejamiento erróneo, incluye cualquier compuesto que presente por lo menos dos grupos adecuados para el enlace de hidrógeno, en una orientación, polaridad y espaciado compatibles con la creación de interacciones de atracción con por lo menos una de las "bases" A, T, G, U y C.

Según formas de realización preferidas, un compuesto que puede experimentar interacción específica de emparejamiento de bases con dicho emparejamiento erróneo es en particular un compuesto que puede experimentar una interacción específica de emparejamiento de bases con los nucleótidos formados con las "bases" A, T, G, C y U.

En otras palabras, los compuestos considerados son capaces de presentar una interacción específicamente dirigida hacia por lo menos una base específica. Por ejemplo, algunos compuestos pueden presentar una interacción específica de emparejamiento de bases para adenina y otros compuestos para citosina.

Un compuesto puede utilizarse solo o mezclado con uno o varios otros compuestos para experimentar interacciones específicas de emparejamiento de bases con la(s) base(s) del o de los ácidos nucleicos implicados en el emparejamiento erróneo de una doble cadena heterogénea.

5 En una forma de realización preferida, los compuestos se seleccionan de modo que no pueden incorporarse en la polimerización enzimática de un ácido nucleico, tal como se lleva a cabo por ejemplo, mediante la actuación de la polimerasa en una plantilla monocatenaria. Por consiguiente, dicho compuesto no puede interferir con las reacciones de polimerización de nucleótidos y/o incorporarse en una cadena de ADN recién polimerizada. De este modo, dichos compuestos son sólo capaces de aumentar la detección de mutaciones pero no son propensos a interferir significativa-
10 mente con las reacciones de polimerización.

El mecanismo de accionamiento de los compuestos considerados según la invención, es muy inesperado en comparación con el de aditivos conocidos.

15 Una interpretación de este efecto beneficioso es que, al realizar interacciones de emparejamiento de bases con la burbuja de desnaturalización, los compuestos de la invención estabilizan la burbuja de emparejamiento erróneo, y de este modo aumentan la diferencia en la geometría entre las dobles cadenas heterogéneas y las dobles cadenas homogéneas. Esta interacción es suficientemente eficaz para conducir a una diferencia de comportamiento de las dobles cadenas heterogéneas en comparación con las dobles cadenas homogéneas en un método analítico.
20 co.

Cuando el método analítico es un método electroforético, la movilidad de las dobles cadenas heterogéneas se modifica en comparación con las dobles cadenas homogéneas y permite, de esta manera, distinguir las unas de las otras. Ambos compuestos no tendrán el mismo tiempo de retención o afinidad.

25 Cuando el método analítico es un método de hibridación, el efecto inducido es una disminución de la estabilidad de las dobles cadenas heterogéneas en comparación con las dobles cadenas homogéneas. Esta diferencia de estabilidad es particularmente sensible a emparejamientos erróneos menores, tales como los que resultan de sustituciones, que son las mutaciones más difíciles de detectar en matrices de hibridación. Según esta forma de realización específica, el o
30 los compuestos de la invención pueden estar presentes durante la hibridación y más específicamente en el medio de hibridación y/o durante la etapa de lavado y en particular en la solución de lavado utilizada para limpiar las cadenas no hibridadas.

35 Los compuestos que interactúan de manera no específica con los ácidos nucleicos, tales como la urea u otros desnaturalizantes o disolventes caotrópicos, también aumentan la probabilidad de burbujas de desnaturalización, pero de este modo, muy probablemente lo hacen también en diferentes lugares a lo largo de la doble hélice, no correspondiendo al emparejamiento erróneo, ensanchando éste el pico en el caso del análisis electroforético y alterando la separación resultante.

40 En el caso de la presente descripción, el aumento en la resolución del emparejamiento erróneo está en contraste particularmente significativo con los compuestos capaces de experimentar interacciones específicas de emparejamiento de bases muy sorprendentemente, aunque, este efecto es en general interesante con los compuestos que presentan un número muy limitado de interacciones de emparejamiento de bases (una interacción de emparejamiento de bases por compuesto es suficiente), mientras que los métodos para la detección de mutaciones en la técnica anterior, tal
45 como una ampliación del cebador de un solo nucleótido, utilizó “cebadores” capaces de conseguir interacciones de emparejamiento de bases con numerosas, por lo general, por lo menos 12 interacciones de emparejamiento de bases por molécula.

Otra característica inesperada es que los compuestos capaces de interacciones específicas de emparejamiento de bases con los ácidos nucleicos que van a analizarse, se utilizan con mejores rendimientos a concentraciones mucho mayores, que las utilizadas generalmente para los compuestos de emparejamiento de bases en la técnica anterior.

55 En particular, dichos compuestos se utilizan a una concentración combinada de por lo menos 1 g/l del medio líquido utilizado para ponerle o ponerlos en contacto con el ácido nucleico a analizar la mutación, preferentemente por lo menos 10 g/l y aun más preferentemente por lo menos 25 g/l.

60 Por “concentración combinada” se entiende la concentración total de dichos compuestos, por ejemplo, en el caso de la utilización de varios tipos de compuestos, la concentración combinada es el total de las concentraciones de cada compuesto.

La concentración de compuesto(s) según la presente invención se expresa con respecto al volumen total del medio que contiene el ácido nucleico a analizar.

65 Según la fórmula de realización específica, dicho compuesto puede llevar, además, por lo menos un sustituyente.

Naturalmente, dicho sustituyente se selecciona preferentemente para que no tenga ningún efecto significativo o un efecto mínimo sobre los grupos amino y OH responsables de la base que genera interacciones.

Dicho sustituyente puede provocar, principalmente, en dicho compuesto por lo menos uno de los cambios siguientes:

- aumento de solubilidad,
- cambio en la carga, y/o
- cambio en la fricción con un disolvente.

Como ejemplos de sustituyentes que pueden convenir para llevar a cabo la invención, se pueden mencionar los sustituyentes seleccionados de entre los sustituyentes poliméricos, como por ejemplo óxido de polietileno, sustituyentes oligoméricos como por ejemplo un polietilenglicol, sustituyentes hidrófilos como por ejemplo dextrano, compuestos de celulosa solubles en agua, cadenas alcohólicas, péptidos o polipéptidos naturales o sintéticos, un sustituyente con carga como por ejemplo un amonio cuaternario y sulfato, y/o una carga.

En una forma de realización de la presente invención, dichos compuestos son diferentes de los anticuerpos.

En otra forma de realización, dichos compuestos son diferentes de las enzimas.

En otra forma de realización, son diferentes de las proteínas.

Según una forma de realización preferida, dicho compuesto se selecciona de entre el grupo constituido por un oligonucleótido que tiene una longitud inferior a 5 nucleótidos, preferentemente inferior a 3 nucleótidos y más preferentemente inferior a 2 nucleótidos, un nucleótido, una base o una mezcla de los mismos.

Ejemplos no limitativos de dichos compuestos son:

- las bases adenina (A), guanina (G), citocina (C), uracilo (U) y timina (T),
- adenina, guanina, citocina, uracilo y timina con varias sustituciones, y en particular sustituciones sin ningún efecto sobre los grupos amino y OH son responsables de interacciones de emparejamiento de bases en bases insustituídas,
- los nucleósidos formados con las bases A, T, G, C y U,
- los nucleótidos formados con las bases A, T, G, C y U,
- análogos de oligonucleótidos, y oligonucleótidos sustituidos de varias maneras, y
- las mezclas de los mismos.

En numerosas aplicaciones preferidas, dichos compuestos contienen una unidad de emparejamiento de una sola base, significando "unidad de emparejamiento de bases" un grupo molecular que puede experimentar una interacción de emparejamiento de bases con una de las bases A, T, G, U o C.

El término "nucleótido", "oligonucleótido" o "nucleósido" se utilizan también en la presente memoria para referirse a especies individuales o variedades de especies, significando un compuesto, que comprende una purina o un resto de pirimidina, una ribosa o un resto del azúcar desoxirribosa, y un grupo fosfato, o enlace fosfodiéster en el caso de los nucleótidos en un oligonucleótido o polinucleótido.

El término "nucleótido", "oligonucleótidos" y "nucleósido" se utiliza también en la presente memoria para incluir "especies modificadas" que comprende por lo menos una modificación tal como (a) un grupo de enlace alternativo, (b) una forma análoga de purina, (c) una forma análoga de pirimidina, (d) un análogo de azúcar.

El término "nucleótido", "oligonucleótidos" y "nucleósido" se utiliza también en la presente memoria para incluir "especies sustituidas" que comprenden por lo menos un sustituyente seleccionado para aumentar su solubilidad, cambiar su carga o modificar su fricción en un disolvente, por ejemplo, pueden ser nucleótidos o nucleósidos que llevan un sustituyente hidrófilo, polimérico u oligomérico y/o una carga.

Según una forma de realización específica, dicho compuesto es un nucleósido seleccionado de entre los nucleósidos adenosina, guanosina, uridina, citidina, timidina y mezclas de los mismos.

Preferentemente, dicho compuesto es citidina a una concentración por lo menos de 1 g/l preferible por lo menos de 10 g/l y aún más preferible por lo menos de 25 g/l.

Preferentemente, dicho compuesto es timidina a una concentración por lo menos de 1 g/l preferible por lo menos de 10 g/l y aún más preferible por lo menos de 25 g/l.

Aún más preferentemente, dicho compuesto es una mezcla de citidina y timidina, cada una a una concentración de por lo menos de 1 g/l preferiblemente por lo menos de 10 g/l y aún más preferible por lo menos de 25 g/l.

Debe reconocerse, sin embargo, que estos son sólo ejemplos convenientes en el terreno de la disponibilidad, pero que algunos expertos en la materia pueden construir muchos otros compuestos capaces de experimentar interacciones específicas de emparejamiento de bases con nucleótidos o análogos nucleotídicos, y entra en el marco de la invención.

En una forma de realización específica, donde la doble cadena se pone en contacto por lo menos con dos compuestos diferentes capaces de experimentar interacciones específicas de emparejamiento de bases con el ácido nucleico, presenta ventajas que estos compuestos no puedan experimentar interacciones mutuas de emparejamiento de bases, de modo que continúan estando totalmente disponibles para las interacciones de emparejamiento de bases con los ácidos nucleicos o los análogos de ácido nucleico a analizar.

Por ejemplo, los métodos según la invención, utilizarán ventajosamente citidina y timidina, o citidina y adenosina, o guanosina y timidina, o guanosina y adenosina, pero no, por ejemplo, timidina y adenosina o citidina y guanosina.

Cadena de ácidos nucleicos u homólogos de ácido nucleico

La cadena de ácidos nucleicos o los homólogos de ácido nucleico significa ARN, ADN, ALN, APN monocatenarios o cualquier análogo artificial o natural de ácidos nucleicos, que puede hibridarse con un ARN o ADN monocatenarios naturales.

Según una forma de realización, los métodos según la invención pueden utilizarse para determinar si existe un emparejamiento erróneo entre las moléculas de (1) ADN genómico o ARNm aislados de una muestra biológica y (2) una sonda de ácido nucleico complementaria con el ADN natural cuando las moléculas (1) y (2) están hibridadas entre sí para formar una doble cadena.

Por ejemplo, la doble cadena puede originarse de la hibridación del ADN genómico del gen BRCA1 o ARNm de BRCA1 aislado de una muestra biológica humana con una sonda de ácido nucleico complementaria con el ADN del gen BRCA1 humano natural.

Desde luego, en el campo de la invención, las cadenas complementarias pueden estar en la composición en forma de doble hélice emparejada o parcialmente emparejada.

En particular, y como ejemplo no limitativo, en el contexto de la invención, “dos cadenas homólogas de ácidos nucleicos u homólogos de ácidos nucleicos” pueden designar un par de doble cadena heterogénea, tal como se encuentra, por ejemplo, en EHDA pero también un oligonucleótido unido a un soporte sólido, hibridado por lo menos en parte con una cadena de ADN o ARN contenida en una solución puesta en contacto con este soporte sólido. Esta última situación es particularmente adecuada para la aplicación de la invención a las matrices de hibridación.

Estas cadenas de ácido nucleico emparejadas en forma de doble cadena o no, provienen generalmente de una muestra de ácido nucleico.

Preferentemente, dicha muestra de ácido nucleico contiene una mezcla de cadenas (+) y cadenas (-).

En una forma de realización específica, la muestra que va a analizarse en una serie según el método de la invención puede contener fragmentos de ácido nucleico de diferentes longitudes. En una forma de realización preferida, la longitud de cada tipo de fragmento se diferencia de la longitud de cualquier otro por lo menos en 10 bases, preferentemente por lo menos en 20 bases y por lo general en 50 bases.

Cuando la muestra inicial de ácido nucleico contiene una mezcla de moléculas de ácido nucleico monocatenario y bicatenario, el método reivindicado puede comprender una etapa preliminar y adicional de eliminación de las moléculas de ácido nucleico monocatenarias.

Cuando la muestra de ácido nucleico inicial contiene la mayoría del ARN, los ADNc bicatenarios se sintetizan en primer lugar utilizando cualquier técnica conocida por los expertos en la materia. A continuación, los ADNc procedentes de un solo gen o de un conjunto limitado de genes se amplían selectivamente en dicha muestra de ADNc bicatenario. Preferentemente, se utilizan métodos de ampliación para obtener muestras de polinucleótido dirigido. Puede utilizarse cualquier método lineal o logarítmico de ampliación incluyendo la reacción en cadena de la ligasa, de la polimerasa (PCR, RT-PCR) y técnicas tales como la ampliación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA).

Asimismo, cuando la muestra inicial de polinucleótido contiene la mayor parte del ADN genómico, la muestra de ADN objetivo se obtiene preferentemente por PCR.

La invención comprende todas las muestras biológicas que contienen ácido(s) nucleico(s) sin ninguna limitación específica. Más específicamente una muestra biológica según la invención, puede originarse a partir de una célula, un tejido, un órgano, una muestra quirúrgica o de una biopsia fijada o sin fijar, tales como los aspirados de médula ósea, o un fluido biológico incluyendo los fluidos biológicos tales como sangre, suero, plasma, fluido cerebroespinal, orina, fluidos linfáticos y varias secreciones externas de los aparatos respiratorios, intestinal y genito-urinario, lágrimas, saliva, leche, glóbulos blancos y sobrenadantes de cultivo celular. El origen de la muestra puede ser animal, (preferentemente mamífero, más preferentemente humano), plantas, virus, bacterias, protozoos u hongos. La muestra puede ser eucariótica, procariótica o acelular. Las células contenidas en la muestra biológica, especialmente cuando proceden de un tejido, órgano, fluido biológico o biopsia, pueden cultivarse a fin de aumentar el número de células disponibles. La muestra puede contener células de un solo tipo o de tipos de células mezclados. Las células, tejidos y muestras pueden originarse a partir de individuos normales o de pacientes que padecen una enfermedad o trastorno. La enfermedad o trastorno puede ser, por ejemplo, un cáncer, una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad inflamatoria, enfermedad cardiovascular, un trastorno inmunitario, un trastorno del peso corporal tal como la obesidad, etc. En la presente invención se contempla cualquier célula específica, tipo de célula, célula patológica, célula en un estado específico de desarrollo o de evolución de la enfermedad.

Dentro del alcance de la invención, los autores denominan “complementario en parte” dos ADN, ARN o análogos de ADN, que llevan secuencias complementarias excepto en una o unas pocas mutaciones que afectan un pequeño número de pares de bases, tal como la sustitución de una sola base, la inserción o eliminación de una sola base, o más generalmente sustituciones, inserciones o eliminaciones que afectan solamente una fracción menor de la longitud de dicho ADN, ARN o análogos de ADN.

Mutación

Los métodos según la invención son particularmente ventajosos para analizar mutaciones puntuales.

Las consecuencias de una mutación puntual pueden oscilar desde insignificantes a letales, dependiendo de la posición y del efecto del cambio de secuencia en relación con la información genética codificada por el ADN, y con frecuencia pueden estar en el origen de una enfermedad o de predisposición a una enfermedad. Las bases A y G son purinas, mientras que T y C son pirimidinas. Mientras que, los emparejamientos normales de bases en el ADN (A con T, G con C) implican una purina y una pirimidina, las mutaciones de una sola base más frecuentes implican la sustitución de una purina o pirimidina por otra (por ejemplo, A por G, C por T), un tipo de mutación denominada “transición”. Las mutaciones en las que una purina está sustituida por una pirimidina, o viceversa, ocurren menos frecuentemente y se denominan “transversiones”. Se pueden encontrar también mutaciones puntuales que comprenden la adición o pérdida de una sola base que se produce en una cadena de un ADN bicatenario en alguna etapa del proceso de replicación. Dichas mutaciones se denominan “inserciones” o “eliminaciones” de una sola base respectivamente, y son conocidas también como mutaciones por “desplazamiento de marco”, debido a sus efectos sobre la traducción del código genético en las proteínas. Mutaciones mayores que afectan a pares de bases múltiples ocurren y pueden ser importantes en genética médica. En particular, algunas mutaciones pueden producirse debido al “deslizamiento” del sistema de replicación en las zonas repetidas del ADN, lo que conduce a inserciones o eliminaciones de tamaño variable.

Las mutaciones puntuales detectables incluyen la mutación por eliminación, la mutación por inserción y la mutación por sustitución en las que se produce un emparejamiento de bases incorrecto.

Si la diferencia entre dos cadenas homólogas de ácido nucleico emparejadas en forma de doble cadena consiste en una diferencia de un solo nucleótido o una inserción o eliminación pequeña se forma una doble cadena con emparejamiento erróneo. Los métodos según la invención son particularmente eficaces para detectar dobles cadenas con emparejamiento erróneo.

Más específicamente, los métodos son particularmente útiles para identificar un fragmento de ADN con una secuencia nucleica relacionada con un gen en el que la mutación o mutaciones puntuales se ha asociado o supuestamente asociado a una enfermedad o un aumento de predisposición a una enfermedad. Dichas enfermedades pueden ser diferentes tipos de cánceres, enfermedades genéticas o aumento de predisposición a una enfermedad, tales como, como ejemplo, talasemia, enfermedades cardiovasculares, miopatía, cáncer y más generalmente enfermedades genéticamente hereditarias. Una lista no exhaustiva de dichas enfermedades, con los genes asociados, y número de casos en la población, se proporciona en la Tabla siguiente a modo de ejemplo. No debería considerarse en modo alguno que esta lista limita el alcance de la invención, sino que se propone aquí solamente poner en evidencia que la gama de aplicaciones de la invención en la salud humana es grande y se expande constantemente con el progreso de la genética.

Lista no limitativa de genes asociados al aumento de la predisposición a enfermedades cancerosas, cuyo diagnóstico constituye una gama privilegiada de la aplicación de la invención.

	Predisposición	Supuesto(s) gen(es) mutado(s) asociado(s)	Frecuencia de portadores de mutación en la población general	Frecuencia de los pacientes afectados de cáncer afectados por mutación
5	Mama, ovario	BRCA1, BRCA2	1/500	1/30
	Colon, endometrio (síndrome de HNPCC)	hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS2, TGFbeta	1/500	1/20
	Melanoma	CDKN2A, CDK4	1/500	1/20
10	Riñón	c-MET	1/5000~10000	1/20
	Estómago (excluyendo HNPCC)	CDH1	1/10000~20000	1/100~200
	Colon	APC	1/8000	1/100
	Hamartomatosis			
15	VHL	VHL	1/40000	
	NF2	NF2	1/30000	
	Peutz-Jegher	LKB1	1/50000~100000	
	Síndrome de Gorlin	PTCH	1/50000~100000	
	Síndrome de Cowden, Banayan-Zonana	PTEN	1/50000~100000	
20	NF1	NF1	1/3000	
	Esclerosis de Boumeville	TSC1,TSC2	1/10000~15000	
	Neoplasia endocrina múltiple			
25	Tipo 1	MEN1	1/30000~40000	
	Tipo 2	Ret	1/30000~40000	1/10~20
	Síndrome de Carney	PRKAR1A	1/50000~80000	
	Enfermedades asociadas a la rotura del ADN			
30	Ataxia, telangiectasia	ATM	1/40000~300000	
	Enfermedad de Fanconi	6 genes asociados	1/350000	
	Enfermedad de Bloom	BLM	1/1000000	
	Xerodermia pigmentosa	8 genes asociados	1/500000~1000000	
35	Enfermedad de Werner	WRN	1/300000~1000000	

En particular, los métodos son particularmente útiles para la identificación de los genes que predisponen al cáncer de mama humano, (BRCA) similar a BRCA1 y BRCA2, para mutaciones.

Según los métodos descritos, puede detectarse la alteración o alteraciones del locus BRCA1 o BRCA2 natural. Además, los métodos pueden realizarse detectando el locus BRCA1 o BRCA2 natural y confirmando de este modo la falta de predisposición al cáncer en el locus BRCA1 o BRCA2.

Como se indicó anteriormente, se refiere también a una composición que incluye por lo menos un fragmento de ADN que tiene una secuencia nucleica relacionada con un gen que en el que la mutación o mutaciones puntual(es) ha estado asociada o supuestamente asociada a una enfermedad o a un aumento de la predisposición a una enfermedad, y por lo menos a un compuesto que puede experimentar interacción específica de emparejamiento de bases a una concentración de por lo menos 1 g/l, y como se definió anteriormente.

Según una forma de realización específica, la secuencia nucleica se refiere a los genes que predisponen al cáncer de mama humano (BRCA).

Métodos analíticos

En una forma de realización de la presente invención, el método analítico es un análisis electroforético, en particular que utiliza un medio de separación líquido.

Más específicamente, el o los ácido(s) nucleico(s) con emparejamiento erróneo, en particular el o los bicatenario(s) heterogéneo(s), se detectan por electroforesis capilar o electroforesis en microcanales, en condiciones no desnaturantes.

La invención es particularmente ventajosa para la electroforesis capilar o la electroforesis en microcanales por las razones siguientes.

Mejora significativamente la sensibilidad del análisis electroforético, especialmente por la dificultad para detectar emparejamientos erróneos tales como sustituciones.

Permite el secuenciado para una separación mucho más rápida.

Permite el multiplaje de diferentes maneras, aumentando de este modo más el rendimiento.

En una forma de realización preferida, el multiplaje puede conseguirse combinando en la misma serie fragmentos con diferentes longitudes; como la doble cadena homogénea y las dobles cadenas heterogéneas generalmente tienen 5 movilidades próximas, varias combinaciones de dobles cadenas homogéneas y dobles cadenas heterogéneas pueden separarse e identificarse en una sola serie, mezclando fragmentos de tamaños suficientemente diferentes. Por lo general, los fragmentos deben diferenciarse en el tamaño por un factor entre 10 y 100 pb, preferentemente entre 20 y 100 pb.

En otra forma de realización preferida, que puede combinarse con la anterior, el multiplaje puede realizarse por 10 ejemplo, preparando diferentes muestras que llevan etiquetas con fluorescencia a diferentes longitudes de onda, utilizando por ejemplo, PCR con diferentes cebadores marcados con fluorescencia. La ampliación de las diferentes muestras puede llevarse a cabo en una sola reacción, y la mezcla puede analizarse en una sola serie de electroforesis. Varias 15 máquinas de electroforesis capilar, diseñadas para el secuenciado del ADN o análisis del fragmento, tales como la ABI 310, 3100, 3700, o la "Megabase" de Amersham, pueden analizar simultáneamente productos con diferente longitud de onda de emisión de fluorescencia.

Por último, el multiplaje puede conseguirse también realizando varias inyecciones sucesivas de diferentes muestras. El principio es el mismo que para la separación de fragmentos de diferentes tamaños: utiliza el hecho de que, en 20 contraste con por ejemplo, el secuenciado, el análisis electroforético de un solo fragmento utiliza solamente una parte muy limitada de la ventana de separación ofrecida por electroforesis, de modo que varias muestras con tiempo de partida adecuado desplazado, pueden separarse en una sola serie.

En otra forma de realización, la separación de los fragmentos de doble cadena heterogénea puede realizarse por 25 DGGE, en presencia de una composición como la descrita en la invención, o por DHPLC en presencia del mismo tipo de composición.

La invención hace referencia también a una composición que incluye por lo menos un compuesto que puede 30 experimentar interacción específica de emparejamiento de bases a una concentración de por lo menos 1 g/l, y tal como se definió anteriormente de un medio líquido polimérico para análisis electroforético.

Dicho medio líquido polimérico incluye por lo menos un polímero útil para la separación de especies.

El término "polímero" tiene por objeto designar un conjunto de grandes moléculas compuestas de subunidades 35 monoméricas más pequeñas unidas por enlace covalente de modo característico. Un "homopolímero" es un polímero construido de sólo un tipo de subunidad monomérica. Un "copolímero" se refiere a un polímero construido de dos o más tipos de subunidades monoméricas. Tal como se utiliza en la presente memoria el término "polímero" incluye homopolímeros y copolímeros. Una solución de polímero "monodisperso" significa que las moléculas de polímero en solución tienen sustancialmente pesos moleculares iguales. Por lo general un polímero monodisperso tiene una distri- 40 bución de peso molecular menor de 1,2, y preferentemente menor de 1,1. Una solución de polímero "monodisperso" significa que las moléculas de polímero en solución tienen una distribución significativa de pesos moleculares.

Según una forma de realización, los polímeros de la invención incluyen, pero no se limitan a poli(acrilamidas N,N-disustituidas, poli(acrilamidas N-monosustituidas, poli(metacrilamida, polividona y similares. Sustituyentes ilustrativos 45 de las poli(acrilamidas incluyen alquilo C₁ a C₁₂; alquilo C₁ a C₁₂ halo-sustituido; alquilo C₁ a C₁₂ metoxi-sustituido; alquilo C₁ a C₁₂ hidroxil-sustituido y similares. Preferentemente, el sustituyente halo es flúor y el alquilo C₁ a C₁₂ hidroxil-sustituido está monosustituido. Se entiende que los sustituyentes del monómero anterior se seleccionan de modo que el polímero resultante es soluble en agua. Más preferentemente, los sustituyentes ejemplares se seleccionan de entre el grupo constituido por alquilo C₁ a C₃; alquilo C₁ a C₃ halo-sustituido; alquilo C₁ a C₃ metoxi-sustituido y 50 alquilo C₁ a C₃ hidroxil-sustituido.

Según una forma de realización específica, el medio líquido de separación contiene por lo menos un polímero 55 seleccionado entre el grupo constituido por poli(acrilamidas N,N-disustituidas y poli(acrilamidas N-sustituidas, en las que dichos N-sustituyentes se seleccionan de entre el grupo constituido por alquilo C₁ a C₁₂; alquilo C₁ a C₁₂ halo-sustituido; alquilo C₁ a C₁₂ metoxi-sustituido y alquilo C₁ a C₁₂ hidroxil-sustituido.

En una forma de realización específica, dicho polímero contiene acrilamida o acrilamida sustituida.

La acrilamida lineal es un polímero de tamizado para la electroforesis en ADN, bien conocido por los expertos en 60 la materia. Es muy hidrófilo y tiene buenas propiedades de tamizado pero no es tensioactivo.

Según otra forma de realización específica, el método electroforético y la composición o kit, tal como se definió 65 anteriormente, implican la utilización de un medio líquido de separación como se da a conocer en el documento WO 02/01218 (incluido aquí por alusión). Más específicamente, este medio líquido de separación contiene por lo menos un polímero compuesto de varios segmentos poliméricos, siendo dicho polímero del tipo copolímero de bloque irregular o del tipo polímero irregular en panal y que tiene por término medio por lo menos tres puntos de unión creados entre los segmentos del polímero de diferente naturaleza química o de configuración.

Una forma de realización particularmente preferida, consiste en presentar en el copolímero según la invención por lo menos un tipo de segmento de polímero que presenta, en el medio de separación, afinidad específica para un soporte sólido de las paredes del canal, y por lo menos un tipo de segmento de polímero que presenta en dicho medio menos o ninguna afinidad por el soporte sólido, o las paredes del canal.

La presencia de segmentos de polímero de este tipo permite al medio según la invención reducir la adsorción de especies en las paredes del canal y/o la electro-ósmosis.

En una forma de realización preferida, el medio líquido de separación utilizado según la invención contiene por lo menos un polímero a una concentración de por lo menos 1%, en particular de por lo menos 3% y más específicamente de por lo menos 4% en peso del peso total de dicho medio.

Según otra forma de realización específica, el polímero es un(os) copolímero(s) de bloque con un esqueleto de acrilamida y cadenas laterales de polidimetilacrilamida (PDMA).

Los siguientes son los más particularmente adecuados para la invención:

- copolímeros del tipo copolímero en panel, cuyo esqueleto es de dextrano, acrilamida, ácido acrílico, acrilolaminoetanol o del tipo (N,N)-dimetilacrilamida y en el que se injertan segmentos laterales de acrilamida, acrilamida sustituida o tipo (N,N)-dimetilacrilamida (DMA) o del tipo de copolímero DMA/éter alil glicídico (AGE), o alternativamente de homopolímero o copolímero de oxazolina o de derivados de oxazolina;
- copolímeros no termosensibles del tipo copolímero de bloque secuencial irregular que tiene a lo largo de su estructura una alternación de segmentos de tipo polioxietileno y de segmentos de tipo polioxipropileno, o una alternación de segmentos de tipo polioxietileno y de segmentos de tipo polioxibutileno, o más generalmente una alternación de segmentos de tipo polietileno y de segmentos de tipo poliéter que son apreciablemente más hidrófobos que el polioxietileno;
- copolímeros del tipo copolímero de bloque secuencial irregular que tienen en su esqueleto una alternación de segmentos de acrilamida, ácido acrílico, acrilolaminoetanol o de tipo dimetilacrilamida por una parte, y segmentos de tipo (N,N)-dimetilacrilamida (DMA), o de tipo copolímero DMA/éter alil glicídico (AGE), o alternativamente de homopolímero o copolímero de oxazolina o de derivados de oxazolina;
- polímeros de tipo polímero de panel irregular, cuya esqueleto es de agarosa, acrilamida, acrilamida sustituida, ácido acrílico, acrilolaminoetanol, dimetilacrilamida (DMA), de tipo polímero éter alil glicídico (AGE), de tipo copolímero aleatorio DMA/AGE, oxazolina y derivado de oxazolina, dextrano, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, celulosa modificada, polisacárido o de tipo óxido de éter, y en el que se injertan segmentos laterales de agarosa, acrilamida, acrilamida sustituida, ácido acrílico, acrilolaminoetanol, dimetilacrilamida (DMA), de tipo polímero éter alil glicídico (AGE), de tipo copolímero aleatorio DMA/AGE, oxazolina y derivado de oxazolina, dextrano, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, celulosa modificada, polisacárido o de tipo óxido de éter;
- copolímeros del tipo copolímero de panel irregular, cuya estructura es de acrilamida, acrilamida sustituida, ácido acrílico, acrilolaminoetanol, dimetilacrilamida (DMA), de tipo polímero éter alil glicídico (AGE), de tipo copolímero aleatorio DMA/AGE, oxazolina y derivado de oxazolina, dextrano, agarosa, metilcelulosa, de hidroxietilcelulosa, celulosa modificada, polisacárido o de tipo óxido de éter, y lleva segmentos laterales hidrófobos de cadena corta tales como cadenas de alquilo, derivados aromáticos, fluoroalquilos, silanos y fluorosilanos.

Los componentes adicionales pueden incluirse también en formas de realización específicas del medio de separación de la invención, tales como desnaturalizantes cuando es deseable impedir la formación de dobles cadenas o estructuras secundarias en polinucleótidos. Los desnaturalizantes preferidos incluyen formamida, por ejemplo, 40 a 90%, urea por ejemplo, 6-8 M, lactamas disponibles en el comercio, tales como pirrolidona y similares. Las instrucciones para su uso en electroforesis pueden encontrarse en las referencias de la biología molecular bien conocidas, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989).

Debe indicarse que, en la mayoría de las aplicaciones es preferible utilizar un polímero que según la invención sea esencialmente neutro. Sin embargo, puede ser útil para determinadas aplicaciones, y en particular para evitar la adsorción de las especies que contiene tanto cargas como porciones hidrófobas, para seleccionar un polímero según la invención que está deliberadamente cargado, preferentemente de carga opuesta a la de dicha especie.

Por lo general, un sistema de tampón para controlar el pH puede emplearse también como componente para transporte de la carga. Los tampones ilustrativos incluyen soluciones acuosas de ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico, acético o fórmico; iones bipolares tales como TES (ácido N-tris[hidroximetil]-2-aminoetanosulfónico, BICINE (N,N-bis[2-hidroxietil]glicina, ACES ácido (2-[2-amino-2-oxoetil]-amino)etanosulfónico), o glicilglicina; ácidos inorgánicos tales como fosfórico; y bases orgánicas tales como tampones Tris (Tris[hidroximetil]aminometano), por ejemplo, disponibles en Sigma. La concentración del tampón puede variar ampliamente, por ejemplo, entre aproximadamen-

te 1 mM hasta 1 M, pero son por lo general de aproximadamente 20 mM. Soluciones de tampón ilustrativas para aplicaciones en electroforesis capilar convencional incluyen las siguientes:

- (i) 0,1 M Tris, ácido bórico 0,25 M, urea 7 M, con un pH de 7,6 para separaciones de polinucleótidos monocatenarios; o
- (ii) Tris 0,089 M, ácido bórico 0,089 M, EDTA 0,005 M para las separaciones de polinucleótidos bicatenarios. Para los sistemas de tampón no iónico bipolar, se emplean preferentemente PDMA o polividona como componente de interacción en superficie.

Pueden utilizarse también componentes tamizadores de medios de separación electroforéticos.

Los polímeros tamizadores a título de ejemplo incluyen polioxidos lineales; poliéteres, tales como óxido de polietileno, óxido de polipropileno y sus copolímeros; poliacrilamidas; polimetacrilamida; polividona, poliviniloxazolidona; y una variedad de polímeros hidrófilos solubles en agua, tales como los cauchos naturales solubles en agua, tal como el dextrano; compuestos de celulosa solubles en agua, tales como metiletilcelulosa e hidroxietilcelulosa, y copolímeros y mezclas de estos polímeros. Preferentemente, dichos polímeros se utilizan a una concentración comprendida en el intervalo entre aproximadamente 0,5% y 10% p:v.

En cuanto a la preparación de los polímeros usados según la invención, puede realizarse por cualquier técnica convencional de polimerización o copolimerización.

En otra forma de realización específica, el método analítico es un método de tipo hibridación.

La sonda de ácidos nucleicos o los homólogos de ácido nucleico pueden disponerse sobre una superficie tal como una matriz de dominios, formando dicho sistema una matriz de hibridación. La invención es interesante en este contexto porque aumenta la diferencia de estabilidad entre pares perfectamente emparejados y pares con emparejamiento erróneo. Esta mejora es particularmente sensible para los emparejamientos erróneos menores, tales como los que proceden de sustitución, que son las mutaciones más difíciles de detectar en las matrices de hibridación.

En otra forma de realización específica, la sonda de ácidos nucleicos o los homólogos de ácido nucleico pueden disponerse sobre la superficie de partículas o bolitas. De esta manera, la muestra se pone en contacto, en presencia de compuestos como los definidos en la invención, con una variedad de bolitas etiquetadas de manera diferente, estando cada sonda unida a un conjunto de bolitas o partículas que llevan una etiqueta única o una combinación de etiquetas, tal como se describe por ejemplo, en el documento WO 99/37814. En este método, la hibridación de una sola muestra en una variedad de sondas puede realizarse en un lote, y la secuencia de las dianas hibridadas puede identificarse únicamente por las etiquetas o las bolitas a las que se unen.

Más generalmente, los compuestos considerados según la invención son ventajosos para ampliar la diferencia entre los ácidos nucleicos que presentan pequeñas diferencias de secuencia, en todos los métodos para la ampliación o detección de ácidos nucleicos, lo que implica la hibridación de un cebador en un ácido nucleico diana, o la acción de una polimerasa en dicho ácido nucleico diana.

Según otra forma de realización, la invención propone un método para analizar una mutación en un ácido nucleico que comprende por lo menos las etapas siguientes:

- realizar una reacción en cadena de la polimerasa en dicho ácido nucleico en presencia de por lo menos dos cebadores y una mezcla de compuestos capaces de experimentar interacción específica por emparejamiento de bases con nucleótidos o un análogo de los mismos, estando dichos compuestos a una concentración combinada de por lo menos 1 g/l y siendo incapaces de interferir con la reacción en cadena de la polimerasa, y
- analizar o cuantificar los fragmentos de ADN obtenidos de este modo.

Dicho método es particularmente interesante en el marco de la PCR cuantitativa o competitiva o en la utilización de la PCR ya que es puede disminuir la estabilidad de los cebadores en los ácidos nucleicos que presentan un emparejamiento erróneo con las secuencias del cebador, y de este modo para aumentar la diferencia en la ampliación entre la ampliación perfectamente emparejada e imperfectamente emparejada.

Gracias a su capacidad para aumentar el efecto del par de bases emparejado erróneamente asociados a mutaciones, la invención es también particularmente adecuada junto con los métodos y composiciones para detectar mutaciones utilizando sondas de ADN denominadas "balizas moleculares", como se describe por ejemplo, en Bonnet G., Tyagi S., Libchaber A., y Kramer FR (1999) "Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6171-6176. Dichas sondas de ADN son moléculas de ADN monocatenario que pueden formar una estructura de horquilla y posee un fluoróforo extinguido internamente. Se vuelven fluorescentes solamente cuando se unen a ácidos nucleicos complementarios.

En particular, las balizas moleculares son combinaciones de una primera molécula o grupo fluorescente y una segunda molécula o grupo que puede transferir energía a dicha primera molécula o grupo fluorescente, o de extinguir

la fluorescencia de dicha molécula o grupo fluorescente, y se han utilizado para la detección de variaciones de un solo nucleótido, tal como se describe, por ejemplo, en Marras SAE, Kramer FR, y Tyagi S., (1999) "Multiplex detection of single-nucleotide variations using molecular beacons", *Genet Anal* 14, 151-156.

5 Por consiguiente, la invención propone también una composición que incluye por lo menos un compuesto que puede experimentar interacción específica por emparejamiento de bases, tal como se definió anteriormente y a una concentración de por lo menos 1 g/l, y un par de moléculas o grupos que actúan como ADN sonda denominadas "baliza molecular".

10 Se describe también una composición que comprende un medio líquido de separación como se definió anteriormente.

El medio líquido de separación puede incluir, además, por lo menos un compuesto seleccionado de entre un polímero de tamizado, un polímero hidrófilo y un polímero tensioactivo.

15 Las figuras y ejemplos dados a continuación se presentan a modo de ilustración no limitativa de la presente invención.

Figuras

20 Figuras 1, 2 y 3: Electroforegrama que representa la separación de diferentes fragmentos de los genes humanos BRCA1 y BRCA2, que tiene una mutación puntual diferente respectivamente, y representada en la secuencia SEC. ID. n°: 4 (figura 1), SEC. ID. n°: 5 (figura 2) y SEC. ID. n°: 6 (figura 3), en presencia o ausencia de timidina (véase el Ejemplo 1).

25 Figuras 4 y 5: Electroforegrama que representa una separación idéntica a la de la figura 1 que implica fragmentos de los genes humanos BRCA2 y BRCA1 representados en la secuencia SEC. ID. n°: 2 (figura 4) y SEC. ID. n°: 6 (figura 5), en presencia o ausencia de citidina (véase el Ejemplo 2).

30 Figura 6: Comparación de la resolución entre el electroforegrama que representa una separación de fragmentos de genes BRCA2 humanos representados en la secuencia SEC. ID. n°: 2, en presencia o ausencia de diferentes compuestos que pueden experimentar interacción específica por emparejamiento de bases de la presente invención (véase el Ejemplo 3).

35 Figuras 7 y 8: Electroforegrama que representa una separación próxima a la de las figuras 2 y 3 en presencia de diferentes concentraciones de citidina (véase el Ejemplo 4).

Figura 9: Electroforegrama de referencia que representa una separación de fragmentos de los genes humanos BRCA1 y BRCA2 representados en la secuencia SEC. ID. n°: 3 y en la SEC. ID. n°: 1, en presencia o ausencia de urea (véase el Ejemplo 5).

Figura 10: Electroforegrama que representa la separación de fragmentos de los genes humanos BRCA1 representado en la secuencia SEC. ID. n°: 6, en presencia o ausencia de 2,5% de timidina y 2,5% de citidina (véase el Ejemplo 6).

45 Figura 11: Electroforegrama que representa la separación de un fragmento de RB1 representado en la SEC. ID. n°: 7, que tiene una mutación puntual en una zona rica en GC.

Figura 12: Electroforegrama que representa una serie individual con 15 fragmentos de BCI/Ex (BRCA1) por multiplaje de tamaño.

50 Figura 13: Tabla que representa la SEC: ID. n°: 7, una zona rica en CG del exón del gen RB1.

Figura 14: Tabla que representa los cebadores utilizados para ampliar las secuencias de 15 fragmentos de BCI/Ex detectados según el Ejemplo 8.

Ejemplos

Todos los fragmentos utilizados para las separaciones proceden de los genes humanos BRCA1 y BRCA2.

60 La secuencia de los genes, los cebadores utilizados para ampliar los fragmentos están listados en la Tabla 1. Respecto a las mutaciones denominadas SEC. ID. n°: 4 y SEC. ID. n°: 5 la mutación puntual mencionada está situada respectivamente en el lugar octavo y quinto del extremo más próximo del gen considerado.

65 El tipo de sustitución, el tamaño del fragmento, la secuencia (las zonas del cebador están subrayadas), el exón y el gen se muestran en la Tabla siguiente. El punto de la mutación se muestra en letra negrita.

Los copolímeros del medio líquido de separación se prepararon según el procedimiento de preparación dado a conocer en el documento WO 02/01218. Presentan buenas propiedades de tamizado y son tensioactivos.

Gen	Exón	Posición del nucleótido (ADNc)	Identificación	Tipo	Tamaño del amplicón (pb)	Secuencia	T. de hibridación °C
BRCA2	22	9058	SEC ID nº 1 (2383)	A/T	311	GTCTGATGCTTTTATTCACATCTTTA AATGGTCACAGGGTTATTTTCAGTGAAGA GCAGTTAAGAGCCTTGAATAATCACAGG CAAATGTGAAATGATGAAGAACCAAGCTC AG A TCAGTTGGAATATAGGAAGGCCA TGGAAATCTGCTGAAACAAAAGGAACAAGG TTTATCAAGGGATGTCACACCGGTGTGG AAGTTGCGTAATTTAAAGCTATTTCAAAA AAGAAAAGATTCAGTGAAGTATGTAAA TGCTTTGTTTATTCAGTTTATTAACTTA AAAATGACCTTACTAACAAAATGATTA CACTGTTAAACTAAGGTGGGATTTTT TTTAAATAGATTTAGGACCAATAAGTCTT AATTGGTTTGAAGAACTTTCTTCAGAAAGC TCCACCTTATAATTCGACCTGCAGAA GAATCTGAACATAAAACAACAATTACG AACCACCTTATTTAAACTCCACAAAG GAAACCATCTTATATCAAGCTG G.CTTC AACTCCAATAATTTCAAGAGCAAGGG CTGACTCTCCGCTGTACCAATCTCTGT AAAAGAATAAGATAAATTCAAATTAGACT TAGGTAAAGTAATGCAATATGGTAGACTG GGGAGAAC	58
BRCA2	3	451	SEC ID nº 2 (2501)	G/C	319	TGGCGAAGGTTTCTCCCTCCATTTACTT TCTAGGTCAATCCCTTCTAAATGCCATC ATTAGATGATAGGTGTGATACATGCACAGT TGCTCTGGAGTCTTCAAGATAGAAAGT ACCCATCTCAAGAGAGCTCAATTAAGGT TGTGTAT G TGGAGGAGCAACAGCTGGA AGAGCTGGGCCACACGATTTGACGGAA ACATCTTACTTGCCCAAGGCAAGATCTAG GTAAATATTCATCTGCTGATTTGGA GTGGTAGATGCACAGTTGCTGCGGAGT CTTCAAGATAGAAACTACCCATCTCAAG AGGAGCTCATTAAGGTTGTTGAT G TGG AGGAGCAACAGCTGGAAGAGTCTGGGCC ACAGATTTGACGGAAACATCTTACTTG CCAAGGCAAGATCTAGGTAATATTTTCAT CTGCTGATTTGGAACAAACACTTTGATTT TACTCTGAATCCCTACATAAAGATATTCTG GTTAACCACTTTAGATGTACTAGTCTA TCAATGGACACTTTTGTTATAC TGTATTTTAAATGACATTCAGTTTTT GAGTACCTGTGTTATTTTGTGATATTTCA GCTGCTGTGAAATTTCTGAGACGGATGT AACAATACTAGAAATCTCATCAACCCAGT AATAATGAT T TGAACCACTGTGAGAAG CGTGCAGCTGAGAGGATCCAGAAAAGT ATCAGGGTAGTCTCTTTTCAAACTTGCAT GTGGAG	65
BRCA1	15	4719	SEC ID nº 3 (1019)	G/A	251	TGGCGAAGGTTTCTCCCTCCATTTACTT TCTAGGTCAATCCCTTCTAAATGCCATC ATTAGATGATAGGTGTGATACATGCACAGT TGCTCTGGAGTCTTCAAGATAGAAAGT ACCCATCTCAAGAGAGCTCAATTAAGGT TGTGTAT G TGGAGGAGCAACAGCTGGA AGAGCTGGGCCACACGATTTGACGGAA ACATCTTACTTGCCCAAGGCAAGATCTAG GTAAATATTCATCTGCTGATTTGGA GTGGTAGATGCACAGTTGCTGCGGAGT CTTCAAGATAGAAACTACCCATCTCAAG AGGAGCTCATTAAGGTTGTTGAT G TGG AGGAGCAACAGCTGGAAGAGTCTGGGCC ACAGATTTGACGGAAACATCTTACTTG CCAAGGCAAGATCTAGGTAATATTTTCAT CTGCTGATTTGGAACAAACACTTTGATTT TACTCTGAATCCCTACATAAAGATATTCTG GTTAACCACTTTAGATGTACTAGTCTA TCAATGGACACTTTTGTTATAC TGTATTTTAAATGACATTCAGTTTTT GAGTACCTGTGTTATTTTGTGATATTTCA GCTGCTGTGAAATTTCTGAGACGGATGT AACAATACTAGAAATCTCATCAACCCAGT AATAATGAT T TGAACCACTGTGAGAAG CGTGCAGCTGAGAGGATCCAGAAAAGT ATCAGGGTAGTCTCTTTTCAAACTTGCAT GTGGAG	50
BRCA1	15	4719	SEC ID nº 4 (1019_80)	G/A	251	TGGCGAAGGTTTCTCCCTCCATTTACTT TCTAGGTCAATCCCTTCTAAATGCCATC ATTAGATGATAGGTGTGATACATGCACAGT TGCTCTGGAGTCTTCAAGATAGAAAGT ACCCATCTCAAGAGAGCTCAATTAAGGT TGTGTAT G TGGAGGAGCAACAGCTGGA AGAGCTGGGCCACACGATTTGACGGAA ACATCTTACTTGCCCAAGGCAAGATCTAG GTAAATATTCATCTGCTGATTTGGA GTGGTAGATGCACAGTTGCTGCGGAGT CTTCAAGATAGAAACTACCCATCTCAAG AGGAGCTCATTAAGGTTGTTGAT G TGG AGGAGCAACAGCTGGAAGAGTCTGGGCC ACAGATTTGACGGAAACATCTTACTTG CCAAGGCAAGATCTAGGTAATATTTTCAT CTGCTGATTTGGAACAAACACTTTGATTT TACTCTGAATCCCTACATAAAGATATTCTG GTTAACCACTTTAGATGTACTAGTCTA TCAATGGACACTTTTGTTATAC TGTATTTTAAATGACATTCAGTTTTT GAGTACCTGTGTTATTTTGTGATATTTCA GCTGCTGTGAAATTTCTGAGACGGATGT AACAATACTAGAAATCTCATCAACCCAGT AATAATGAT T TGAACCACTGTGAGAAG CGTGCAGCTGAGAGGATCCAGAAAAGT ATCAGGGTAGTCTCTTTTCAAACTTGCAT GTGGAG	56
BRCA1	15	4719	SEC ID nº 5 (1019_50)	G/A	251	TGGCGAAGGTTTCTCCCTCCATTTACTT TCTAGGTCAATCCCTTCTAAATGCCATC ATTAGATGATAGGTGTGATACATGCACAGT TGCTCTGGAGTCTTCAAGATAGAAAGT ACCCATCTCAAGAGAGCTCAATTAAGGT TGTGTAT G TGGAGGAGCAACAGCTGGA AGAGCTGGGCCACACGATTTGACGGAA ACATCTTACTTGCCCAAGGCAAGATCTAG GTAAATATTCATCTGCTGATTTGGA GTGGTAGATGCACAGTTGCTGCGGAGT CTTCAAGATAGAAACTACCCATCTCAAG AGGAGCTCATTAAGGTTGTTGAT G TGG AGGAGCAACAGCTGGAAGAGTCTGGGCC ACAGATTTGACGGAAACATCTTACTTG CCAAGGCAAGATCTAGGTAATATTTTCAT CTGCTGATTTGGAACAAACACTTTGATTT TACTCTGAATCCCTACATAAAGATATTCTG GTTAACCACTTTAGATGTACTAGTCTA TCAATGGACACTTTTGTTATAC TGTATTTTAAATGACATTCAGTTTTT GAGTACCTGTGTTATTTTGTGATATTTCA GCTGCTGTGAAATTTCTGAGACGGATGT AACAATACTAGAAATCTCATCAACCCAGT AATAATGAT T TGAACCACTGTGAGAAG CGTGCAGCTGAGAGGATCCAGAAAAGT ATCAGGGTAGTCTCTTTTCAAACTTGCAT GTGGAG	56
BRCA1	11(01)	855	SEC ID nº 6 (2542)	T/G	205	TGGCGAAGGTTTCTCCCTCCATTTACTT TCTAGGTCAATCCCTTCTAAATGCCATC ATTAGATGATAGGTGTGATACATGCACAGT TGCTCTGGAGTCTTCAAGATAGAAAGT ACCCATCTCAAGAGAGCTCAATTAAGGT TGTGTAT G TGGAGGAGCAACAGCTGGA AGAGCTGGGCCACACGATTTGACGGAA ACATCTTACTTGCCCAAGGCAAGATCTAG GTAAATATTCATCTGCTGATTTGGA GTGGTAGATGCACAGTTGCTGCGGAGT CTTCAAGATAGAAACTACCCATCTCAAG AGGAGCTCATTAAGGTTGTTGAT G TGG AGGAGCAACAGCTGGAAGAGTCTGGGCC ACAGATTTGACGGAAACATCTTACTTG CCAAGGCAAGATCTAGGTAATATTTTCAT CTGCTGATTTGGAACAAACACTTTGATTT TACTCTGAATCCCTACATAAAGATATTCTG GTTAACCACTTTAGATGTACTAGTCTA TCAATGGACACTTTTGTTATAC TGTATTTTAAATGACATTCAGTTTTT GAGTACCTGTGTTATTTTGTGATATTTCA GCTGCTGTGAAATTTCTGAGACGGATGT AACAATACTAGAAATCTCATCAACCCAGT AATAATGAT T TGAACCACTGTGAGAAG CGTGCAGCTGAGAGGATCCAGAAAAGT ATCAGGGTAGTCTCTTTTCAAACTTGCAT GTGGAG	55

ES 2 348 724 T3

Ejemplo 1

Comparación de la detección de diferentes sustituciones entre:

- P(AM-PDMA)18 a 5 g/100 ml + sybrgreen 1X (Molecular Probes) en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM), y
- P(AM-PDMA)18 a 5 g/100 ml + timidina a 2,5 g/100 ml + sybrgreen 1X en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM).
- Cadenas laterales de PDMA con relación iniciador-monómero $R_0=0,015$ y $A_0=0,01$ en las que $R_0=[R-SH]/[PDMA]$ y $A_0=[KPS]/[PDMA]$ y P(AM-PDMA)18 se prepararon según los protocolos presentados en V. Barbier, B.A. Buchholz, A.E. Barron, J.L. Viovy, *Electrophoresis*, 23, 1441, (2002)) con $[(NH_4)_2S_2O_8]/[AM]=0,1\%$ y $[Na_2S_2O_5]/[AM]=0,015\%$.

Se realizaron separaciones en un ABI 310 (Applied Biosystems) a 30°C. Se utilizaron capilares descubiertos de sílice fundida (Polymicro), 50 μm de diámetro interno, 61 cm de longitud (50 cm para la ventana de detección). La inyección es electrocinética (2,5 kV durante 30 s). La electroforesis previa se realiza a 12,2 kV durante 5 minutos. La separación se realiza a 12,2 kV. Después de cada serie, se introduce a la fuerza nueva solución de polímero en el capilar durante 10 minutos.

Se prepararon muestras mezclando suavemente 2 μl del producto de PCR con 5 μl de agua pura (milliQ). Se estudiaron las mutaciones puntuales de la SEC. ID. n°: 4 (sustitución 1019_80), SEC. ID. n°: 5 (1019_50) y SEC. ID. n°: 6 (2542). Los inventores pueden observar claramente que la resolución mejora con la utilización de timidina (figuras 2 y 3) y que la SEC. ID. n°: 5 (sustitución 1019_50) que no fue detectada con 5 g/100 ml de P(AM-PDMA)18 se detecta con 5 g/100 ml de P(AM-PDMA)18+ 2,5 g/100 ml de timidina (figura 1). En cada sustitución una muestra de un paciente heterocigótico se comparó con una de un homocigótico. Los datos demuestran claramente que la adición de timidina a las concentraciones de 2,5 g/100 ml, aumentan la resolución entre el ADN homocigótico y heterocigótico, y proporcionan una detección clara de la presencia de la mutación (pico múltiple para el electroforegrama del heterocigoto).

Ejemplo 2

Comparación de la detección de diferentes sustituciones entre:

- P(AM-PDMA)20 a 5 g/100 ml + sybrgreen 1X (Molecular Probes) en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM), y
- P(AM-PDMA)20 a 5 g/100 ml + citidina a 2,5 g/100 ml + sybrgreen 1X en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM).

Cadenas laterales de PDMA con $R_0=0,015$ y $A_0=0,01$ y P(AM-PDMA)20 se prepararon según los protocolos presentados en (V. Barbier, B.A. Buchholz, A.E. Barron, J.L. Viovy, *Electrophoresis*, 23, 1441, (2002)) con $[(NH_4)_2S_2O_8]/[AM]=0,1\%$ y $[Na_2S_2O_5]/[AM]=0,015\%$.

Se realizaron separaciones en un ABI 310 (Applied Biosystems) a 30°C. Se utilizaron capilares descubiertos de sílice fundida (Polymicro), 50 μm de diámetro interno, 61 cm de longitud (50 cm para la ventana de detección). La inyección es electrocinética (2,5 kV durante 30 s). La electroforesis previa se realiza a 12,2 kV durante 5 minutos. La separación se realiza a 12,2 kV. Después de cada serie, se introduce a la fuerza nueva solución de polímero en el capilar durante 10 minutos.

Se prepararon muestras mezclando suavemente 2 μl del producto de PCR con 5 μl de agua pura (milliQ). Se estudiaron las mutaciones puntuales de la SEC. ID. n°: 2 (sustitución 2501) y SEC. ID. n°: 6 (2542). La mutación de la SEC. ID. n° 2 (sustitución 2501) que no fue detectada con 5 g/100 ml de P(AM-PDMA)20 se detecta con 5 g/100 ml de P(AM-PDMA)20+ 2,5 g/100 ml de citidina (figura 4) y la resolución de la mutación la SEC. ID. n° 6 (sustitución 2542) se mejoró utilizando 5 g/100 ml de P(AM-PDMA)20 + 2,5 g/100 ml de citidina en comparación con 5 g/100 ml de P(AM-PDMA)20 (figura 5). En cada sustitución una muestra de un paciente heterocigótico se compara con una de un homocigótico. Los datos demuestran claramente que la adición de citidina, a las concentraciones de 2,5 g/100 ml, aumentan la resolución entre el ADN homocigótico y heterocigótico, y proporcionan una detección clara de la presencia de la mutación (pico múltiple para el electroforegrama del heterocigoto).

Ejemplo 3

Comparación de la detección de diferentes sustituciones entre:

- P(AM-PDMA)20 a 5 g/100 ml + sybrgreen 1X (Molecular Probes) en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM),
- P(AM-PDMA)20 a 5 g/100 ml + timidina a 5 g/100 ml + sybrgreen 1X en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM),

ES 2 348 724 T3

- P(AM-PDMA)20 a 5 g/100 ml + citidina a 5 g/100 ml + sybrgreen 1X en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM), y
- P(AM-PDMA)20 a 5 g/100 ml + timidina a 2,5 g/100 ml + citidina a 2,5 g/100 ml + sybrgreen 1X en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM).

Se realizaron separaciones en un ABI 310 (Applied Biosystems) a 30°C. Se utilizaron capilares descubiertos de sílice fundida (Polymicro), 50 μ m de diámetro interno, 61 cm de longitud (50 cm para la ventana de detección). La inyección es electrocinética (2,5 kV durante 30 s). La electroforesis previa se realiza a 12,2 kV durante 5 minutos. La separación se realiza a 12,2 kV. Después de cada serie, se introduce a la fuerza nueva solución de polímero en el capilar durante 10 minutos.

Se prepararon muestras mezclando suavemente 2 μ l del producto de PCR con 5 μ l de agua pura (milliQ). Se estudió la mutación puntual de la SEC. ID. n°: 2 (sustitución 2501). Esta sustitución no se detecta con 5 g/100 ml de P(AM-PDMA)20 (sólo un pico). Se detecta con 5 g/100 ml de P(AM-PDMA)20 + 2,5 g/100 ml de citidina y 5 g/100 ml de P(AM-PDMA)20 + 2,5 g/100 ml de timidina (dos picos) y la resolución se mejora con 5 g/100 ml de P(AM-PDMA)20 + 2,5 g/100 ml de citidina + 2,5 g/100 ml de timidina (tres picos) (figura 6). En cada sustitución una muestra de un paciente heterocigótico se compara con una de un homocigótico. A igual concentración de nucleósido, la resolución es mejor en el caso de una mezcla igual de citidina y timidina, que con citidina sola o timidina sola. Esto demuestra el efecto sinérgico de tener en el medio de separación dos compuestos aditivos diferentes, capaces de conseguir interacciones de emparejamiento de bases con nucleótidos diferentes.

Ejemplo 4

Comparación de la detección de diferentes sustituciones entre:

- P(AM-PDMA)20 a 5 g/100 ml + citidina a 5 g/100 ml + sybrgreen 1X (Molecular Probes) en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM),
- P(AM-PDMA)20 a 5 g/100 ml + citidina a 1 g/100 ml + sybrgreen 1X en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM),
- P(AM-PDMA)20 a 5 g/100 ml + citidina a 2,5 g/100 ml + sybrgreen 1X en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM).

Se realizaron separaciones en un ABI 310 (Applied Biosystems) a 30°C. Se utilizaron capilares descubiertos de sílice fundida (Polymicro), 50 μ m de diámetro interno, 61 cm de longitud (50 cm para la ventana de detección). La inyección es electrocinética (2,5 kV durante 30 s). La electroforesis previa se realiza a 12,2 kV durante 5 minutos. La separación se realiza a 12,2 kV. Después de cada serie, se introduce a la fuerza nueva solución de polímero en el capilar durante 10 minutos.

Se prepararon muestras mezclando suavemente 2 μ l del producto de PCR con 5 μ l de agua pura (milliQ). Se estudió las mutaciones puntuales de la SEC. ID. n°: 5 (sustituciones 1019_50) y de la SEC. ID. n° 6 (1019_80). Ambas no se detectan con una concentración de citidina inferior o igual a 1 g/100 ml (sólo un pico) y se detectan con una concentración de citidina de 2,5 g/100 ml (dos picos) (figuras 7 y 8).

Ejemplo 5

Comparación de la detección de diferentes sustituciones entre:

- P(AM-PDMA)5 a 5 g/100 ml + sybrgreen 1X (Molecular Probes) en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM),
- P(AM-PDMA)5 a 5 g/100 ml + urea a 15 g/100 ml + sybrgreen 1X en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM),
- P(AM-PDMA)5 a 5 g/100 ml + urea a 24 g/100 ml + sybrgreen 1X en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM).

Se hicieron separaciones en un ABI 310 (Applied Biosystems) a 30°C. Se utilizaron capilares descubiertos de sílice fundida (Polymicro), 50 μ m de diámetro interno, 61 cm de longitud (50 cm para la ventana de detección). La inyección es electrocinética (2,5 kV durante 30 s). La electroforesis previa se realiza a 12,2 kV durante 5 minutos. La separación se realiza a 12,2 kV. Después de cada serie, se introduce a la fuerza nueva solución de polímero en el capilar durante 10 minutos.

Se prepararon muestras mezclando suavemente 2 μ l del producto de PCR con 5 μ l de agua pura (milliQ). Se estudió las mutaciones puntuales de la SEC. ID. n°: 3 (sustituciones 1019) y de la SEC. ID. n° 1 (2383). Ambas se detectan cuando no se añade urea a la matriz y no se detectan cuando la concentración de urea en la matriz es de 15 g/100

ES 2 348 724 T3

ml. Cuando la concentración de urea en la matriz es de 24 g/100 ml, la mutación de la SEC. ID. n° 1 (2383) no se detecta todavía y la SEC. ID. n° 5 (1019) se detecta con una resolución menor que en el caso sin urea (figura 9). Esto demuestra que los aditivos conocidos favorecen la desnaturalización del ADN bicatenario pero no pueden conducir a interacciones de emparejamiento de bases con ácidos nucleicos, tales como la urea, propuesta para la resolución de la mutación en la técnica anterior, realmente tiene un efecto sobre la resolución de dobles cadenas heterogéneas que es perjudicial, y opuesto a éste de aditivos de la invención.

Ejemplo 6

Comparación de la detección de la mutación puntual de la SEC. ID. n° 6 (sustitución 2542) entre:

- Poliacrilamida lineal a 5 g/100 ml + sybreen 1X (Molecular Probes) en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM), y
- Poliacrilamida lineal a 5 g/100 ml + timidina a 2,5 g/100 ml + citidina a 2,5 g/100 ml + sybreen 1X en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM),

Se realizaron separaciones en un ABI 310 (Applied Biosystems) a 30°C. Capilares descubiertos de sílice fundida (Polymicro), 50 µm de diámetro interno, 61 cm de longitud (50 cm para la ventana de detección) se revistieron según el protocolo presentado en Chiari M., Cretich M., Horvath J. *Electrophoresis*, 2000, 21, 1521-1526, antes de su utilización. La inyección es electrocinética (2,5 kV durante 30 s). La electroforesis previa se realiza a 12,2 kV durante 5 minutos. La separación se realiza a 12,2 kV. Después de cada serie, se introduce a la fuerza nueva solución de polímero en el capilar durante 10 minutos.

Se prepararon muestras mezclando suavemente 2 µl del producto de PCR con 5 µl de agua pura (milliQ). La figura 6 demuestra claramente que la resolución mejora con la utilización de nucleótidos. Se comparó una muestra de un paciente heterocigótico con la de un homocigótico.

Ejemplo 7

Detección de una sustitución en una zona rica en GC del exón 8 del gen RB1.

Esta mutación, del tipo de una transición C→T (código con nomenclatura g 59695 C→T/arg 255 terminación) introduce un codón de terminación en una zona rica en GC del gen, y es de este modo una mutación perjudicial. Es una mutación muy repetida, y por eso importante para detectar por diagnóstico de retinoblastoma, pero no se detecta en DHPLC.

Se realizaron separaciones con P(AM-PDMA) a 5 g/100 ml + timidina a 2,5 g/100 ml + citidina a 2,5 g/100 ml + sybreen 1X en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM) en un ABI 310 (Applied Biosystems) a 30°C. Se utilizaron capilares descubiertos de sílice fundida (Polymicro), 50 µm de diámetro interno, 61 cm de longitud (50 cm para la ventana de detección). La inyección es electrocinética (2,5 kV durante 30 s). La electroforesis previa se realiza a 12,2 kV durante 5 minutos. La separación se realiza a 15 kV. Después de cada serie, se introduce a la fuerza nueva solución de polímero en el capilar durante 10 minutos.

Se prepararon muestras mezclando suavemente 2 µl del producto de PCR con 5 µl de agua pura (milliQ). La figura 11 muestra la detección de la mutación en 2 series sucesivas. La figura 13 muestra la secuencia del amplicón con los cebadores indicados en letra negrita (SEC. ID. n° 7).

Ejemplo 8

El multiplaje de tamaño permite la detección de múltiples mutaciones en la misma serie.

Se realizaron separaciones con P(AM-PDMA) a 5 g/100 ml + sybreen 1X en tampón Tris (50 mM) Taps (50 mM) EDTA (2 mM) en un ABI 310 (Applied Biosystems) a 30°C. Se utilizaron capilares descubiertos de sílice fundida (Polymicro), 50 µm de diámetro interno, 61 cm de longitud (50 cm para la ventana de detección). La inyección es electrocinética (2,5 kV durante 30 s). La electroforesis previa se realiza a 12,2 kV durante 5 minutos. La separación se realiza a 15 kV. Después de cada serie, se introduce a la fuerza nueva solución de polímero en el capilar durante 10 minutos.

Se prepararon muestras mezclando suavemente 2 µl del producto de PCR con 5 µl de agua pura (milliQ).

La figura 12 representa una única serie con 15 fragmentos de BCI/Ex (gen BRCA1) de 254 pb, 358 pb, 480 pb y 627 pb de tamaño se realizó en una longitud efectiva de 50 cm, capilar de 50 µm de d.i. a 30°C y 200 V/cm. La mutación es la misma para todos los fragmentos, solo difiere el tamaño de un pico al otro. Se detectaron todas las mutaciones.

Las características de los fragmentos se proporcionan en la figura 14.

REIVINDICACIONES

1. Método para analizar la presencia o ausencia de por lo menos una mutación en una cadena de ácidos nucleicos emparejados en forma de doble cadena que comprende por lo menos las etapas siguientes:

- poner en contacto en un medio líquido dicha doble cadena, susceptible de incluir por lo menos un emparejamiento erróneo, con por lo menos un compuesto que puede experimentar una interacción específica de emparejamiento de bases con dicho emparejamiento erróneo, utilizándose dicho(s) compuesto(s) en una concentración combinada de por lo menos 10 g/l en dicho medio y estando seleccionado de entre un oligonucleótido que tiene una longitud inferior a 5 nucleótidos, un nucleósido, una base o una mezcla de los mismos y,
- analizar dicho emparejamiento erróneo por un método analítico.

2. Método según la reivindicación 1, en el que las cadenas de ácidos nucleicos emparejadas en forma de doble cadena son dos cadenas de ADN que son total o parcialmente complementarias.

3. Método para llevar a cabo el análisis electroforético de doble cadena heterogénea "EHDA" en una muestra de ácido nucleico susceptible de incluir por lo menos una doble cadena heterogénea, comprendiendo dicho método por lo menos las etapas siguientes:

- poner en contacto en un medio líquido dicha muestra de ácido nucleico susceptible de incluir por lo menos una doble cadena heterogénea, con por lo menos un compuesto que puede experimentar una interacción específica de emparejamiento de bases con por lo menos un emparejamiento erróneo de dicha doble cadena heterogénea, siendo utilizados dicho(s) compuesto(s) a una concentración combinada de por lo menos 10 g/l de dicho medio y estando seleccionado de entre un oligonucleótido que tiene una longitud inferior a 5 nucleótidos, un nucleósido, una base o una mezcla de los mismos y,
- analizar la presencia de dicha doble cadena heterogénea gracias a su movilidad electroforética.

4. Método según la reivindicación 3, que comprende una etapa preliminar de desnaturalizar la muestra de ácido nucleico y renaturalizarla en condiciones convenientes para conseguir dobles cadenas tanto heterogéneas como homogéneas.

5. Método para analizar la presencia o ausencia de por lo menos una mutación en una cadena individual de ácido nucleico en un medio líquido que comprende por lo menos las etapas siguientes:

- a) poner en contacto dicho ácido nucleico susceptible de incluir por lo menos una mutación con una sonda de ácido nucleico injertada en un soporte sólido,
- b) permitir la hibridación de por lo menos una parte de dicha cadena de ácido nucleico con la sonda de ácido nucleico injertada,
- c) lavar las cadenas no hibridadas, y
- d) analizar dicha mutación por un método analítico,

en el que las etapas a) y/o c) se realizan en presencia de por lo menos un compuesto que puede experimentar una interacción específica de emparejamiento de bases con dicha mutación, estando dicho compuesto a una concentración de por lo menos 1 g/l y estando seleccionado de entre un oligonucleótido que tiene una longitud inferior a 5 nucleótidos, un nucleósido, una base o una mezcla de los mismos.

6. Método según las reivindicaciones 1 a 5, en el que la(s) cadena(s) de ácidos nucleicos es/son de ADN, ARN, ALN, APN monocatenario(s) o de cualquier análogo artificial o natural de ácidos nucleicos.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el compuesto que puede experimentar una interacción específica de emparejamiento de bases incluye por lo menos dos grupos adecuados para el enlace de hidrógeno, en una orientación, polaridad y espaciado compatibles con la creación de interacciones de atracción con por lo menos una de las "bases" A, T, G, C y U.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho compuesto no puede interferir con las reacciones de polimerización de nucleótidos ni incorporarse en una cadena de ADN recién polimerizada.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el oligonucleótido tiene una longitud inferior a 3 nucleótidos y preferentemente inferior a 2 nucleótidos.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto se selecciona de entre adenosina, guanosina, uridina, citidina, timidina y mezclas de los mismos.

ES 2 348 724 T3

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el/los oligonucleótido(s) o nucleósido(s) en la mezcla de oligonucleótidos o nucleósidos no pueden experimentar mutuamente interacción de emparejamiento de bases.
- 5 12. Método según la reivindicación 11, en el que el compuesto incluye citidina y timidina, o citidina y adenosina o guanosina y timidina o guanosina y adenosina.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en el que el/los compuesto(s) se utiliza(n) a una concentración de por lo menos 10 g/l.
- 10 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el/los compuesto(s) se utiliza(n) a una concentración de por lo menos 25 g/l.
- 15 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicho(s) compuesto(s) presenta además por lo menos un sustituyente.
16. Método según la reivindicación 15, en el que dicho sustituyente provoca en dicho compuesto por lo menos uno de los cambios siguientes:
- 20 - aumento de solubilidad,
- cambio en la carga, o
- 25 - cambio en la fricción con un disolvente.
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la mutación que se va a analizar es una mutación puntual.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 y 5 a 17, en el que dicha mutación se analiza por análisis de hibridación.
- 30 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó 6 a 17, en el que dicha mutación se analiza por análisis electroforético utilizando un medio líquido de separación.
- 35 20. Método según la reivindicación 19, en el que dicho medio líquido de separación contiene por lo menos un polímero a una concentración de por lo menos 1%, y preferentemente de por lo menos 3% en peso del peso total de dicho medio.
- 40 21. Método según la reivindicación 19 ó 20, en el que dicho medio líquido de separación contiene por lo menos un polímero seleccionado de entre el grupo constituido por poliacrilamidas N,N-disustituidas y poliacrilamidas N-sustituidas, en el que dichos N-sustituyentes se seleccionan de entre el grupo constituido por alquilo C₁ a C₁₂; alquilo C₁ a C₁₂ halo-sustituido; alquilo C₁ a C₁₂ metoxi-sustituido y alquilo C₁ a C₁₂ hidroxil-sustituido.
- 45 22. Método según la reivindicación 20 ó 21, en el que el medio líquido de separación contiene por lo menos un polímero compuesto de varios segmentos poliméricos, siendo dicho polímero del tipo copolímero de bloque irregular o del tipo polímero irregular en panal y que presenta de media por lo menos tres puntos de unión creados entre los segmentos del polímero de diferente naturaleza química o de configuración.
- 50 23. Método según la reivindicación 22, en el que el polímero comprende por lo menos un tipo de segmento de polímero que presenta, en el medio de separación, una afinidad específica por la pared del canal, y por lo menos un tipo de segmento de polímero que presenta en dicho medio menos o ninguna afinidad para la pared.
24. Método según la reivindicación 20 a 23, en el que dicho polímero contiene acrilamida o acrilamidas sustituidas.
- 55 25. Utilización de un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 para diagnosticar una predisposición a enfermedades genéticas o cánceres asociados o supuestamente asociados a una mutación o mutaciones puntual(es) específica(s) o al diagnóstico o pronóstico de dichas enfermedades o cánceres.
- 60 26. Utilización según la reivindicación 25, en la que dicha enfermedad está asociada por lo menos a una mutación puntual en un gen con predisposición al cáncer de mama humano (BRCA).
27. Utilización de una composición que incluye por lo menos un compuesto que puede experimentar una interacción específica de emparejamiento de bases, estando presente dicho compuesto a una concentración de por lo menos 1 g/l y estando seleccionado de entre un oligonucleótido que tiene una longitud inferior a 5 nucleótidos, un nucleótido, una base o una mezcla de los mismos y, por lo menos un medio líquido de separación para analizar la presencia o ausencia de por lo menos una mutación en una cadena de ácidos nucleicos emparejados en forma de doble cadena.

28. Utilización según la reivindicación 27, en la que el compuesto es tal como se define según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16.

29. Utilización según la reivindicación 27 o la reivindicación 28, en la que dicho medio líquido de separación está definido en las reivindicaciones 20 a 24.

30. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, en la que dicho medio líquido de separación incluye además por lo menos un compuesto seleccionado de entre:

- un polímero tamizador
- un polímero hidrófilo, y
- un polímero tensioactivo.

31. Utilización de una composición que incluye por lo menos un fragmento de ADN que tiene una secuencia nucleica relacionada con un gen en el que la mutación o mutaciones puntual(es) han estado asociadas o supuestamente asociadas a una enfermedad o a un aumento de la predisposición a una enfermedad, y por lo menos un compuesto que puede experimentar una interacción específica de emparejamiento de bases, utilizándose dicho(s) compuesto(s) a una concentración combinada de por lo menos 10 g/l y seleccionándose de entre un oligonucleótido que tiene una longitud inferior a 5 nucleótidos, un nucleótido, una base o una mezcla de los mismos para analizar la presencia o ausencia de por lo menos una mutación en una cadena de ácidos nucleicos emparejados en una forma de doble cadena.

32. Utilización de una composición que incluye por lo menos un compuesto que puede experimentar una interacción específica de emparejamiento de bases, estando presente dicho compuesto a una concentración de por lo menos 1 g/l y seleccionándose de entre un oligonucleótido que tiene una longitud inferior a 5 nucleótidos, un nucleósido, una base o una mezcla de los mismos, y un par de moléculas o grupos que actúan como una sonda de ADN denominada "baliza molecular" para analizar la presencia o ausencia de por lo menos una mutación en una cadena de ácidos nucleicos emparejados en una forma de doble cadena.

33. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 32, para llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24.

34. Método para analizar una mutación en un ácido nucleico que comprende por lo menos las etapas siguientes:

- realizar una reacción en cadena de la polimerasa en dicho ácido nucleico en presencia de por lo menos dos cebadores y una mezcla de compuestos que puede experimentar una interacción por emparejamiento de bases con nucleótidos o un análogo de los mismos, estando dichos compuestos presentes a una concentración combinada de por lo menos 10 g/l, seleccionándose de entre un oligonucleótido que tiene una longitud inferior a 5 nucleótidos, un nucleósido, una base o una mezcla de los mismos y, siendo incapaces de interferir con la reacción en cadena de la polimerasa y,
- analizar y/o cuantificar los fragmentos de ADN obtenidos de este modo.

35. Método según la reivindicación 33, en el que el compuesto es tal como se define según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16.

FIGURA 1

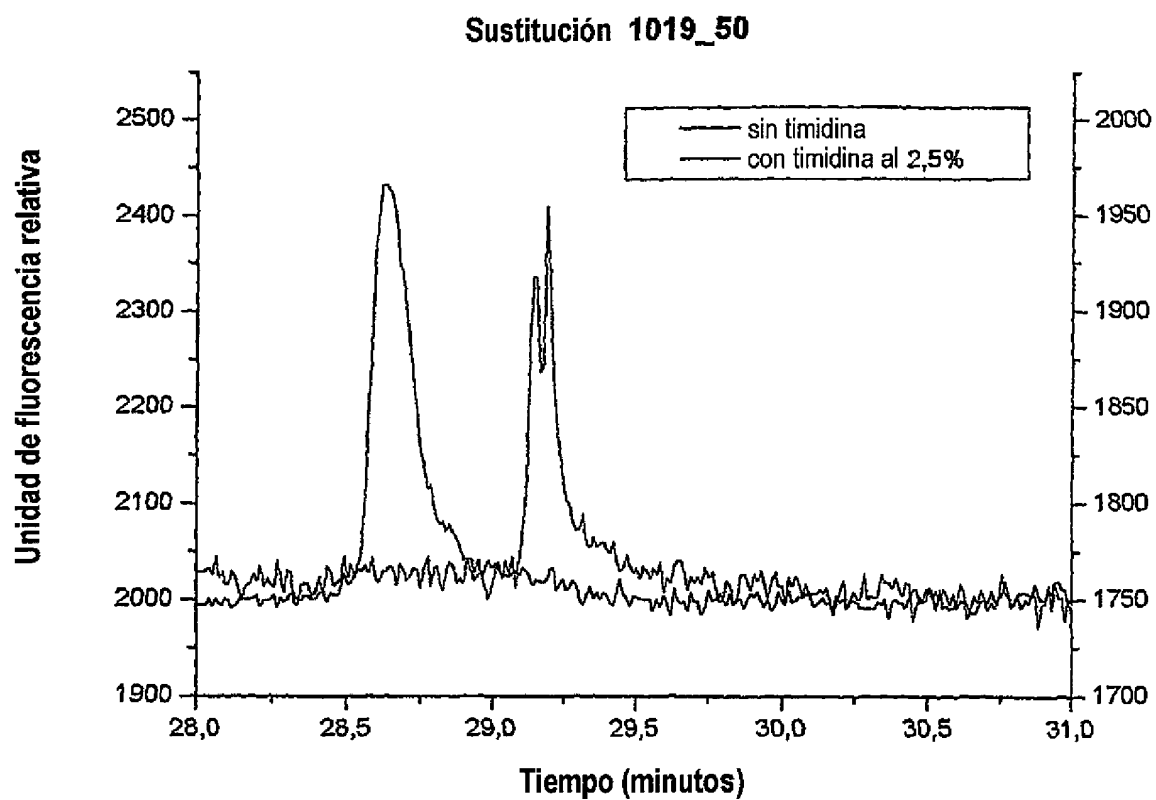


FIGURA 2

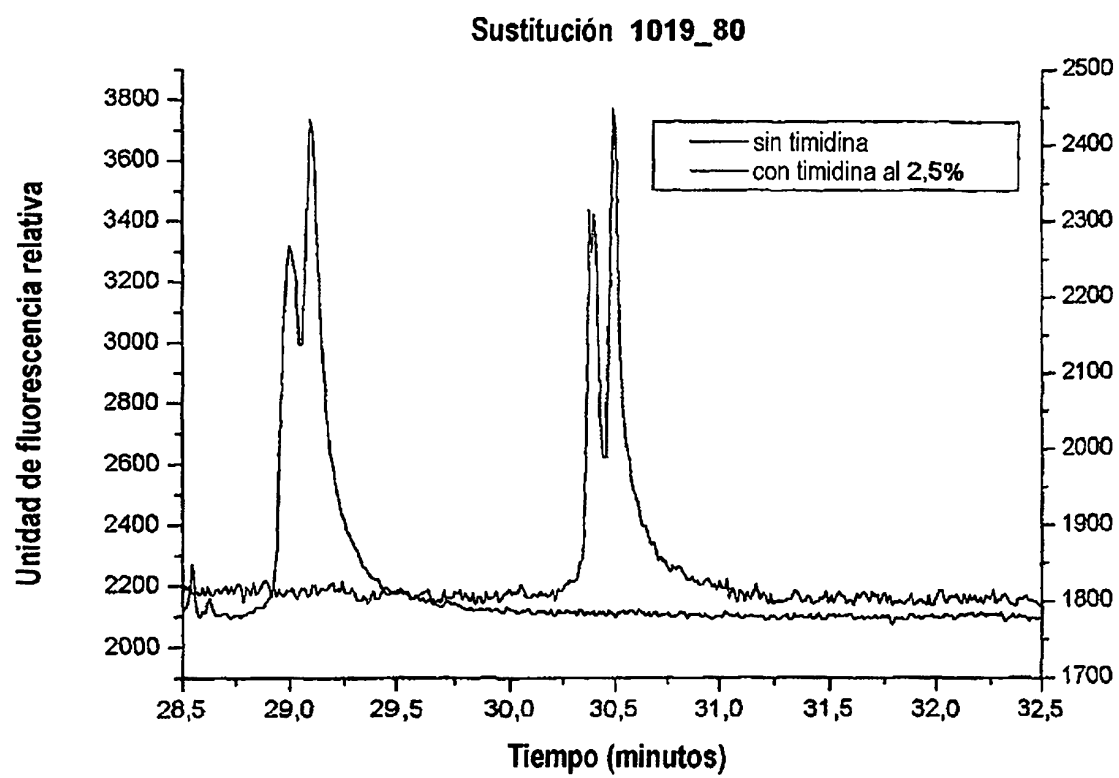


FIGURA 3

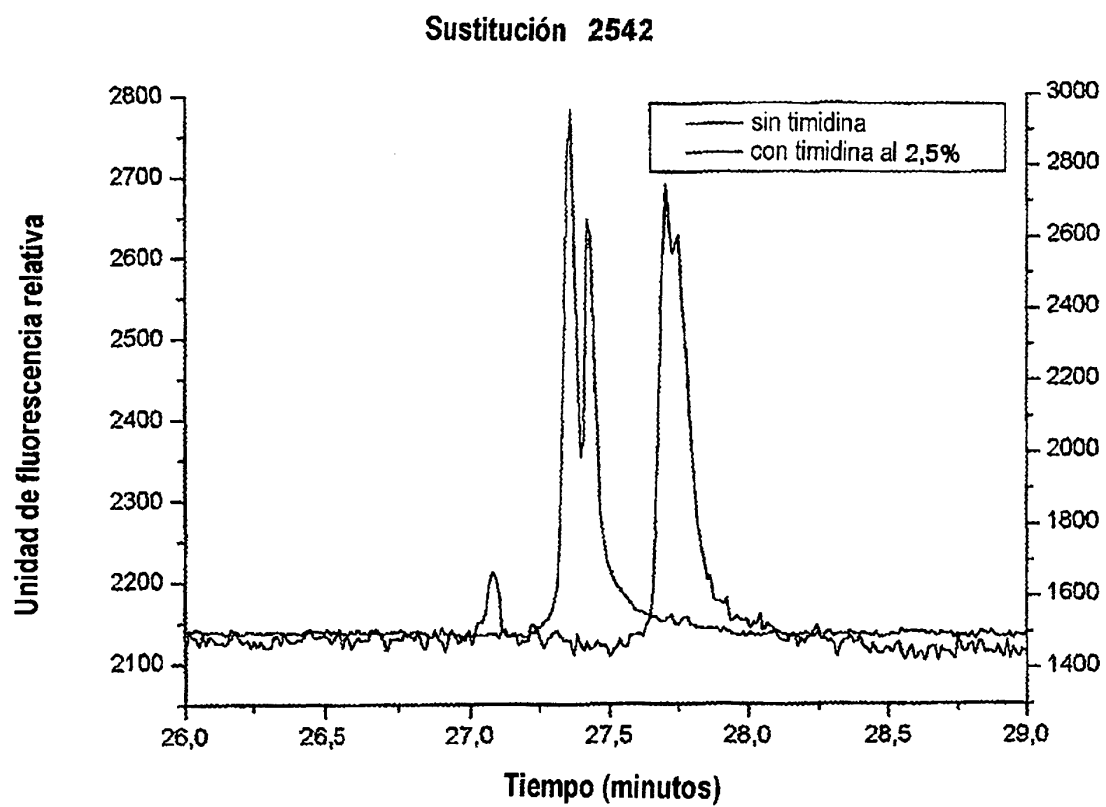


FIGURA 4

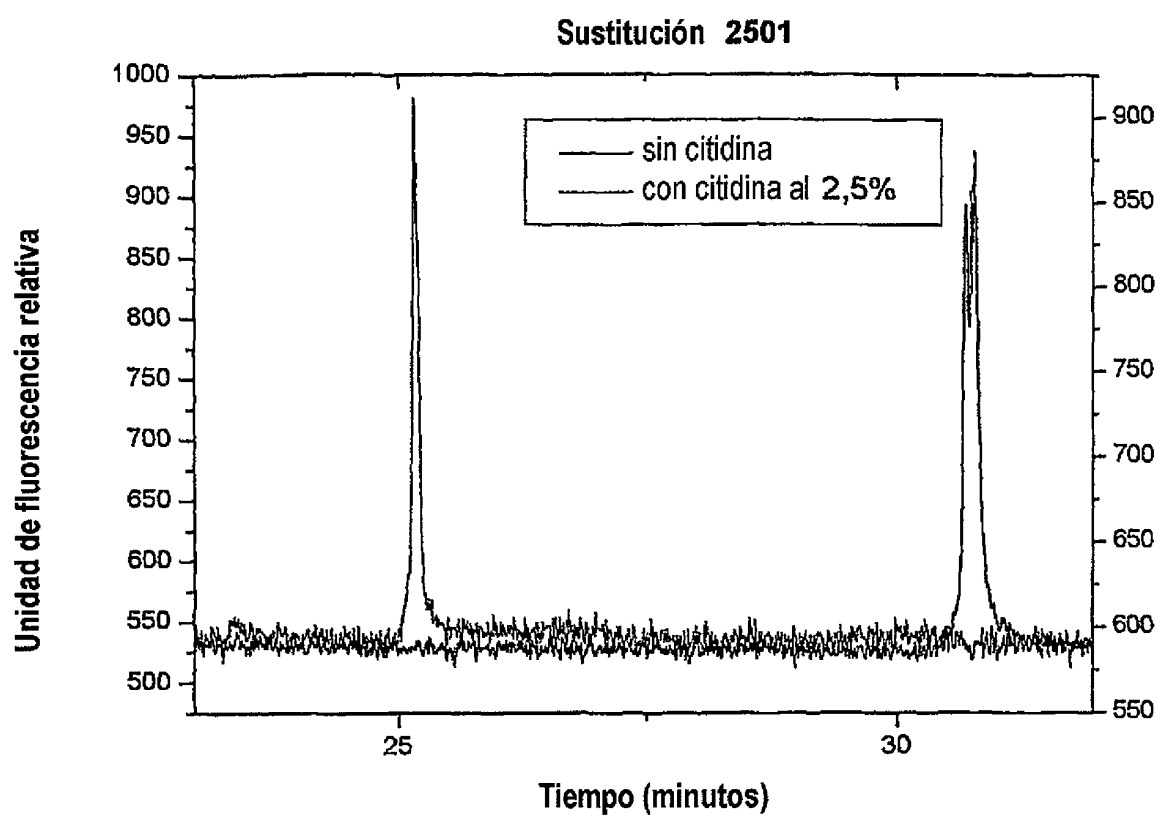


FIGURA 5

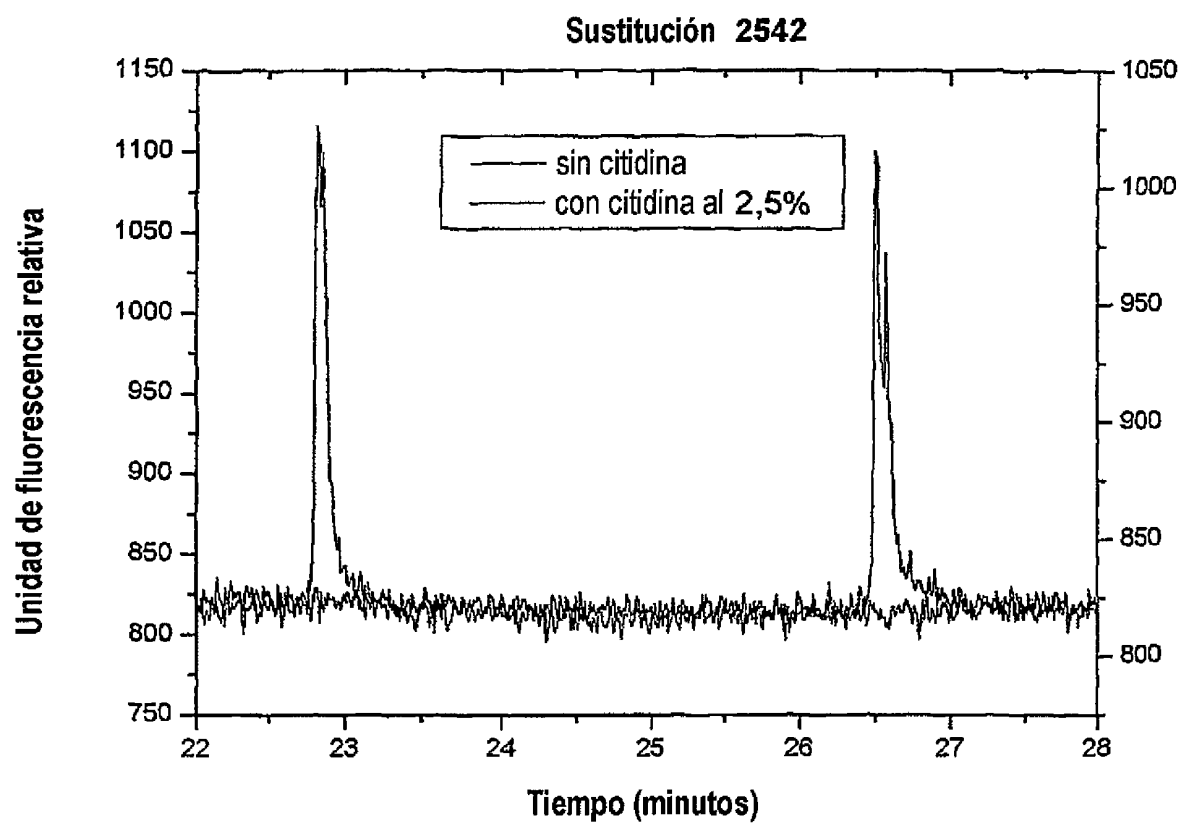


FIGURA 6

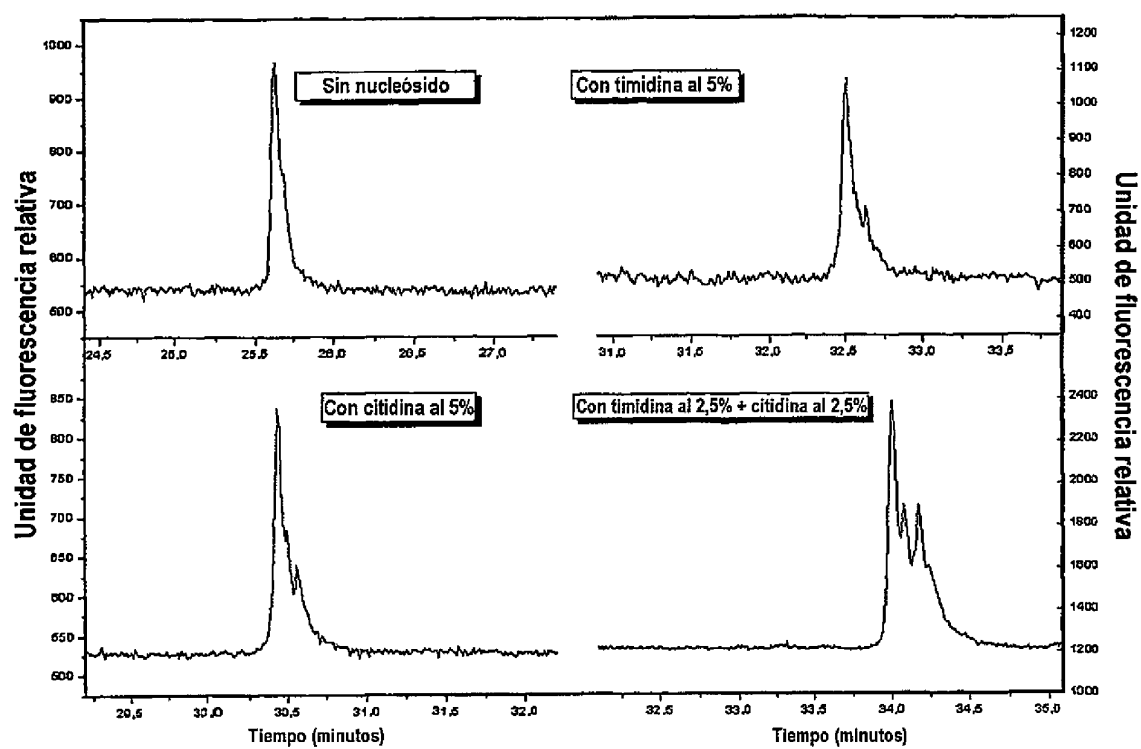


FIGURA 7

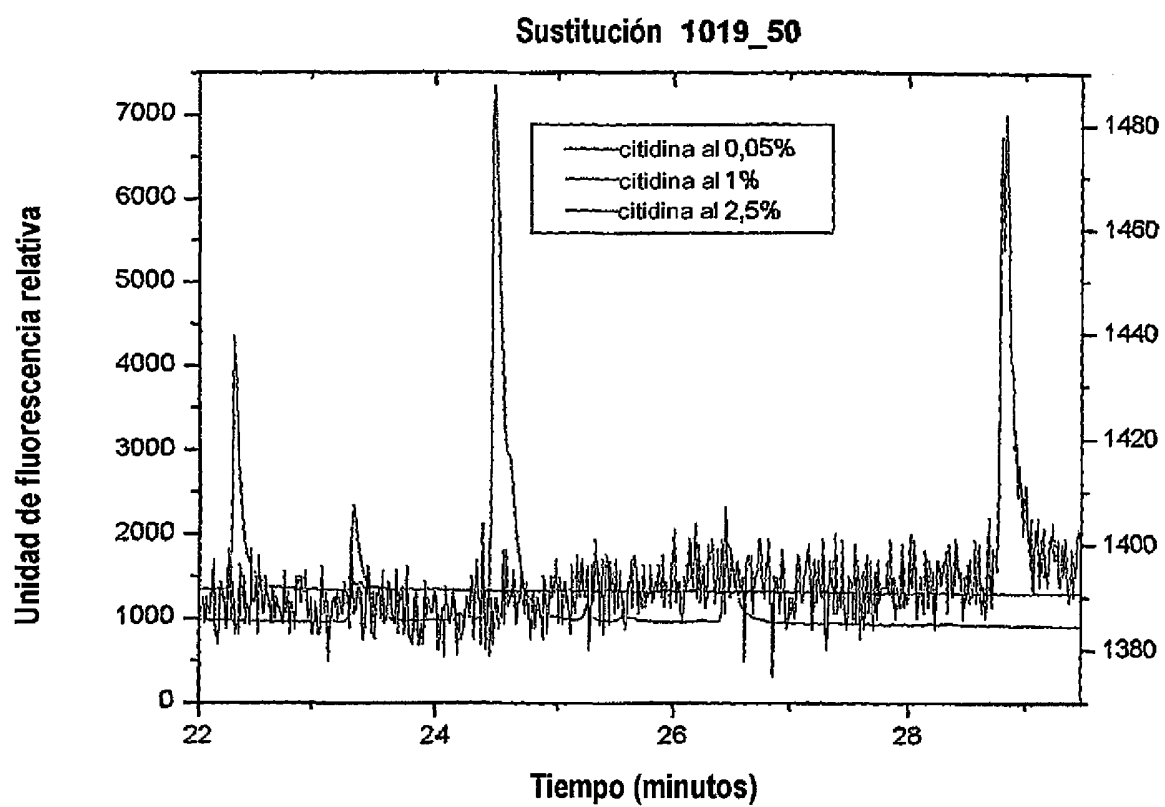


FIGURA 8

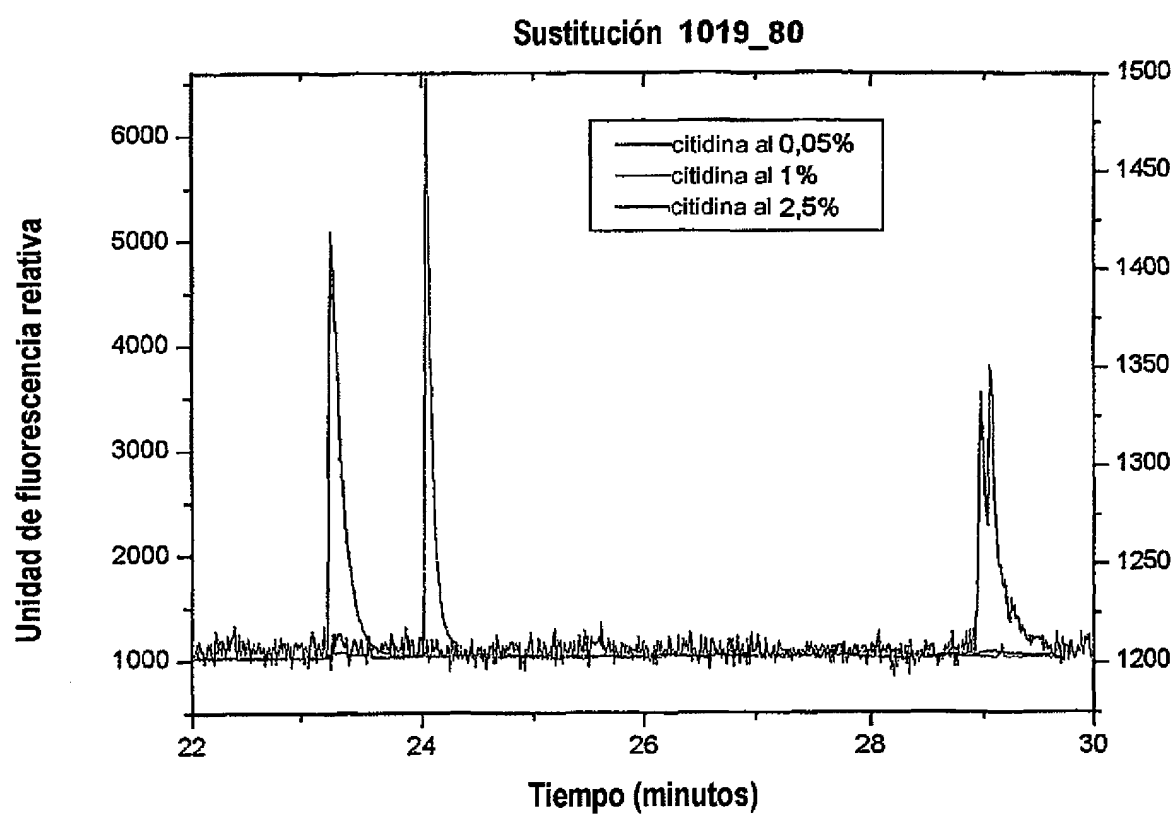


FIGURA 9

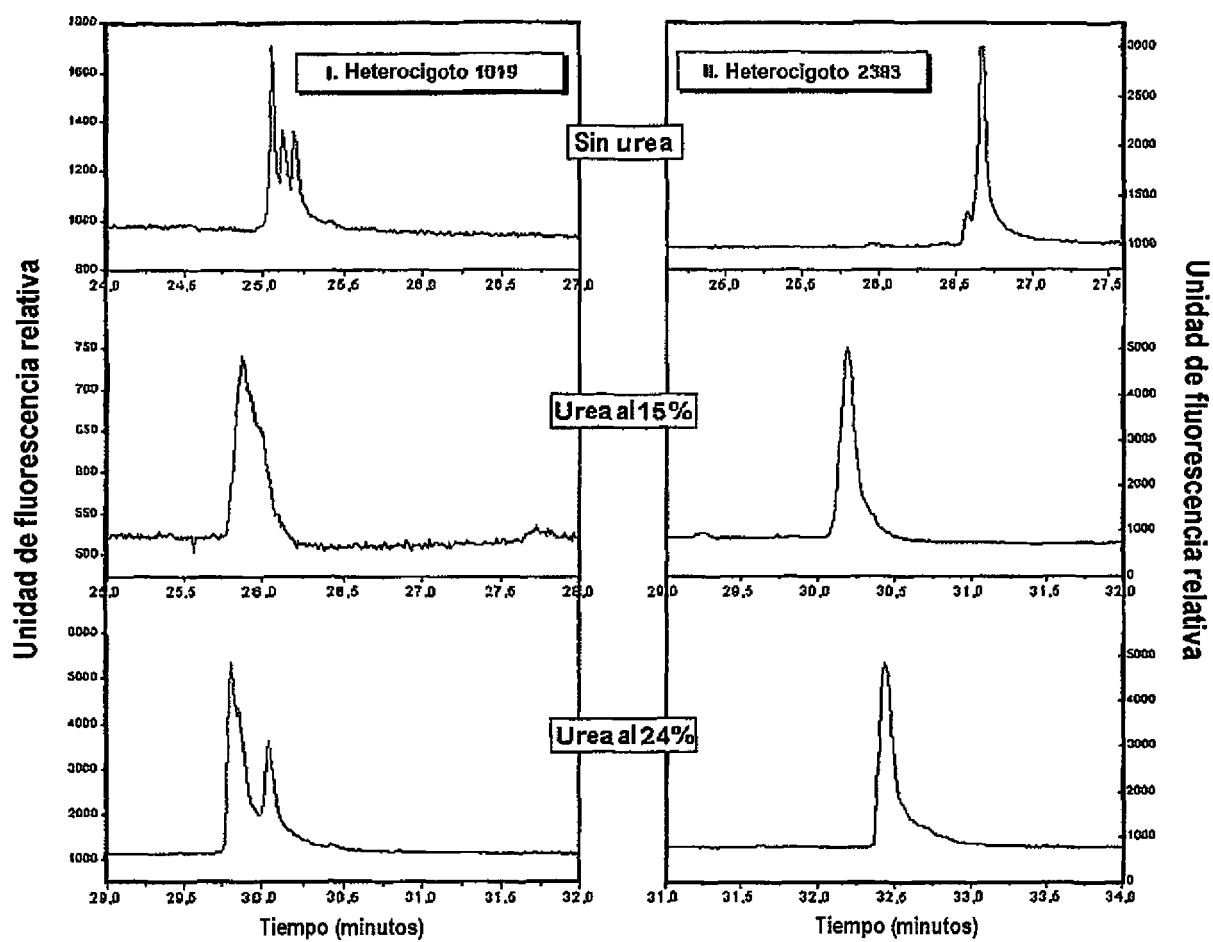


FIGURA 10

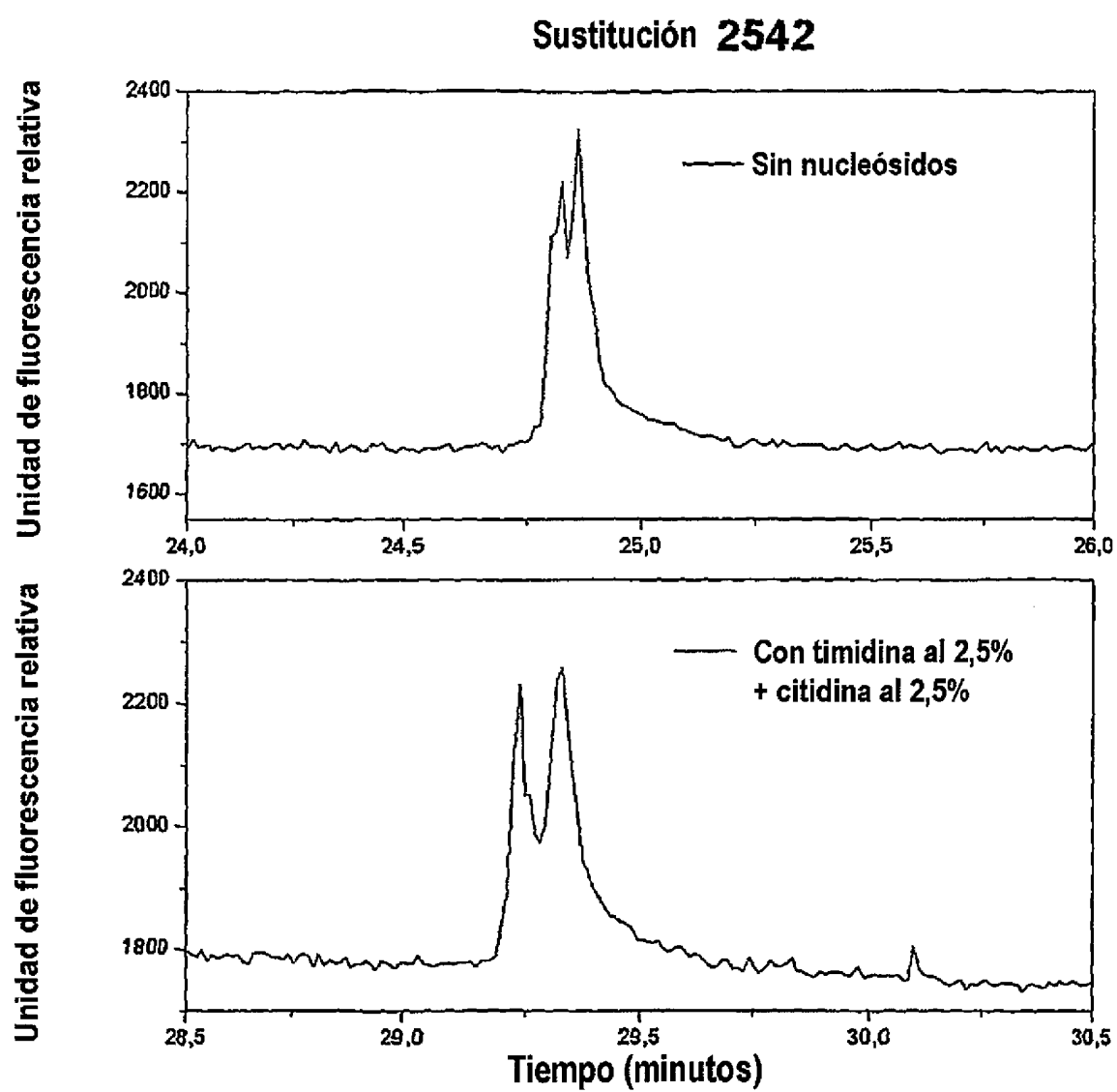


FIGURA 11

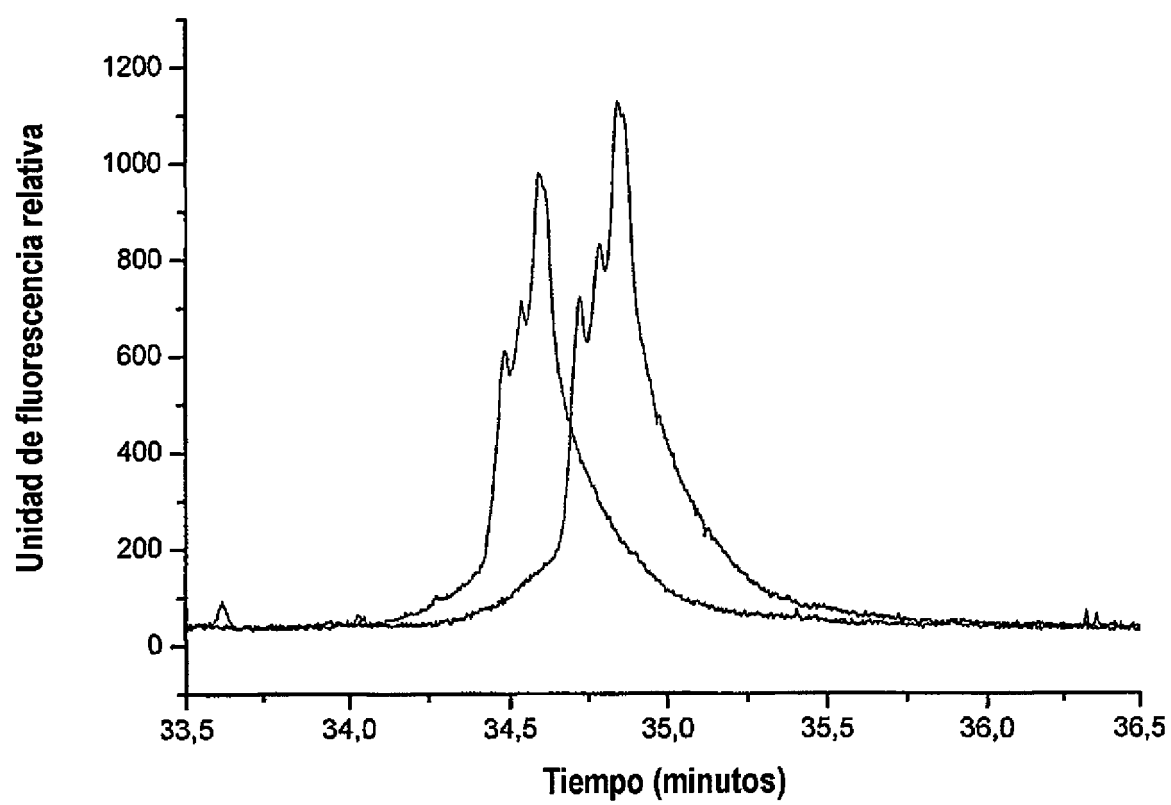


FIGURA 12

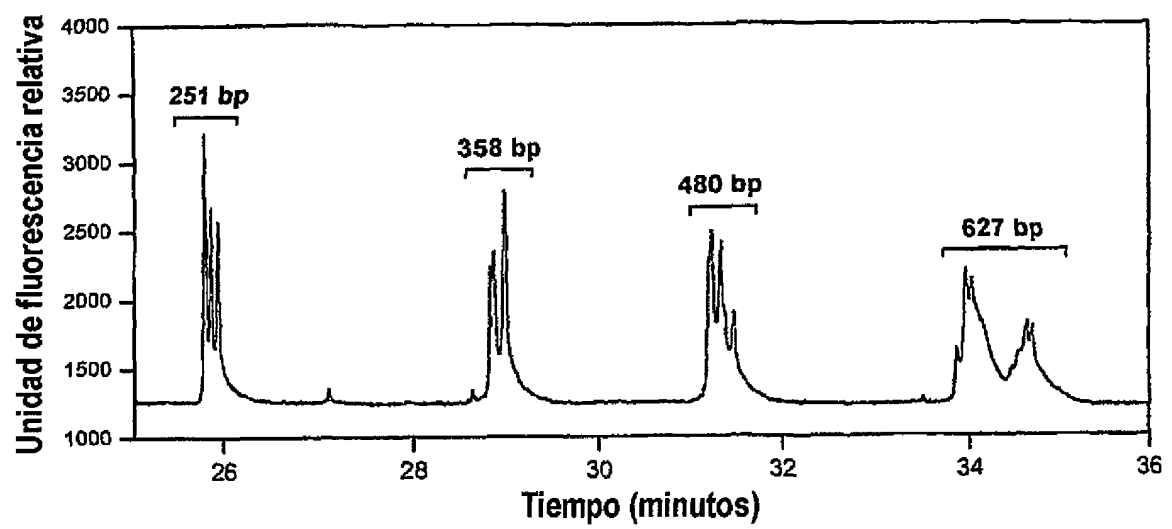


FIGURA 13

RB1	Exón 8	<i>SEC ID NO 7</i>	AGTAGTAGAA TGTTACCAAG ATTATTTTGG ACCTAAGTTA TAGTTAGAAT ACTTCATTAT TTTATATGAT GGATGTACAA TTGTTCTTAT CTAATTTACC ACTTTTACAG AAACAGCTGT TATACCCATT AATGGTTCAC CTCGAACACC CAGGCGAGGT CAGAACAGGA GTGCACGGAT AGCAAAACAA CTAGAAAATG ATACAAGAAT TATTGAAGTT CTCTGTAAAG AACATGAATG TAATATAGAT GAGGTAATTT AACTTCATGA TTTCTTTAAA ACAGTTAAAG TAGATTTAGA TGTAAGTTCT CCCTAACAAT ATTTACTTCT TTTGTTATGA GCATGTTTTT TTTGTAATTA GTGCTAACTC TTTTGCAGTA
------------	--------	--------------------	---

FIGURA 14

Amplicón	Cebador delantero	Cebador inverso	Mutación	Posición	Tamaño (pb)
BC1/EX15	tggcgatgggtttctccttc	tccaatacagcagatgaa	c.G47194A/Val1534Met	101 bp	250
BC1/EX15-358bp	ccatttatctttctaggtcatccc	gctattttctctaaagtgggc	c.G47194A/Val1534Met	140 bp	358
BC1/EX15-480bp	ccagacttctaggctgtcttgcg	gggcttaattaagtataac	c.G47194A/Val1534Met	210 bp	480
BC1/EX15-627bp	cagctgggagataatggtgcctc	gatggattaacagtttcaa	c.G47194A/Val1534Met	277 bp	627