

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 861 353**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6858 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2015 PCT/US2015/031476**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15179339**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2015 E 15796383 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2021 EP 3146080**

54 Título: **Amplificación específica de alelo utilizando una composición de oligonucleótidos cebadores no específicos de alelo y bloqueantes específicos de alelo solapantes**

30 Prioridad:

19.05.2014 US 201462000114 P

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

06.10.2021

73 Titular/es:

**WILLIAM MARSH RICE UNIVERSITY (100.0%)
6100 Main Street
Houston, TX 77005-1892, US**

72 Inventor/es:

**ZHANG, DAVID YU;
WU, RUOJIA y
WANG, JUEXIAO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 861 353 T3

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

DESCRIPCIÓN

Amplificación específica de alelo utilizando una composición de oligonucleótidos cebadores no específicos de alelo y bloqueantes específicos de alelo solapantes

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 62/000.114 presentada el 19 de mayo de 2014.

Listado de secuencias

El listado de secuencias se presenta con la solicitud únicamente en formato electrónico. El archivo de texto del listado de secuencias "14-21013-WO (260947.00251) _SL.txt" se creó el 18 de mayo de 2015 y tiene un tamaño de 13.144 bytes.

Antecedentes

Pequeñas diferencias en la secuencia de ADN y ARN pueden dar lugar a grandes diferencias en la salud física general y el bienestar de los organismos, incluidos los seres humanos. Por ejemplo, un cambio de una sola base en un genoma bacteriano puede llevar a la resistencia a antibióticos, y un cambio de una sola base en un genoma humano puede llevar a la progresión del cáncer. Con la maduración del campo de la genómica y el consiguiente descubrimiento de muchas secuencias y moléculas de biomarcadores de ácidos nucleicos, existe una fuerte demanda por parte de la industria de la biotecnología para crear ensayos de ácidos nucleicos confiables, sólidos, precisos y económicos que pueden discriminar cambios de una sola base. En particular, se han creado muchos ensayos basados en PCR que son específicos de alelo.

Los enfoques basados en PCR para la detección selectiva de mutaciones raras se pueden clasificar ampliamente en dos familias de enfoques: (A) cebadores específicos de alelo y (B) cebadores no específicos de alelo con bloqueantes específicos de alelo.

Ejemplos de cebadores específicos de alelo incluyen el sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS, por sus siglas en inglés), PCR con bloqueantes específicos de alelo (ASB-PCR, por sus siglas en inglés) y PCR TaqMan específica de alelo competitiva (castPCR). Ejemplos de (B) incluyen la PCR con bloqueante de APN y la amplificación conjunta a una PCR con temperatura de desnaturalización más baja (COLD-PCR).

Antes de la presente invención, los cebadores específicos de alelo generalmente han sido superiores (mayor sensibilidad a las mutaciones) para detectar mutaciones conocidas de una sola base, mientras que los cebadores no específicos de alelo con bloqueantes específicos de alelo se aplican generalmente para la detección de múltiples mutaciones agrupadas estrechamente (puntos calientes) o secuencias con mutaciones desconocidas.

Los cebadores de PCR específicos de alelo tal como ARMS, ASB-PCR, castPCR generalmente poseen un nucleótido específico de alelo en la posición más 3' del cebador. Los cebadores de PCR específicos de alelo emplean la discriminación de la enzima ADN polimerasa para extender específicamente bases emparejadas de manera adecuada, pero están limitados por el hecho de que, cuando se produce un evento incorrecto de extensión de la ADN polimerasa, el nucleótido del alelo raro que formaba parte del cebador se incorpora a la plantilla y, posteriormente, los ciclos de amplificación se vuelven inespecíficos. Los cebadores de PCR específicos de alelo son solo específicos hasta el primer evento de amplificación incorrecto. La detección específica de alelos con cebadores no específicos de alelo requiere un control preciso de la temperatura de desnaturalización y un análisis restringido de secuencias más pequeñas. La detección específica de alelos con cebadores no específicos de alelo tiene una baja sensibilidad a las mutaciones y es más vulnerable a los errores introducidos por la polimerasa.

El documento US2014017685 se refiere a métodos, composiciones y kits para determinar la presencia/ausencia de una secuencia de un ácido nucleico variante.

Por tanto, se necesita una composición de oligonucleótidos cebadores no específicos de alelo y bloqueantes específicos de alelo con una mayor amplificación específica de alelo y una mayor sensibilidad a las mutaciones. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos enfoques adecuados para la detección de una pequeña cantidad de diana en un gran exceso de variante es un requisito previo para las aplicaciones de diagnóstico. Por tanto, la presente divulgación proporciona una composición de oligonucleótidos cebadores no específicos de alelo y bloqueantes específicos de alelo para proporcionar una herramienta más precisa y eficaz para aplicaciones de diagnóstico de enfermedades tales como, diagnóstico de cáncer y similares.

Sumario

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación se refiere a una composición

de superposición de un oligonucleótido cebador no específico de alelo y un oligonucleótido bloqueante específico de alelo para amplificación específica de alelo.

La presente divulgación proporciona una composición de oligonucleótidos que incluye un oligonucleótido bloqueante y un primer cebador. El oligonucleótido bloqueante incluye una primera secuencia que tiene una subsecuencia diana neutra y una subsecuencia variable bloqueante. Sin embargo, en algunos ejemplos, el oligonucleótido bloqueante puede no incluir la subsecuencia variable bloqueante si el ácido nucleico diana a detectar es para la detección de una inserción. La subsecuencia variable bloqueante está flanqueada en sus extremos 3' y 5' por la subsecuencia diana neutra y es continua con la subsecuencia diana neutra. El primer oligonucleótido cebador es suficiente para inducir la extensión enzimática; en el presente documento, el primer oligonucleótido cebador incluye una segunda secuencia. La segunda secuencia se solapa con el extremo 5' de la subsecuencia diana neutra en al menos 5 nucleótidos de manera que la segunda secuencia incluye una subsecuencia solapante y una subsecuencia no solapante. La segunda secuencia no incluye ninguna secuencia homóloga con la subsecuencia variable bloqueante.

La presente divulgación se refiere además a un método para la amplificación de una secuencia diana. El método incluye obtener una muestra que contenga una o más copias de un primer ácido nucleico que tiene una secuencia variante y al menos una copia de un segundo ácido nucleico; en el presente documento, el segundo ácido nucleico tiene la secuencia diana. La secuencia diana y la secuencia variante incluyen cada una, una subsecuencia homóloga y una subsecuencia variable. La subsecuencia variable incluye además al menos un nucleótido. Asimismo, la subsecuencia variable de la secuencia diana es una subsecuencia específica de diana y la subsecuencia variable de la secuencia variante es una subsecuencia no específica de diana.

Después de obtener la muestra, se introduce un oligonucleótido bloqueante en la muestra. El oligonucleótido bloqueante incluye una primera secuencia que tiene una subsecuencia diana neutra y una subsecuencia variable bloqueante. La subsecuencia diana neutra es complementaria a una porción de la subsecuencia homóloga y la subsecuencia variable bloqueante es complementaria a la subsecuencia no específica de diana. Adicionalmente, la subsecuencia variable bloqueante está flanqueada en sus extremos 3' y 5' por la subsecuencia diana neutra y es continua con la subsecuencia diana neutra.

Después de ello, se introduce un primer oligonucleótido cebador en la muestra. El primer oligonucleótido cebador es suficiente para inducir la extensión enzimática. El primer oligonucleótido cebador incluye una segunda secuencia, que es complementaria a una segunda porción de la subsecuencia homóloga. Adicionalmente, la segunda secuencia se solapa con el extremo 5' de la subsecuencia diana neutra en al menos 5 nucleótidos de manera que la segunda secuencia incluye una subsecuencia solapante y una subsecuencia no solapante. La segunda secuencia no incluye ninguna secuencia complementaria a la subsecuencia variable.

En la siguiente etapa, se introducen en la muestra una ADN polimerasa, nucleósidos trifosfato y uno o más reactivos necesarios para la amplificación de ácidos nucleicos basada en polimerasa; y la muestra se hace reaccionar en condiciones suficientes para lograr la amplificación de ácidos nucleicos.

Una ventaja de la presente divulgación es la mejora de la sensibilidad a las mutaciones, que coincide y/o supera a los enfoques de cebadores específicos de alelo.

Otra ventaja de la presente divulgación es un protocolo de ciclado térmico simple de 2 etapas con una resistencia térmica significativa (8 °C).

Otra ventaja más de la presente divulgación es proporcionar reactivos bloqueantes y cebadores de ADN económicos sin modificaciones complejas de nucleótidos o cadenas principales.

Otra ventaja más de la presente divulgación es la compatibilidad con enzimas de alta fidelidad.

Otra ventaja más de la presente divulgación es que el bloqueante específico de alelo se une de manera más fuerte a la variante que a la diana, de modo que el cebador no específico de alelo desplaza más favorablemente a los bloqueantes unidos a la diana en comparación con los bloqueantes unidos a la variante. La ventaja de usar cebadores no específicos de alelo es que las variantes amplificadas de manera simulada dan como resultado productos de amplificación (amplicones) que llevan la secuencia variante en lugar de la secuencia diana. Por tanto, la especificidad se intensifica en cada ciclo.

Este sumario se proporciona para presentar la divulgación, determinados aspectos, ventajas y características novedosas de la invención de forma simplificada que se describen con más detalle a continuación en la descripción detallada. Este sumario no pretende identificar características clave o características esenciales de la materia objeto reivindicada, ni pretende que se use como limitante del alcance de la materia objeto reivindicada.

Breve descripción de los dibujos

El sumario anterior, así como la siguiente descripción detallada de realizaciones ilustrativas, se entenderán mejor

cuando se lean junto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la presente divulgación, en los dibujos se muestran construcciones ilustrativas de la divulgación. Sin embargo, la divulgación no se limita a métodos e instrumentos específicos divulgados en el presente documento.

- 5 La figura 1 ilustra una representación esquemática de un cebador no específico de alelo y un bloqueante específico de alelo para la amplificación específica de alelo de acuerdo con la presente invención.
 La figura 2 ilustra una representación esquemática de un diseño termodinámico de un cebador y un bloqueante de acuerdo con la presente invención.
 La figura 3 ilustra una representación esquemática del cálculo de los valores de ΔG° a partir de la secuencia de acuerdo con la presente invención. La figura 3 divulga la identificación de las SEQ ID NO: 1, 33, 1, 34, 2, 33, 2, y 34, respectivamente, en orden de aparición.
 10 La figura 4 ilustra una representación esquemática de la detección de alelos raros en el ADN genómico humano de acuerdo con el ejemplo 1. La figura 4 divulga la identificación de las SEQ ID NO: 3-4, 35, 32, 36, y 32, respectivamente, en orden de aparición.
 15 La figura 5 ilustra una representación esquemática de la resistencia térmica rara de acuerdo con el ejemplo 2. La figura 5 divulga la identificación de las SEQ ID NO: 5-6 y 37-38, respectivamente, en orden de aparición.
 La figura 6A ilustra una representación esquemática de una mayor flexibilidad en el diseño de cebadores de acuerdo con el ejemplo 3.
 La figura 6B ilustra una representación esquemática de las secuencias de los ácidos nucleicos de 4 conjuntos de pares de cebador y bloqueante que amplifica el SNP humano rs3789806 de acuerdo con el ejemplo 3. La figura 6B divulga la identificación de las SEQ ID NO: 5-12 y 39-40, respectivamente, en orden de aparición.
 20 La figura 7A ilustra una representación esquemática de la simulación de efectos de $\Delta G^\circ_{\text{rxn1}}$ con $\Delta\Delta G^\circ = 2$ kcal/mol fija de acuerdo con el ejemplo 4.
 La figura 7B(I) ilustra una representación esquemática de una validación experimental en rs4939827 de SMAD7 de acuerdo con el ejemplo 4. La figura 7B(I) divulga la identificación de las SEQ ID NO: 3, 13-16, 4, 17 y 35-36, respectivamente, en orden de aparición.
 25 La figura 7B(II) ilustra una representación esquemática de una validación experimental en rs4939827 de SMAD7 de acuerdo con el ejemplo 4. La figura 7B(II) divulga la identificación de las SEQ ID NO: 3, 18-23, 36 y 35, respectivamente, en orden de aparición.
 30 La figura 8 ilustra una representación esquemática de un bloqueante con región no homóloga 3' de acuerdo con el ejemplo 5. La figura 8 divulga la identificación de las SEQ ID NO: 5, 24 y 37-38, respectivamente, en orden de aparición.
 La figura 9A ilustra una representación esquemática de multiplexación utilizando sondas TaqMan® de acuerdo con el ejemplo 6.
 35 La figura 9B ilustra una representación esquemática de multiplexación utilizando sondas TaqMan® de acuerdo con el ejemplo 6.
 La figura 10 ilustra una representación esquemática de protectores para cebador y bloqueante de acuerdo con el ejemplo 7.
 La figura 11A ilustra una representación esquemática de detección de eliminación (rs200841330 de STAG2) de acuerdo con el ejemplo 8. La figura 11A divulga la identificación de las SEQ ID NO: 25-26 y 41-42, respectivamente, en orden de aparición.
 40 La figura 11B ilustra una representación esquemática de detección de inserción (rs200841330 de STAG2) de acuerdo con el ejemplo 8. La figura 11B divulga la identificación de las SEQ ID NO: 25, 43, 42 y 41, respectivamente, en orden de aparición.
 45 La figura 12 ilustra una representación esquemática de un bloqueante cadena arriba de acuerdo con el ejemplo 9. La figura 12 divulga la identificación de las SEQ ID NO: 27-28 y 44-45, respectivamente, en orden de aparición.
 La figura 13 ilustra una representación esquemática de la amplificación específica de ADN que codifica ARN ribosómico fúngico de acuerdo con el ejemplo 10.
 50 La figura 14 ilustra una representación esquemática de NASP dual de acuerdo con el ejemplo 11. La figura 14 divulga la identificación de las SEQ ID NO: 29, 10, 46-49 y 30-31, respectivamente, en orden de aparición.

Descripción detallada de la invención

- 55 La presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares y con referencia a determinados dibujos, pero la invención no se limita a los mismos, sino solamente a las reivindicaciones. Los dibujos descritos son solamente esquemáticos y no limitantes. En los dibujos, el tamaño de algunos de los elementos puede ser exagerado o estar distorsionado y no estar dibujado a escala con fines ilustrativos. Donde los elementos de la invención se denominan "un" o "uno/a" en la primera aparición y se denominan "el" o "dicho" para las segundas o posteriores apariciones, a menos que se indique otra cosa.

- 60 La presente invención se describirá ahora de manera más completa en lo sucesivo en el presente documento con referencia a los dibujos adjuntos, en los que se muestran algunas, pero no todas las realizaciones de la invención. De hecho, la invención puede realizarse de muchas formas diferentes y no debe interpretarse limitada a las realizaciones establecidas en el presente documento, más bien, estas realizaciones se proporcionan de manera que esta divulgación satisfaga los requisitos legales.

Definición

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto en la materia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "oligonucleótido bloqueante" se refiere a al menos una hebra continua de aproximadamente 12 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud y si así se indica en el presente documento, puede incluir además un grupo funcional o secuencia de nucleótidos en su extremo 3' que previene la extensión enzimática durante un proceso de amplificación tal como la reacción en cadena de la polimerasa.

Como se usa en el presente documento, la expresión "oligonucleótido cebador" se refiere a una molécula que comprende al menos una hebra continua de aproximadamente 12 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud y suficiente para permitir la extensión enzimática durante un proceso de amplificación tal como la reacción en cadena de la polimerasa.

Como se usa en el presente documento, la expresión "subsecuencia diana neutra" se refiere a una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia tanto en un ácido nucleico diana como en un ácido nucleico variante. Por ejemplo, puede existir una secuencia de un ácido nucleico deseado para la amplificación (ácido nucleico diana) en una muestra con una molécula de un ácido nucleico que tiene una secuencia predominantemente homóloga con el ácido nucleico diana con la excepción de una región variable (ácido nucleico variante), teniendo dicha región variable en algún ejemplo solamente una diferencia de un solo nucleótido del ácido nucleico diana. En este ejemplo, la subsecuencia diana neutra es complementaria a al menos una porción de la secuencia homóloga compartida entre los dos ácidos nucleicos, pero no a la región variable. Por tanto, como se usa en el presente documento, la expresión "subsecuencia variable bloqueante" se refiere a una secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido bloqueante que es complementaria a la región variable del ácido nucleico variante.

Como se usa en el presente documento, la expresión "subsecuencia solapante" se refiere a una secuencia de nucleótidos de al menos 5 nucleótidos de un oligonucleótido cebador que es homóloga con una porción de la secuencia oligonucleotídica bloqueante utilizada en una composición como se describe en el presente documento. La subsecuencia solapante del oligonucleótido cebador puede ser homóloga a cualquier porción de la subsecuencia diana neutra del oligonucleótido bloqueante, ya sea 5' o 3' de la subsecuencia variable bloqueante. Por tanto, la expresión "subsecuencia no solapante" se refiere a la secuencia de un oligonucleótido cebador que no es la subsecuencia solapante.

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia diana" se refiere a la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que alberga un alelo deseado, tal como un polimorfismo de un solo nucleótido, para amplificarse, identificarse, o de otro modo aislarse. Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia variante" se refiere a la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que no alberga el alelo deseado. Por ejemplo, en algunos ejemplos, la secuencia variante alberga el alelo de tipo silvestre mientras que la secuencia diana alberga el alelo mutante. Por tanto, en algún ejemplo, la secuencia variante y la secuencia diana derivan de un locus común en un genoma de manera que las secuencias de cada una pueden ser sustancialmente homólogas excepto en una región que alberga el alelo, nucleótido o grupo o nucleótidos deseados que varían entre las dos.

La presente divulgación se refiere a una composición de oligonucleótidos. En una realización de la presente divulgación, la composición de oligonucleótidos incluye un oligonucleótido cebador no específico de alelo y un oligonucleótido bloqueante específico de alelo para la amplificación específica de alelo.

En otra realización de la presente divulgación, la composición de oligonucleótidos incluye un oligonucleótido bloqueante y un primer oligonucleótido cebador. El oligonucleótido bloqueante incluye una primera secuencia que tiene una subsecuencia diana neutra y una subsecuencia variable bloqueante. La subsecuencia variable bloqueante está flanqueada en sus extremos 3' y 5' por la subsecuencia diana neutra y es continua con la subsecuencia diana neutra. En otras palabras, la subsecuencia variable bloqueante puede dividir la subsecuencia diana neutra en dos porciones, una porción en el extremo 3' de la subsecuencia variable bloqueante y una porción en el extremo 5'. El primer oligonucleótido cebador es suficiente para inducir la extensión enzimática; en el presente documento, el primer oligonucleótido cebador incluye una segunda secuencia. La segunda secuencia se solapa con la subsecuencia diana neutra en al menos 5 nucleótidos de manera que la segunda secuencia incluye una subsecuencia solapante y una subsecuencia no solapante. La segunda secuencia no incluye la subsecuencia variable bloqueante. Por tanto, el oligonucleótido cebador se puede caracterizar como un cebador no específico de alelo. La región solapante puede ser homóloga a una porción de la subsecuencia diana neutra del oligonucleótido bloqueante en el lado 5' de la subsecuencia variable bloqueante o en el lado 3' de la subsecuencia variable bloqueante. Como se muestra en la figura 1, la subsecuencia solapante del oligonucleótido cebador es homóloga con la subsecuencia diana neutra del bloqueante en el lado 5' de la subsecuencia variable bloqueante (indicada como "C" en el bloqueante). En este caso, la subsecuencia diana neutra son las porciones del bloqueante a cada lado de la subsecuencia variable bloqueante C. La figura 12 representa un ejemplo en el que la subsecuencia solapante del cebador es homóloga con una porción de la subsecuencia diana neutra del bloqueante que está 3' de la subsecuencia variable bloqueante C.

En otra realización más de la presente invención, el oligonucleótido bloqueante incluye además un grupo funcional o una región de secuencia no complementarios en o cerca del extremo 3', que evita la extensión enzimática. En un ejemplo, el grupo funcional del oligonucleótido bloqueante se selecciona, pero sin limitación, del grupo que consiste en un espaciador de 3 carbonos o un didesoxinucleótido.

La segunda secuencia produce una energía libre de hibridación estándar (ΔG°_{PT}) y la primera secuencia produce una energía libre de hibridación estándar (ΔG°_{BT}), que cumple la siguiente condición:

$$+2 \text{ kcal/mol} \geq \Delta G^{\circ}_{PT} - \Delta G^{\circ}_{BT} \geq -8 \text{ kcal/mol}$$

La subsecuencia no solapante produce una energía libre de hibridación estándar (ΔG°_3), que cumple la siguiente condición:

$$-4 \text{ kcal/mol} \geq \Delta G^{\circ}_3 \geq -12 \text{ kcal/mol}$$

En un ejemplo, la segunda secuencia se solapa con el extremo 5' de la subsecuencia diana neutra mediante aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos. En otro ejemplo, la segunda secuencia se solapa con el extremo 5' de la subsecuencia diana neutra mediante aproximadamente 7 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos.

En un ejemplo, la concentración del oligonucleótido bloqueante es de aproximadamente 2 a aproximadamente 10.000 veces mayor que la concentración del primer oligonucleótido cebador. En otro ejemplo, la concentración del oligonucleótido bloqueante es de aproximadamente 5 a aproximadamente 1.000 veces mayor que la concentración del primer oligonucleótido cebador.

En otra realización más de la presente divulgación, la composición de oligonucleótidos incluye además un segundo oligonucleótido cebador suficiente para inducir la extensión enzimática. El segundo oligonucleótido cebador incluye una tercera secuencia, que no se solapa con la primera secuencia o la segunda secuencia, es diana neutra y es suficiente para su uso con el primer oligonucleótido cebador para amplificar una región de un ácido nucleico utilizando la reacción en cadena de la polimerasa.

En otra realización más de la presente divulgación, la composición de oligonucleótidos incluye además un segundo oligonucleótido bloqueante. El oligonucleótido bloqueante incluye una cuarta secuencia que tiene una segunda subsecuencia diana neutra y una segunda subsecuencia variable bloqueante. La segunda subsecuencia variable bloqueante tiene la misma secuencia que la subsecuencia no específica de diana del ácido nucleico diana dado que normalmente está diseñada para unirse a la secuencia antisentido de la diana. La segunda subsecuencia variable bloqueante está flanqueada en sus extremos 3' y 5' por la segunda subsecuencia diana neutra y es continua con la segunda subsecuencia diana neutra. La tercera secuencia se solapa con el extremo 5' de la segunda subsecuencia diana neutra en al menos 5 nucleótidos de manera que la tercera secuencia incluye una segunda subsecuencia solapante y una segunda subsecuencia no solapante.

En otra realización más de la presente divulgación, el segundo oligonucleótido bloqueante incluye además un segundo grupo funcional o una segunda región de secuencia no complementaria en o cerca del extremo 3', que evita la extensión enzimática. En un ejemplo, el segundo grupo funcional del segundo oligonucleótido bloqueante se selecciona, pero sin limitación, del grupo que consiste en un espaciador de 3 carbonos o un didesoxinucleótido.

La tercera secuencia produce una energía libre de hibridación estándar (ΔG°_{PT2}) y la cuarta secuencia produce una energía libre de hibridación estándar (ΔG°_{BT2}), que cumple la siguiente condición:

$$+2 \text{ kcal/mol} \geq \Delta G^{\circ}_{PT2} - \Delta G^{\circ}_{BT2} \geq -8 \text{ kcal/mol}$$

La segunda subsecuencia no solapante produce una energía libre de hibridación estándar (ΔG°_6), que cumple la siguiente condición:

$$-4 \text{ kcal/mol} \geq \Delta G^{\circ}_6 \geq -12 \text{ kcal/mol}.$$

En un ejemplo, la tercera secuencia se solapa con el extremo 5' de la segunda subsecuencia diana neutra mediante aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos. En otro ejemplo, la tercera secuencia se solapa con el extremo 5' de la segunda subsecuencia diana neutra mediante aproximadamente 7 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el oligonucleótido cebador y el oligonucleótido bloqueante pueden tener cada uno de aproximadamente 12 nucleótidos de longitud a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el oligonucleótido cebador y el oligonucleótido bloqueante pueden tener cada uno de aproximadamente 15 nucleótidos de longitud a aproximadamente 90 nucleótidos de longitud. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el oligonucleótido cebador y el oligonucleótido bloqueante pueden tener

- 5 cada uno de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el oligonucleótido cebador y el oligonucleótido bloqueante pueden tener cada uno de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el oligonucleótido cebador y el oligonucleótido bloqueante pueden tener cada uno de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el oligonucleótido cebador y el oligonucleótido bloqueante pueden ser cada uno de 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud.
- 10 En un ejemplo, la concentración del segundo oligonucleótido bloqueante es de aproximadamente 2 a aproximadamente 10.000 veces mayor que la concentración del segundo oligonucleótido cebador. En otro ejemplo, la concentración del segundo oligonucleótido bloqueante es de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 veces mayor que la concentración del segundo oligonucleótido cebador. En otro ejemplo, la concentración del segundo oligonucleótido bloqueante es de aproximadamente 10 a aproximadamente 900 veces mayor que la concentración del segundo oligonucleótido cebador. En otro ejemplo, la concentración del segundo oligonucleótido bloqueante es de aproximadamente 20 a aproximadamente 800 veces mayor que la concentración del segundo oligonucleótido cebador. En otro ejemplo, la concentración del segundo oligonucleótido bloqueante es de aproximadamente 30 a aproximadamente 700 veces mayor que la concentración del segundo oligonucleótido cebador. En otro ejemplo, la concentración del segundo oligonucleótido bloqueante es de aproximadamente 40 a aproximadamente 600 veces mayor que la concentración del segundo oligonucleótido cebador. En otro ejemplo, la concentración del segundo oligonucleótido bloqueante es de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 veces mayor que la concentración del segundo oligonucleótido cebador. En otro ejemplo, la concentración del segundo oligonucleótido bloqueante es de aproximadamente 60 a aproximadamente 400 veces mayor que la concentración del segundo oligonucleótido cebador. En otro ejemplo, la concentración del segundo oligonucleótido bloqueante es de aproximadamente 70 a aproximadamente 300 veces mayor que la concentración del segundo oligonucleótido cebador. En otro ejemplo, la concentración del segundo oligonucleótido bloqueante es de aproximadamente 80 a aproximadamente 200 veces mayor que la concentración del segundo oligonucleótido cebador. En otro ejemplo, la concentración del segundo oligonucleótido bloqueante es de aproximadamente 90 a aproximadamente 100 veces mayor que la concentración del segundo oligonucleótido cebador.
- 30 En otra realización más de la presente divulgación, la composición de oligonucleótidos incluye además un reactivo necesario para la reacción en cadena de la polimerasa.
- 35 En otra realización más de la presente divulgación, la composición de oligonucleótidos incluye además una pluralidad de nucleósidos trifosfato.
- En otra realización más de la presente divulgación, la composición de oligonucleótidos incluye además una ADN polimerasa o una ARN polimerasa.
- 40 En otra realización más de la presente divulgación, la composición de oligonucleótidos incluye además un reactivo necesario para la reacción en cadena de la polimerasa, una pluralidad de nucleósidos trifosfato, una ADN polimerasa.
- En otra realización más de la presente divulgación, la subsecuencia variable bloqueante es un solo nucleótido.
- 45 La divulgación se refiere además a un método para la amplificación de una secuencia diana. El método incluye las etapas de (a) obtener una muestra que contiene una o más copias de un primer ácido nucleico que tiene una secuencia variante y al menos una copia de un segundo ácido nucleico; en el presente documento, el segundo ácido nucleico tiene la secuencia diana. La secuencia diana y la secuencia variante tienen cada una, una subsecuencia homóloga y una subsecuencia variable. La subsecuencia variable incluye además al menos un nucleótido, pero puede incluir 2-5 nucleótidos. Asimismo, la subsecuencia variable de la secuencia diana es una subsecuencia específica de diana y la subsecuencia variable de la secuencia variante es una subsecuencia no específica de diana.
- 50 El método comprende además la etapa de (b) introducir un oligonucleótido bloqueante en la muestra; en el presente documento, el oligonucleótido bloqueante incluye una primera secuencia que tiene una subsecuencia diana neutra y una subsecuencia variable bloqueante. La subsecuencia diana neutra es complementaria a una porción de la subsecuencia homóloga y la subsecuencia variable bloqueante es complementaria a la subsecuencia no específica de diana. Adicionalmente, la subsecuencia variable bloqueante está flanqueada en sus extremos 3' y 5' por la subsecuencia diana neutra y es continua con la subsecuencia diana neutra.
- 55 El método comprende además la etapa de (c) introducir un primer oligonucleótido cebador en la muestra. El primer oligonucleótido cebador es suficiente para inducir la extensión enzimática. El primer oligonucleótido cebador incluye una segunda secuencia. Adicionalmente, la segunda secuencia es complementaria a una segunda porción de la subsecuencia homóloga, y puede solaparse con el extremo 5' de la subsecuencia diana neutra en al menos 5 nucleótidos de manera que la segunda secuencia incluye una subsecuencia solapante y una subsecuencia no solapante. La segunda secuencia no incluye ninguna secuencia complementaria a la subsecuencia variable.
- 60
- 65

El método comprende además la etapa de (d) introducir en la muestra una ADN polimerasa, nucleósidos trifosfato y uno o más reactivos necesarios para la amplificación de ácidos nucleicos basada en polimerasa; y después (e) hacer reaccionar la muestra en condiciones suficientes para lograr la amplificación de ácidos nucleicos.

- 5 En una realización de la presente divulgación, el oligonucleótido bloqueante incluye además un grupo funcional o una región de secuencia no complementarios en o cerca del extremo 3', que evita la extensión enzimática. En un ejemplo, el grupo funcional se selecciona, pero sin limitación, del grupo que consiste en un espaciador de 3 carbonos o un didesoxinucleótido.
- 10 La segunda secuencia produce una energía libre de hibridación estándar (ΔG°_{PT}) y la primera secuencia produce una energía libre de hibridación estándar (ΔG°_{BT}), que cumple la siguiente condición:

$$+2 \text{ kcal/mol} \geq \Delta G^{\circ}_{PT} - \Delta G^{\circ}_{BT} \geq -8 \text{ kcal/mol}$$

- 15 La subsecuencia no solapante produce una energía libre de hibridación estándar (ΔG°_3), que cumple la siguiente condición:

$$-4 \text{ kcal/mol} \geq \Delta G^{\circ}_3 \geq -12 \text{ kcal/mol}$$

- 20 En un ejemplo, la segunda secuencia se solapa con el extremo 5' de la subsecuencia diana neutra del bloqueante en aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos (es decir, la "subsecuencia solapante"). En otras palabras, la segunda secuencia comprende una subsecuencia solapante que es homóloga con 5 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos de la subsecuencia diana neutra del bloqueante que está en el lado 5' de la subsecuencia variable bloqueante del bloqueante. En otro ejemplo, la segunda secuencia se solapa con el extremo 5'
- 25 de la subsecuencia diana neutra mediante aproximadamente 7 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos. En otro ejemplo más, la segunda secuencia comprende una subsecuencia solapante que es homóloga a la porción de la subsecuencia neutra diana del bloqueante que está en el lado 3' de la subsecuencia variable bloqueante del bloqueante.
- 30 En un ejemplo, la concentración del oligonucleótido bloqueante introducido en la muestra es de aproximadamente 2 a aproximadamente 10.000 veces mayor que la concentración del primer oligonucleótido cebador introducido en la muestra. En otro ejemplo, la concentración del oligonucleótido bloqueante introducido en la muestra es de aproximadamente 5 a aproximadamente 1.000 veces mayor que la concentración del primer oligonucleótido cebador introducido en la muestra. En otro ejemplo, la concentración del oligonucleótido bloqueante introducido en la muestra es de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 veces mayor que la concentración del primer oligonucleótido cebador introducido en la muestra. En otro ejemplo, la concentración del oligonucleótido bloqueante introducido en la muestra es de aproximadamente 20 a aproximadamente 250 veces mayor que la concentración del primer oligonucleótido cebador introducido en la muestra. En otro ejemplo, la concentración del oligonucleótido bloqueante introducido en la muestra es de aproximadamente 40 a aproximadamente 125 veces mayor que la concentración del primer oligonucleótido cebador introducido en la muestra. En otro ejemplo, la concentración del oligonucleótido bloqueante introducido en la muestra es de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 veces mayor que la concentración del primer oligonucleótido cebador introducido en la muestra. En otro ejemplo, la concentración del oligonucleótido bloqueante introducido en la muestra es de aproximadamente 300 a aproximadamente 400 veces mayor que la concentración del primer oligonucleótido cebador introducido en la muestra. En otro ejemplo, la
- 45 concentración del oligonucleótido bloqueante introducido en la muestra es de aproximadamente 500 a aproximadamente 600 veces mayor que la concentración del primer oligonucleótido cebador introducido en la muestra.

En otra realización de la presente invención, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa termoestable.

- 50 En otra realización más de la presente divulgación, el método incluye además las condiciones suficientes para lograr la amplificación de ácidos nucleicos exponiendo la muestra a al menos 10 ciclos. Cada ciclo tiene al menos 2 exposiciones a temperatura diferentes, una exposición a la temperatura de al menos 85 °C y una exposición a la temperatura de no más de 75 °C.
- 55 En otra realización más de la presente divulgación, el método incluye además la etapa de introducir en la muestra una enzima seleccionada del grupo que consiste en una enzima de mellado, una recombinasa, una helicasa, una RNasa, una transcriptasa inversa, o cualquier combinación de las mismas.

- 60 En otra realización más de la presente divulgación, el método incluye además una etapa de introducir un segundo oligonucleótido cebador en la muestra. El segundo oligonucleótido cebador incluye una tercera secuencia. Adicionalmente, la tercera secuencia no se solapa con la subsecuencia variable. Asimismo, la tercera secuencia es diana neutra y es suficiente para su uso con el primer oligonucleótido cebador para amplificar una región de un ácido nucleico que tiene la secuencia diana.

- 65 En otra realización más de la presente divulgación, el método incluye además una etapa de introducir un segundo oligonucleótido bloqueante en la muestra. El segundo oligonucleótido bloqueante incluye una cuarta secuencia; en el

presente documento, la cuarta secuencia tiene una segunda subsecuencia diana neutra y una segunda subsecuencia variable bloqueante. Adicionalmente, la segunda subsecuencia variable bloqueante es la secuencia complementaria a la subsecuencia variable bloqueante. Asimismo, la segunda subsecuencia variable bloqueante está flanqueada en sus extremos 3' y 5' por la segunda subsecuencia diana neutra y es continua con la segunda subsecuencia diana neutra. Además, la tercera secuencia se solapa con el extremo 5' de la segunda subsecuencia diana neutra en al menos 5 nucleótidos de manera que la tercera secuencia incluye una segunda subsecuencia solapante y una segunda subsecuencia no solapante.

En otra realización más de la presente divulgación, el segundo oligonucleótido bloqueante incluye además un segundo grupo funcional o una segunda región de secuencia no complementaria en o cerca del extremo 3', que evita la extensión enzimática. En un ejemplo, el segundo grupo funcional se selecciona, pero sin limitación, del grupo que consiste en un espaciador de 3 carbonos o un didesoxinucleótido.

La tercera secuencia produce una energía libre de hibridación estándar (ΔG°_{PT2}) y la cuarta secuencia produce una energía libre de hibridación estándar (ΔG°_{BT2}), que cumple la siguiente condición:

$$+2 \text{ kcal/mol} \geq \Delta G^{\circ}_{PT2} - \Delta G^{\circ}_{BT2} \geq -8 \text{ kcal/mol}$$

La segunda subsecuencia no solapante produce una energía libre de hibridación estándar (ΔG°_6), que cumple la siguiente condición:

$$-4 \text{ kcal/mol} \geq \Delta G^{\circ}_6 \geq -12 \text{ kcal/mol}$$

En un ejemplo, la tercera secuencia se solapa con el extremo 5' de la segunda subsecuencia diana neutra mediante aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos. En otro ejemplo, la tercera secuencia se solapa con el extremo 5' de la segunda subsecuencia diana neutra mediante aproximadamente 7 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos.

En un ejemplo, la concentración del segundo oligonucleótido bloqueante introducido en la muestra es de aproximadamente 2 a aproximadamente 10.000 veces mayor que la concentración del segundo oligonucleótido cebador introducido en la muestra. En otro ejemplo, la concentración del segundo oligonucleótido bloqueante introducido en la muestra es de aproximadamente 5 a aproximadamente 1.000 veces mayor que la concentración del segundo oligonucleótido cebador introducido en la muestra.

En otra realización más de la presente divulgación, el método para la amplificación de una secuencia diana incluye además una etapa de eliminar una alícuota de la muestra; y repetir las etapas (b) a (e) definidas anteriormente.

La figura 1 ilustra una representación esquemática del cebador no específico de alelo y el bloqueante específico de alelo para la amplificación específica de alelo. Una mezcla de reactivo de ácido nucleico comprende dos especies de oligonucleótidos, un cebador (oligonucleótido cebador) y un bloqueante específico de variante (oligonucleótido bloqueante), que actúan juntos para permitir una amplificación fiable de dianas raras junto con un método de amplificación basado en polimerasa. El bloqueante puede modificarse en el extremo 3' con una modificación no extensible, tal como un didesoxinucleótido o un enlazador de 3 carbonos. Las secuencias del cebador y del bloqueante se diseñan de manera razonable basándose en la termodinámica de su hibridación con la secuencia del ácido nucleico diana y la secuencia del ácido nucleico variante. En algunas realizaciones, el bloqueante está presente en una concentración significativamente más alta que el cebador, de manera que el predominio de las secuencias de los ácidos nucleicos diana y variante se unen al bloqueante antes de unirse al cebador. El cebador se une de manera transitoria a las moléculas bloqueante-diana o bloqueante-variante, y posee una probabilidad de desplazar al bloqueante al unirse a la diana o variante. Debido a que la secuencia bloqueante es específica de diana variante, su desplazamiento de la variante es menos favorable termodinámicamente que su desplazamiento de diana. Por tanto, el cebador no específico de alelo amplifica la secuencia diana con mayor rendimiento/eficacia que amplifica la secuencia variante. La naturaleza no específica de alelo del cebador significa que la secuencia variante amplificada de manera simulada lleva el alelo variante, en lugar del alelo diana, de manera que los ciclos de amplificación posteriores también presentan un sesgo de amplificación a favor de la diana.

La alta concentración del bloqueante específico de variante da como resultado una mayor probabilidad de que el bloqueante se una primero tanto a la diana como a la variante, antes de que el cebador tenga la oportunidad de unirse. El cebador inicia la unión, tanto para el complejo diana-bloqueante como para variante-bloqueante, a través de una región exclusiva no solapante con el bloqueante y, posteriormente, posiblemente desplaza al bloqueante a través de un proceso de desplazamiento de hebra sin enzimas.

La figura 2 ilustra una representación esquemática de un diseño termodinámico de un cebador y un bloqueante. Las secuencias del cebador y del bloqueante se diseñan de manera razonable para lograr una termodinámica de reacción deseable. En este caso, el cebador, el bloqueante, la diana y las secuencias variantes de los ácidos nucleicos se subdividen en regiones que comprenden nucleótidos continuos, indicados por los números del 1 al 8 en la figura 2. La energía libre de hibridación estándar entre el cebador y la diana (ΔG°_{PT}) y la energía libre de hibridación estándar entre

el bloqueante y la diana (ΔG°_{BT}) cumple:

$$+2 \text{ kcal/mol} \geq \Delta G^{\circ}_{PT} - \Delta G^{\circ}_{BT} \geq -8 \text{ kcal/mol}$$

- 5 Los sistemas de cebador y bloqueante que cumplen la desigualdad anterior generan una gran diferencia en los rendimientos de hibridación entre el cebador unido a la diana y el cebador unido a la variante en cada ciclo, dando como resultado una amplificación específica de diana.

10 El proceso de desplazamiento de la hebra sin enzimas está guiado por la termodinámica relativa de la unión del cebador frente a la unión del bloqueante. El bloqueante se hibrida de manera más favorable con la variante (energía libre estándar de unión ΔG°_{BV}) que con la diana (energía libre estándar de unión ΔG°_{BT} , $\Delta G^{\circ}_{BT} > \Delta G^{\circ}_{BV}$ porque una ΔG° más negativa indica una preferencia más fuerte). En otra realización de la presente invención, el cebador se hibrida de manera igualmente favorable con la variante (energía libre estándar de unión ΔG°_{PV}) y con la diana (energía libre estándar de unión ΔG°_{PT} , $\Delta G^{\circ}_{PV} = \Delta G^{\circ}_{PT}$).

15 La reacción del cebador que desplaza al bloqueante al unirse a la diana, $BT + P \rightleftharpoons PT + B$, tiene una energía libre estándar $\Delta G^{\circ}_{rxn1} = \Delta G^{\circ}_{PT} - \Delta G^{\circ}_{BT}$, que es más negativa (más favorable) que la de la reacción del cebador que desplaza al bloqueante en la unión a la variante, $BV + P \rightleftharpoons PV + B$, que tiene energía libre estándar $\Delta G^{\circ}_{rxn2} = \Delta G^{\circ}_{PV} - \Delta G^{\circ}_{BV}$. Para un buen desempeño de la presente invención, el cebador y el bloqueante generalmente deben diseñarse de manera que $\Delta G^{\circ}_{rxn1} \leq 0$ y $\Delta G^{\circ}_{rxn2} \geq 0$. Sin embargo, debido a que las concentraciones relativas del bloqueante y del cebador pueden influir en la distribución de equilibrio y la termodinámica eficaz de la reacción, las directrices de ΔG°_{rxn1} y ΔG°_{rxn2} no son absolutas.

25 La figura 3 ilustra una representación esquemática del cálculo de los valores de ΔG° a partir de la secuencia. Existen diferentes convenciones para calcular la ΔG° de las diferentes interacciones de las regiones; mostradas en la figura 3 son cálculos de energía ilustrativos basados en el modelo del vecino más cercano. Los términos ΔG°_{1-5} , ΔG°_{4-7} y ΔG°_{4-8} incluyen además la energía libre estándar de iniciación de la hibridación (ΔG°_{init}) y la pila de base adicional contigua a la sexta región. Las energías libres estándar, ΔG° , calculadas utilizando otros métodos pueden dar como resultado los mismos valores de ΔG°_{PT} , ΔG°_{PV} , ΔG°_{BT} y ΔG°_{BV} , aunque la termodinámica de regiones individuales (por ejemplo, ΔG°_{3-6}) puede diferir. Los ejemplos ilustrativos pretenden mostrar el método de cálculo de ΔG° utilizado en la presente invención, y no pretenden sugerir secuencias para un ensayo; las secuencias enumeradas pueden ser demasiado cortas para unirse de forma estable. El cálculo de ΔG°_{PT} , ΔG°_{PV} , ΔG°_{BT} y ΔG°_{BV} de la secuencia del cebador, secuencia del bloqueante, secuencia diana, secuencia variante, la temperatura operativa y las condiciones operativas del tampón son conocidos por los expertos en la materia.

35 La figura 4 muestra una sonda y un diseño de bloqueante de la presente invención y las subsecuencias alrededor del locus del gen SMAD7 de dos muestras de depósito humana NA18537 y NA18562. El diseño de un conjunto de cebadores/bloqueante se diseña para amplificar de manera específica la variante A del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) de SMAD7. El bloqueante está diseñado para ser perfectamente complementario a la plantilla de la variante que lleva una variante G del SNP de SMAD7, y está funcionalizada en el extremo 3' con un enlazador de 3 carbonos (C3) que evita la extensión enzimática mediante la ADN polimerasa Taq. Un cebador inverso se une al extremo 3' del cebador directo y no es específico de ninguno de los alelos. En aras de la explicación de la terminología utilizada para describir varias subsecuencias del cebador y el bloqueante, los oligonucleótidos se pueden describir de la siguiente manera. El oligonucleótido bloqueante comprende una subsecuencia diana neutra que incluye la secuencia en 5' y 3' del nucleótido de citosina que se representa fuera de alineación con el resto de la secuencia; el nucleótido de citosina en este ejemplo representa la subsecuencia variable bloqueante del bloqueante. La subsecuencia solapante del oligonucleótido cebador comprende una secuencia que es homóloga a la secuencia del bloqueante en el lado 5' de la subsecuencia variable del bloqueante (la citosina).

50 La figura 5 muestra el rendimiento de un par cebador-bloqueante dirigido al alelo C del SNP rs3789806 (C/G) humano a una temperatura de hibridación/extensión que varía de 56 °C a 66 °C.

La figura 6A y la figura 6B muestra diseños de cebadores con más espacio de diseño para evitar interacciones no deseadas.

55 La figura 7A y la figura 7B muestra el control del comportamiento de la PCR específica de alelo mediante el diseño de ΔG°_{rxn1} . Las simulaciones en la figura 7A sugieren que cuando el cebador y el bloqueante están diseñados para que ΔG°_{rxn1} sea más positiva, los valores de ΔCq son mayores. Sin embargo, a valores más positivos de ΔG°_{rxn1} , la amplificación de la diana también se ralentiza, dando como resultado un valor mayor de Cq . Las simulaciones suponen una $\Delta \Delta G^{\circ}$ fija de 2 kcal/mol. Los subgráficos superiores muestran los efectos previstos de los diferentes valores de ΔG°_{rxn1} (estrellas) y ΔG°_{rxn2} (puntos) en los rendimientos de hibridación. Los subgráficos inferiores muestran la curva de amplificación simulada de la diana y la variante para cada par de cebadores y bloqueantes. En todos los ejemplos representados, la relación de concentración de bloqueante a cebador es 20:1. La figura 7B(I) y la figura 7B(II) muestran resultados experimentales de los efectos de ΔG°_{rxn1} sobre la selectividad de la amplificación. Se lograron diferentes valores de ΔG°_{rxn1} alargando o acortando el extremo 3' del bloqueante. Como cabía esperar, una ΔG°_{rxn1} más positiva da como resultado una Cq mayor tanto para la diana como para la variante. Se observó una ΔG°_{rxn1} intermedia óptima

dando como resultado una mayor ΔCq y un retraso de Cq relativamente pequeño ($Cq < 28$) para la diana. A diferencia de las simulaciones, ΔCq no aumentó de manera monótona con ΔG°_{rxn1} . La formación de dímeros de cebadores y la amplificación no específica produce un techo de Cq .

5 Las simulaciones cinéticas del proceso de PCR expresadas como:

$$T_{fn+1} = T_{fn} + P_n \cdot [P_n / (P_n + B_n) + Y(\Delta G^{\circ}_{rxn1}) \cdot B_n / (P_n + B_n)] \cdot T_{rn}$$

$$T_{rn+1} = T_{rn} + R_n \cdot T_{fn}$$

10

$$V_{fn+1} = V_{fn} + P_n \cdot [P_n / (P_n + B_n) + Y(\Delta G^{\circ}_{rxn2}) \cdot B_n / (P_n + B_n)] \cdot V_{rn}$$

$$V_{rn+1} = V_{rn} + R_n \cdot V_{fn}$$

15 donde T_{fn} es la concentración normalizada de la hebra directa de la diana en el ciclo n , T_{rn} es la concentración normalizada de la hebra inversa de la diana en el ciclo n , V_{fn} es la concentración normalizada de la hebra directa de la variante en el ciclo n , V_{rn} es la concentración normalizada de la hebra inversa de la variante en el ciclo n , P_n es la concentración normalizada del cebador directo en el ciclo n , B_n es la concentración normalizada del bloqueante en el ciclo n , R_n es la concentración normalizada del cebador inverso en el ciclo n , e $Y(\Delta G^{\circ})$ es el rendimiento de hibridación de una reacción de desplazamiento dada la energía libre estándar de reacción ΔG° . Los resultados de la simulación se muestran en la figura 7A.

25 La figura 8 muestra el bloqueante con una secuencia no homóloga en el extremo 3' en lugar de una funcionalización química no extensible. Debido a que las secuencias no homólogas no se unen a la región cadena abajo ni de la diana ni de la variante, la región no homóloga evita de manera eficaz la extensión enzimática. Los valores de Cq y ΔCq de la diana son similares a los que se muestran en el ejemplo 1, lo que indica que grupos funcionales similares, tal como un espaciador de 3 carbonos o un didesoxinucleótido, una secuencia no homóloga en el extremo 3' pueden evitar de manera eficaz la extensión enzimática. En este caso, fP , rP y B representan el cebador directo, el cebador inverso y el bloqueante (para el cebador directo), respectivamente.

30

En la PCR de bloqueo convencional, solamente el cebador directo está sesgado para amplificar la secuencia diana; el cebador inverso amplifica tanto la diana como la variante aproximadamente por igual. La especificidad de la amplificación se puede mejorar adicionalmente (con una mejora aproximadamente cuadrática en la sensibilidad de la mutación) si el cebador tanto directo como inverso estuvieran sesgados para amplificar solamente la secuencia diana. Para lograr una amplificación específica de doble diana, los cebadores directo e inverso están diseñados para estar separados por una distancia corta, para que se solapen con un bloqueante específico de variante. En el límite, las regiones de unión a cebador están separadas por un único nucleótido cuya identidad varía entre la diana y la variante. Los bloqueantes específicos de variante directo e inverso son parcialmente complementarios entre sí porque se unen a hebras complementarias de la diana y ambos abarcan la región de variación. Los bloqueantes están diseñados de manera que, a pesar de su complementariedad parcial, en las condiciones operativas, la mayoría de las moléculas bloqueantes no se hibriden entre sí.

40

La figura 9A y la figura 9B, muestra cada una, un sistema de cebador-bloqueante diseñado para que los SNP rs3789806 de BRAF y rs1884444 de IL23R humanos se multiplexaran en la misma reacción. Se diseñaron sondas TaqMan® dirigidas a las correspondientes, cadena abajo de las regiones de unión del bloqueante y se utilizaron como mecanismo de lectura.

45

La figura 10 muestra que la unión no específica del cebador o bloqueante a otros cebadores, bloqueantes o plantillas da como resultado una amplificación no específica. El panel inferior proporciona un diseño de protector que suprime la unión no específica del cebador y el bloqueante. Los oligonucleótidos protectores son parcialmente complementarios a las secuencias del cebador y del bloqueante. La presencia de un exceso estequiométrico de protectores da como resultado que tanto el cebador como el bloqueante sean parcialmente bicatenarios. El bloqueante posee una nueva región 11, cuya secuencia no es complementaria a la región 5 en la secuencia del ácido nucleico, y el protector posee una nueva región 10, cuya secuencia es complementaria a la región 11.

50

La figura 11A y la figura 11B, muestra cada una, diseños de cebador y bloqueante para detectar una eliminación y una inserción. El cebador no es específico de diana, este método también se puede utilizar para detectar eliminaciones o inserciones con un número incierto de bases o una posición incierta.

60

La figura 12 muestra una implementación inferior de la presente invención colocando el cebador en el extremo 3' de la posición del SNP y el bloqueante en el extremo 5' del cebador. Esta implementación genera especificidad de hibridación solamente en el primer ciclo, por lo que la ΔCq es menor que el diseño preferido.

65

La figura 13 demuestra la amplificación selectiva de subsecuencias de ADN 18S de hongos de 3 especies de hongos patógenos en un gran exceso de ADN humano homólogo. Debido a que las subsecuencias fúngicas 18S y su subsecuencia humana homóloga difieren en múltiples regiones, se diseñaron las especies de bloqueantes

correspondientes tanto para el cebador directo como para el cebador inverso para maximizar la especificidad de amplificación.

La figura 14 describe el uso de la amplificación específica de diana tanto para el cebador directo como para el inverso, utilizando de dos conjuntos de bloqueantes de alelos variantes, uno para cada cebador. Los bloqueantes son parcialmente complementarios entre sí, pero en las condiciones operativas no se hibridan predominantemente entre sí. Los bloqueantes y los cebadores están diseñados de manera que el cebador directo no se pueda extender fuera del bloqueante inverso y el cebador inverso no se pueda extender fuera del bloqueante directo. La figura 14 muestra resultados experimentales preliminares.

Las combinaciones de cebador y bloqueante se pueden aplicar a otros ensayos de amplificación enzimática para ácidos nucleicos, incluyendo, pero sin limitación, la reacción de amplificación enzimática por mellado (NEAR, por sus siglas en inglés), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés) y amplificación por círculo rodante (RCA, por sus siglas en inglés).

La presente invención es particularmente adecuada para la detección de una pequeña cantidad de diana en un gran exceso de variante. Para aplicaciones de diagnóstico de cáncer de la presente invención, la variante puede referirse a la secuencia de ADN de tipo silvestre y la diana puede referirse a una secuencia de ADN de cáncer. Para aplicaciones de diagnóstico de enfermedades infecciosas de la presente invención, la variante puede referirse a la secuencia de ADN del patógeno y la diana puede referirse a una secuencia de ADN humano homóloga.

Ejemplos

Ejemplo 1

La figura 4 muestra un ejemplo 1 de la presente invención para la sonda y el diseño del bloqueante y las subsecuencias alrededor del locus del gen SMAD7 de dos muestras de depósito humanas NA18537 y NA18562. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) rs4939827 (C/T) en el locus del gen SMAD7 de humanos sanos se eligieron para las validaciones de estudios de viabilidad. El alelo T como diana y la variante del alelo C se designaron de manera arbitraria. Las muestras de ADN genómico del depósito humano NA18562 (homocigoto del alelo C) y NA18537 (homocigoto del alelo T) se adquirieron de Coriell®, y las secuencias de nucleótidos correspondientes se obtuvieron del sitio web 1000 Genomes. Para evitar la polimerización no deseada, el bloqueante se modificó con un espaciador C3 en el extremo 3'. Los resultados experimentales de qPCR distinguieron un 0,1 % de diana (99,9 % de variante) a partir de 0 % de diana (100 % de variante). La muestra con 0,1 % de diana se preparó mezclando 0,1 % de NA18537 con 99,9 % de NA18562. La diferencia promedio del ciclo de cuantificación (ΔCq) entre la variante del 100 % y la diana del 100 % fue de 14,8, y la diferencia entre la variante del 100 % (indicada como "TS" en el gráfico) y la diana del 0,1 % fue de 4,2. Todos los experimentos se realizaron en una placa de 96 pocillos en la máquina de qPCR BioRad CFX96™. En cada pocillo, se mezclaron cebador 200 nM, bloqueante 2 μ M y 20 ng de ADN genómico humano en la Bio-rad iTaq™ SYBR® Green Supermix. Después de un proceso de iniciación de 3 min a 95 °C, se realizaron 65 ciclos de la etapa de desnaturalización a 95 °C durante 10 segundos y la etapa de hibridación/extensión a 60 °C durante 30 segundos. Los experimentos de ejemplo mostrados en las figuras 5-12 utilizaron un protocolo similar.

Tabla-1

Gen	SNP	Bloqueante	Números de Cq		
			NA18537	NA18562	ΔCq
BRAF	rs3789806 GorC	-	23,2	23,4	0,2
		C	38,5	25,3	13,2
		G	30,1	42,7	12,6
EGF	rs11568849 CorA	-	22,5	22,3	0,2
		A	34,7	26,3	8,4
		C	24,7	39,33	14,6
IL23R	rs1884444 GorT	-	22,2	22,4	0,2
		T	36,1	24	12,1
		G	28,3	35,4	7,1
ALK	rs2246745 A o T	-	22,6	22,3	0,3
		A	23,2	33	9,8
		T	33,2	24,1	9,1

La Tabla-1 muestra ejemplos de resultados de amplificación específicos de alelo para cuatro conjuntos de pares de SNP en muestras de ADN genómico humano NA18562 y NA18537, extraídas de la base de datos 1000 Genomes. Para cada par de SNP, se diseñó y probó un diseño de cebador y bloqueante para cada variante alélica. Las

identidades base que se muestran en la columna "Bloqueante" indican el alelo que se estaba suprimiendo (variante) y "-" significa que no se añadió ningún bloqueante. En todos los casos, se observaron valores grandes de ΔCq entre los dos alelos, que variaban de 7,1 a 14,6. Todos los experimentos se realizaron por triplicado utilizando 400 nM de cada cebador y 4 μM de bloqueante en Bio-rad iTaq™ SYBR® Green Supermix. Los resultados mostraron el

Ejemplo 2

La figura 5 muestra un ejemplo 2 de la presente invención para el rendimiento de un par cebador-bloqueante dirigido al alelo C del SNP rs3789806 (C/G) C humano a una temperatura de hibridación/extensión que varía de 56 °C a 66 °C. El ejemplo 2 mostró una buena amplificación específica de alelo de 56 °C a 64 °C e indicó al menos 8 °C de resistencia térmica. Se usaron 400 nM de cada cebador y bloqueante 4 μM , y las otras condiciones experimentales distintas de la temperatura de hibridación/extensión fueron las mismas que las descritas en el ejemplo 1.

Ejemplo 3

La figura 6A y figura 6B muestran un ejemplo 3 de la presente invención. Los diseños de los cebadores mostrados en la presente invención proporcionaron más espacio de diseño para evitar interacciones no deseadas. Las secuencias de los ácidos nucleicos de cuatro conjuntos de pares de cebadores y bloqueantes que amplifica cada uno de manera específica el alelo C del SNP humano rs3789806 mostraron una $\Delta Cq > 11$. Se usaron 400 nM de cada cebador y bloqueante 4 μM , y las otras condiciones experimentales fueron las mismas que las descritas en el ejemplo 1.

Ejemplo 4

La figura 7A, figura 7B(I) y figura 7B(II) muestran un ejemplo 4 de la presente invención para controlar el comportamiento de la PCR específica de alelo mediante el diseño de ΔG°_{rxn1} . Las simulaciones en la figura 7A sugirieron que cuando el cebador y el bloqueante se diseñaron para que la ΔG°_{rxn1} fuera más positiva, los valores de ΔCq fueron mayores. Sin embargo, a valores más positivos de ΔG°_{rxn1} , la amplificación de la diana se ralentizó y dio como resultado un valor mayor de Cq . Las simulaciones se asumieron como una $\Delta \Delta G^{\circ}$ fijo de 2 kcal/mol. Los subgráficos superiores predijeron los efectos de los diferentes valores de ΔG°_{rxn1} (estrellas) y ΔG°_{rxn2} (puntos) en los rendimientos de hibridación. Los subgráficos inferiores predijeron la curva de amplificación simulada de la diana y de la variante para cada par de cebadores y bloqueantes. En todos los ejemplos representados, la relación de concentración de bloqueante a cebador fue de 20:1. La figura 7B(I) y la figura 7B(II) muestran resultados experimentales de los efectos de ΔG°_{rxn1} sobre la selectividad de la amplificación. Se lograron diferentes valores de ΔG°_{rxn1} alargando o acortando el extremo 3' del bloqueante. Como cabía esperar, una ΔG°_{rxn1} más positiva dio como resultado una mayor Cq tanto para la diana como para la variante. Una ΔG°_{rxn1} intermedia óptima dio como resultado una mayor ΔCq y un retraso de Cq relativamente pequeño ($Cq < 28$) para la diana. A diferencia de las simulaciones, ΔCq no aumentó de manera monótona con ΔG°_{rxn1} debido a la formación de dímeros de cebadores y a la amplificación no específica producida por un techo de Cq . Se usaron 200 nM de cada cebador y bloqueante 2 μM , y las otras condiciones experimentales fueron las mismas que las descritas en el ejemplo 1.

Ejemplo 5

La figura 8 muestra un ejemplo 5 de la presente invención para el bloqueante con una secuencia no homóloga en el extremo 3' en lugar de una funcionalización química no extensible. Debido a que las secuencias no homólogas no se unen a la región cadena abajo ni de la diana ni de la variante, la región no homóloga evita de manera eficaz la extensión enzimática. Se usaron 400 nM de cada cebador y bloqueante 4 μM , y las otras condiciones experimentales fueron las mismas que las descritas en el ejemplo 1. Los valores de Cq y ΔCq de la diana fueron similares a los que se muestran en la figura 4, lo que indica que grupos funcionales similares, tal como un espaciador de 3 carbonos o un didesoxinucleótido, una secuencia no homóloga en el extremo 3' previene eficazmente la extensión enzimática. En la figura 8, fP, rP y B representan el cebador directo, el cebador inverso y el bloqueante (para el cebador directo), respectivamente.

Ejemplo 6

La figura 9A y figura 9B muestran un ejemplo 6 de la presente invención. Para una implementación de PCR en tiempo real del cebador no específico de alelo y del bloqueante específico de alelo de los presentes inventores, también se necesitaba un cebador inverso, que era no específico de alelo. Se utilizaron SYBR® Green Supermix y TaqMan® en los experimentos y los resultados no fueron significativamente diferentes entre los dos. Los sistemas de cebadores-bloqueantes diseñados para los SNP rs3789806 de BRAF y rs1884444 de IL23R humanos se multiplexaron en la misma reacción. Se diseñaron sondas TaqMan® dirigidas a las correspondientes, cadena abajo de las regiones de unión del bloqueante y se utilizaron como mecanismo de lectura. La sonda TaqMan® para amplicones con rs3789806 de BRAF se modificó con un fluoróforo FAM, un desactivador Iowa Black FQ y un desactivador ZEN interno, y la sonda TaqMan® para amplicones con rs1884444 de IL23R se modificó con un fluoróforo Cy5 y un desactivador Iowa Black RQ. La figura 9A muestra los resultados de amplificación de la detección multiplexada del alelo G de rs3789806 de

BRAF y del alelo T de rs1884444 de IL23R. Las identidades de base indicaban qué alelo estaban suprimiendo los bloqueantes (variante). La figura 9B muestra la detección multiplexada del alelo C de rs3789806 de BRAF y del alelo G de rs1884444 de IL23R. En cada experimento, la muestra de ADN genómico se mezcló con 400 nM de cada cebador, 4 μ M de cada bloqueante y 200 nM de cada sonda TaqMan® en Bio-rad iQ Supermix. El protocolo de qPCR fue el mismo que se indica en el ejemplo 1.

Ejemplo 7

La figura 10 muestra un ejemplo 7 de la presente invención para la unión no específica del cebador o bloqueante a otros cebadores, bloqueantes o plantillas. El ejemplo 7 dio como resultado una amplificación no específica. El panel inferior proporcionó un diseño de protector que suprimió la unión no específica del cebador y el bloqueante. El bloqueante poseía una nueva región 11, cuya secuencia no era complementaria a la región 5 en la secuencia del ácido nucleico, y el protector poseía una nueva región 10, cuya secuencia era complementaria a la región 11.

Ejemplo 8

La figura 11A y figura 11B muestran un ejemplo 8 de la presente invención para diseños de cebadores y bloqueantes para detectar una eliminación y una inserción. Se utilizó la eliminación rs200841330 para mostrar los resultados de estudios de viabilidad. Se usaron 400 nM de cada cebador y bloqueante 4 μ M, y las otras condiciones experimentales fueron las mismas que las indicadas en el ejemplo 1. Debido a que el cebador no es específico de alelo, este método también se puede utilizar para detectar eliminaciones o inserciones con un número incierto de bases o una posición incierta.

Ejemplo 9

La figura 12 muestra un ejemplo 9 de la presente invención colocando el cebador en el extremo 3' de la posición del SNP y el bloqueante en el extremo 5' del cebador. El ejemplo 9 generó especificidad de hibridación solamente en el primer ciclo, por lo que la Δ Cq era más pequeño que el diseño preferido. La concentración de cebador fue 400 nM y la concentración de bloqueante fue 4 μ M. Las condiciones experimentales fueron las mismas que las indicadas en el ejemplo 1.

Ejemplo 10

La figura 13 muestra un ejemplo 10 de la presente invención para la amplificación selectiva de subsecuencias de ADN 18S de hongos de 3 especies de hongos patógenos en gran exceso de ADN humano homólogo. Debido a que las subsecuencias fúngicas 18S y su subsecuencia humana homóloga difieren en múltiples regiones, se diseñaron las especies de bloqueantes correspondientes tanto para el cebador directo como para el cebador inverso para maximizar la especificidad de amplificación. En los experimentos se utilizaron fragmentos gBlock (ADN bicatenario de 400 pb de secuencia verificada, IDT) de subsecuencias 18S de 3 especies de hongos y la secuencia consenso en seres humanos. Se mezclaron por separado 60.000 copias (0,1 %), 60 copias (0,0001 %) y 0 copias (100 % humano) de cada fragmento de ADN fúngico gBlock con 60.000.000 copias de ADN humano. En todos los casos, los resultados detectaron secuencias raras de hasta 1 parte en 1 millón. Se usaron 200 nM de cada cebador y 1 μ M de cada bloqueante, y las otras condiciones experimentales fueron las mismas que las indicadas en el ejemplo 1.

Ejemplo 11

La figura 14 muestra un ejemplo 11 de la presente invención. La figura 14 describe el uso de la amplificación específica de alelo para el cebador directo e inverso; se utilizaron dos conjuntos de bloqueantes de alelos variantes, uno para cada cebador. Los bloqueantes eran parcialmente complementarios entre sí, pero en las condiciones operativas no confirmaron la hibridación predominante entre sí. Los bloqueantes y los cebadores se diseñaron de manera que el cebador directo no se pudiera extender fuera del bloqueante inverso y el cebador inverso no se pudiera extender fuera del bloqueante directo. La figura 14 mostró resultados experimentales preliminares.

La descripción anterior de realizaciones específicas de la presente divulgación se presenta con fines ilustrativos y descriptivos. La realización ilustrativa se eligió y describió para explicar mejor los principios de la presente invención y su aplicación práctica, para permitir de este modo, que otros expertos en la materia utilicen mejor la presente invención y diversas realizaciones con diversas modificaciones que sean adecuadas para el uso particular contemplado.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> RICE UNIVERSITY MARSHALL, WILLIAM

<120> AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA DE ALELO UTILIZANDO UNA COMPOSICIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES NO ESPECÍFICOS DE ALELO Y BLOQUEANTES ESPECÍFICOS DE ALELO SOLAPANTES

<130> 14-21013-WO (260947.00251)

<140>
 <141>
 5 <150> 62/000.114
 <151> 19/05/2014
 <160> 49
 10 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 11
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 20 <400> 1
 agctgaccta a 11
 <210> 2
 <211> 11
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 30 <220>
 <223> Puede ser 3' C3 modificado
 <400> 2
 35 acctaagcga t 11
 <210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 45 <400> 3
 cagcctcatc caaaagagga aa 22
 <210> 4
 <211> 27
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 55 <220>
 <223> Puede ser 3' C3 modificado
 <400> 4
 60 aaaagaggaa acaggacccc agagctc 27
 <210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
5	<400> 5 tgtatataga cggtaaaata aacaccaaga	30
	<210> 6	
	<211> 31	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
15	<220>	
	<223> Puede ser 3' C3 modificado	
	<400> 6 acaccaagac gtggtaaata ttacctggt c	31
20	<210> 7	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 7 gagccttgta tatagacggt aaaataaac	29
	<210> 8	
	<211> 36	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<220>	
	<223> Puede ser 3' C3 modificado	
	<400> 8 cggtaaaata aacaccaaga cgtggtaaat atttac	36
45	<210> 9	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 9 tggagccttg tatatagacg gtaaa	25
55	<210> 10	
	<211> 31	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
65	<220>	
	<223> Puede ser 3' C3 modificado	

	<400> 10 gacggtaaaa taaacaccaa gacgtggtaa a	31
5	<210> 11 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 11 actggagcct tgtatataga cgg	23
15	<210> 12 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
25	<220> <223> Puede ser 3' C3 modificado	
	<400> 12 gtatatagac ggtaaataa acaccaagac gtggt	35
30	<210> 13 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<220> <223> Puede ser 3' C3 modificado	
40	<400> 13 aaaagaggaa acaggacccc aga	23
45	<210> 14 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<220> <223> Puede ser 3' C3 modificado	
55	<400> 14 aaaagaggaa acaggacccc agag	24
60	<210> 15 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<220>	

	<223> Puede ser 3' C3 modificado	
5	<400> 15 aaaagaggaa acaggacccc agagc	25
	<210> 16 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
15	<220> <223> Puede ser 3' C3 modificado	
	<400> 16 aaaagaggaa acaggacccc agagct	26
20	<210> 17 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<220> <223> Puede ser 3' C3 modificado	
30	<400> 17 aaaagaggaa acaggacccc agagctcc	28
35	<210> 18 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<220> <223> Puede ser 3' C3 modificado	
45	<400> 18 aaaagaggaa ataggacccc aga	23
	<210> 19 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
55	<220> <223> Puede ser 3' C3 modificado	
60	<400> 19 aaaagaggaa ataggacccc agag	24
	<210> 20 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65		

ES 2 861 353 T3

	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético		
	<220>		
5	<223> Puede ser 3' C3 modificado		
	<400> 20		
	aaaagaggaa ataggacccc agagc	25	
10	<210> 21		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético		
	<220>		
20	<223> Puede ser 3' C3 modificado		
	<400> 21		
	aaaagaggaa ataggacccc agagct	26	
25	<210> 22		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético		
	<220>		
	<223> Puede ser 3' C3 modificado		
35	<400> 22		
	aaaagaggaa ataggacccc agagctc	27	
40	<210> 23		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético		
	<220>		
	<223> Puede ser 3' C3 modificado		
50	<400> 23		
	aaaagaggaa ataggacccc agagctcc	28	
55	<210> 24		
	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
60	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 24		
	acaccaagac gtggtaaata ttacctggt caaaa	35	
65	<210> 25		
	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
5	<400> 25 cgatatggtt tgggtcaagg tatgattttt a	31
	<210> 26	
	<211> 43	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
15	<220>	
	<223> Puede ser 3' C3 modificado	
	<400> 26	
20	aaggatatgat ttttaattaa aaattgtgtg tcacattga agg	43
	<210> 27	
	<211> 25	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 27 gtggtaaata ttacctggt ccctg	25
	<210> 28	
	<211> 35	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<220>	
	<223> Puede ser 3' C3 modificado	
	<400> 28	
45	ggtaaaataa acaccaagac gtggtaaata ttac	35
	<210> 29	
	<211> 27	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
55	<400> 29 tggagccttg tatatagacg gtaaaat	27
	<210> 30	
	<211> 31	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
65	<220>	

	<223> Puede ser 3' C3 modificado	
5	<400> 30 accaggtaaa tatttaccac gtcttggtg t	31
	<210> 31 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
15	<400> 31 catcaacaac agggaccagg taaatat	27
20	<210> 32 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
25	<400> 32 ctcactctaa accccagcat t	21
30	<210> 33 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
35	<400> 33 atcgcttagg tcagct	16
40	<210> 34 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
45	<400> 34 atcacttagg tcagct	16
50	<210> 35 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
60	<400> 35 agggagctct ggggtcctat ttctctttt ggatgaggct gtga	44
65	<210> 36 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220>	

ES 2 861 353 T3

	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 36	
5	agggagctct ggggtcctgt ttctcttt ggatgaggct gtga	44
	<210> 37	
	<211> 57	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 37	
15	cagggaccag gtaaataatt accacgtctt ggtgtttatt ttaccgtcta tatacaa	57
	<210> 38	
	<211> 57	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
25	<400> 38	
	cagggaccag gtaaataatt accacgtctt ggtgtttatt ttaccgtcta tatacaa	57
	<210> 39	
	<211> 67	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
35	<400> 39	
	cagggaccag gtaaataatt accacgtctt ggtgtttatt ttaccgtcta tatacaaggc	60
	tccagtt	67
40	<210> 40	
	<211> 67	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 40	
	cagggaccag gtaaataatt accacgtctt ggtgtttatt ttaccgtcta tatacaaggc	60
50	tccagtt	67
	<210> 41	
	<211> 59	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
60	<400> 41	
	acctcaaat gtgaacaatt ttaattaa aatcatacct tgaacaaac catatcgat	59

ES 2 861 353 T3

5	<p><210> 42 <211> 62 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
10	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
	<p><400> 42</p> <p>accttcaaat gtgaacaaca atttttaatt aaaaatcata ccttgaaaca aaccatatcg</p>	60
	<p>at</p>	62
15	<p><210> 43 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
20	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
25	<p><220> <223> Puede ser 3' C3 modificado</p> <p><400> 43 aaggtatgat tttaattaa aaattgtca catttgaagg</p>	40
30	<p><210> 44 <211> 47 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
35	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético</p> <p><400> 44 acagggacca ggtaaatatt taccacctct tgggtttat ttaccg</p>	47
40	<p><210> 45 <211> 47 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
45	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético</p> <p><400> 45 acagggacca ggtaaatatt taccacgtct tgggtttat ttaccg</p>	47
50	<p><210> 46 <211> 77 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
55	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
60	<p><400> 46</p> <p>aacatcaaca acagggacca ggtaaatatt taccacctct tgggtttat ttaccgtct</p> <p>atatacaagg ctccagt</p>	60 77

ES 2 861 353 T3

5	<p><210> 47 <211> 77 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
10	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
	<400> 47	
	aacatcaaca acagggacca ggtaaataatt taccacgtct tgggtgtttat tttaccgtct	60
	atatacaagg ctccagt	77
15	<p><210> 48 <211> 77 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
20	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
	<400> 48	
	actggagcct tgtatataga cggtaaaata aacaccaaga cgtggtaaatt atttacctgg	60
25	tccctgtttgt tgatggt	77
30	<p><210> 49 <211> 77 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
	<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
35	<400> 49	
	actggagcct tgtatataga cggtaaaata aacaccaaga ggtggtaaatt atttacctgg	60
	tccctgtttgt tgatggt	77

REIVINDICACIONES

1. Un método para la amplificación de una secuencia diana que comprende las etapas de:

- 5 a. proporcionar una muestra que contiene una o más copias de un primer ácido nucleico que comprende una secuencia variante y que posiblemente contiene al menos una copia de un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia diana, en donde la secuencia diana y la secuencia variante comprenden cada una, una subsecuencia homóloga y una subsecuencia variable, en donde la subsecuencia variable comprende al menos un nucleótido, y en donde la subsecuencia variable de la secuencia diana es una subsecuencia específica de diana y la subsecuencia variable de la secuencia variante es una subsecuencia no específica de diana;
 - 10 b. diseñar un oligonucleótido bloqueante de ADN, en donde el oligonucleótido bloqueante de ADN comprende una primera secuencia que comprende una subsecuencia diana neutra y una subsecuencia variable bloqueante, en donde la subsecuencia diana neutra es complementaria a una porción de la subsecuencia homóloga y la subsecuencia variable bloqueante es complementaria de la subsecuencia no específica de diana, en donde la subsecuencia variable bloqueante está flanqueada en sus extremos 3' y 5' por la subsecuencia diana neutra y es continua con la subsecuencia diana neutra, y en donde el oligonucleótido bloqueante de ADN comprende una región de secuencia no complementaria en el extremo 3', que evita la extensión enzimática; y
 - 15 c. diseñar un primer oligonucleótido cebador de ADN en donde el primer oligonucleótido cebador de ADN comprende una segunda secuencia, en donde la segunda secuencia es complementaria a una segunda porción de la subsecuencia homóloga, en donde la segunda secuencia se solapa a la subsecuencia diana neutra del oligonucleótido bloqueante en al menos 5 nucleótidos de manera que la segunda secuencia comprende una subsecuencia solapante y una subsecuencia no solapante, y en donde la segunda secuencia no incluye ninguna secuencia complementaria a la subsecuencia variable;
 - 20 en donde la segunda secuencia del primer oligonucleótido cebador de ADN está diseñada para producir una energía libre de hibridación estándar (ΔG°_{PT}) a la secuencia diana, y la primera secuencia del oligonucleótido bloqueante de ADN está diseñada para producir una energía libre de hibridación estándar (ΔG°_{BT}) a la secuencia diana, que cumple la siguiente condición: $+2 \text{ kcal/mol} \geq \Delta G^{\circ}_{PT} - \Delta G^{\circ}_{BT} \geq -8 \text{ kcal/mol}$; y en donde la subsecuencia no solapante está diseñada para producir una energía libre de hibridación estándar (ΔG°_3) a la secuencia diana, que cumple la siguiente condición: $-4 \text{ kcal/mol} \geq \Delta G^{\circ}_3 \geq -12 \text{ kcal/mol}$; y
 - 25 d. proporcionar el oligonucleótido bloqueante de ADN y el primer oligonucleótido cebador de ADN como se ha diseñado en las etapas (b) y (c); y
 - 30 e. introducir el oligonucleótido bloqueante de ADN y el primer oligonucleótido cebador de ADN en la muestra, en donde el primer oligonucleótido cebador de ADN es suficiente para inducir la extensión enzimática; y
 - 35 f. introducir en la muestra una ADN polimerasa, nucleósidos trifosfato y uno o más reactivos necesarios para la amplificación de ácidos nucleicos basada en polimerasa; y
 - g. hacer reaccionar la muestra en condiciones suficientes para lograr la amplificación de ácidos nucleicos.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la ADN polimerasa es una ADN polimerasa termoestable, y en donde las condiciones suficientes para lograr la amplificación de ácidos nucleicos comprenden exponer la muestra a al menos
- 40 10 ciclos, en donde cada ciclo comprende al menos 2 exposiciones a temperatura diferentes, una exposición a la temperatura de al menos 85 °C y una exposición a la temperatura de no más de 75 °C.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de introducir en la muestra una enzima seleccionada del grupo que consiste en una enzima de mellado, una recombinasa, una helicasa, una RNasa, una transcriptasa inversa o cualquier combinación de las mismas.
- 45 4. El método de la reivindicación 1, en donde la subsecuencia solapante comprende una porción del extremo 5' de la subsecuencia diana neutra, en donde dicha porción es de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, u opcionalmente, es de aproximadamente 7 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos.
- 50 5. El método de la reivindicación 1, en donde la concentración del oligonucleótido bloqueante de ADN introducido en la muestra es de aproximadamente 2 a aproximadamente 10.000 veces mayor que la concentración del primer oligonucleótido cebador de ADN introducido en la muestra, opcionalmente, en donde la concentración del oligonucleótido bloqueante de ADN es de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 veces mayor que la
- 55 concentración del primer oligonucleótido cebador de ADN, opcionalmente, en donde la concentración del oligonucleótido bloqueante de ADN es de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces mayor que la concentración del primer oligonucleótido cebador de ADN.

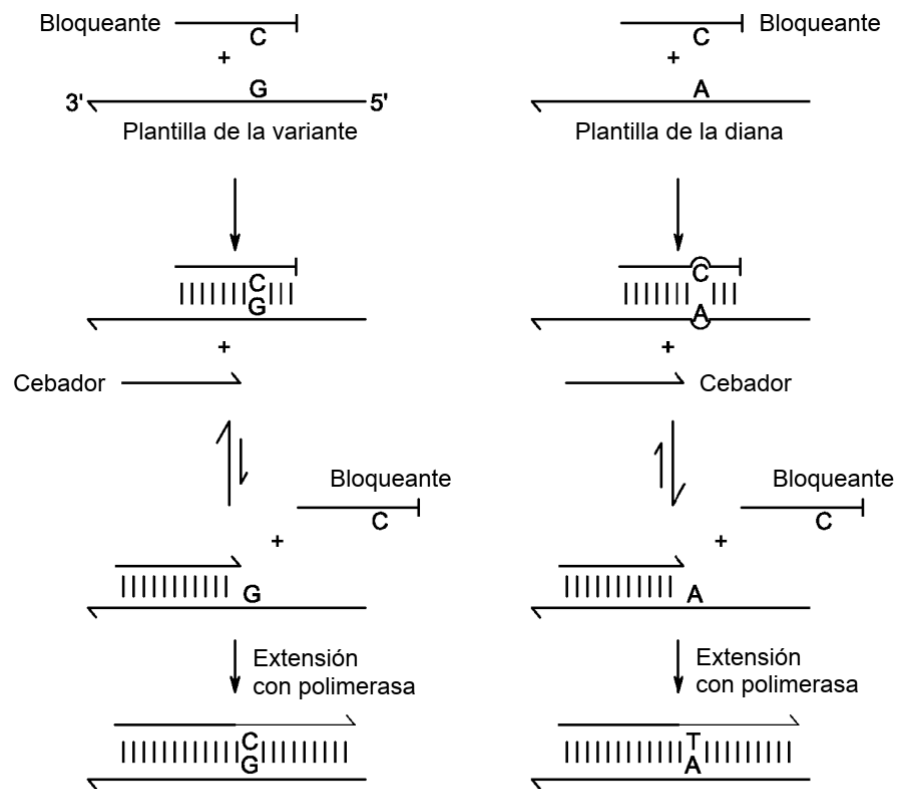


FIG. 1

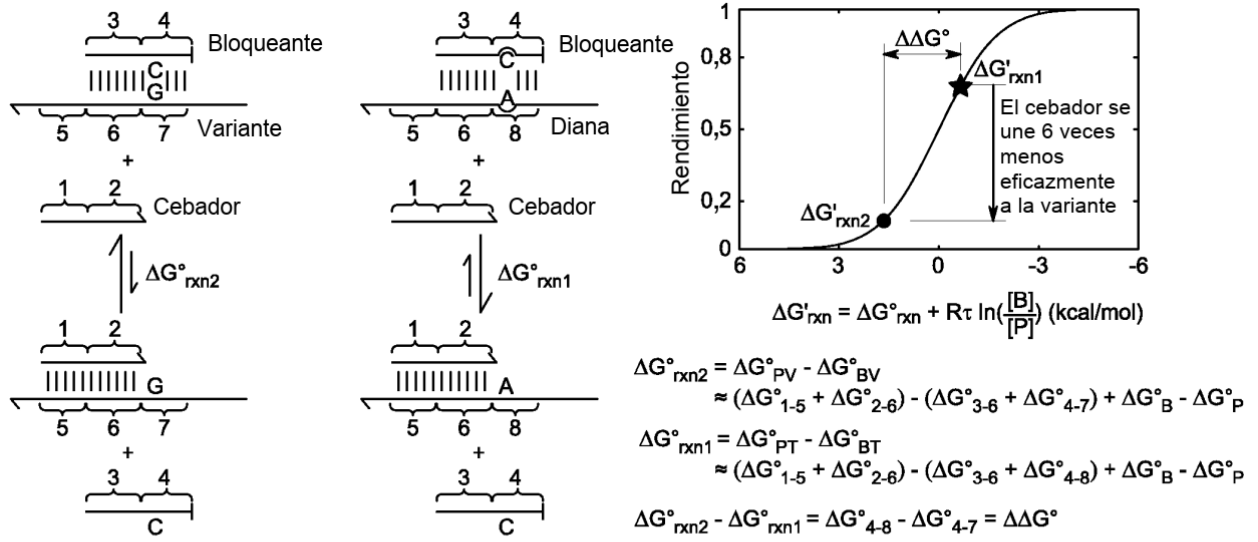


FIG. 2

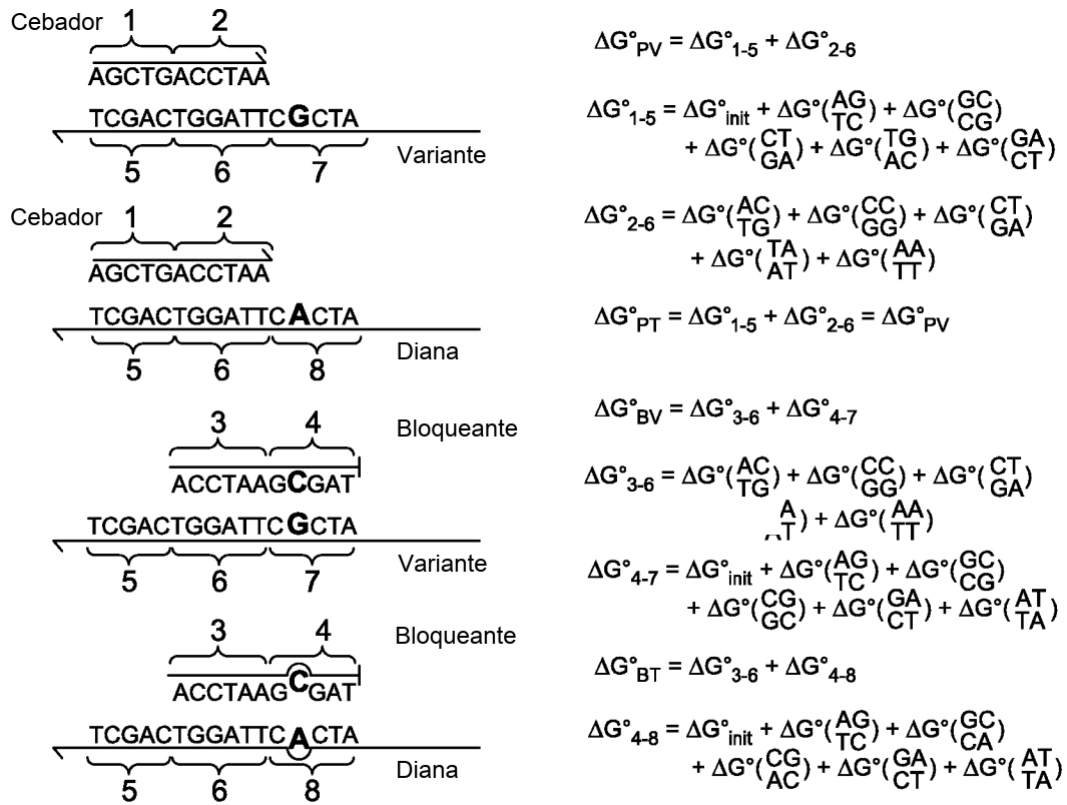


FIG. 3

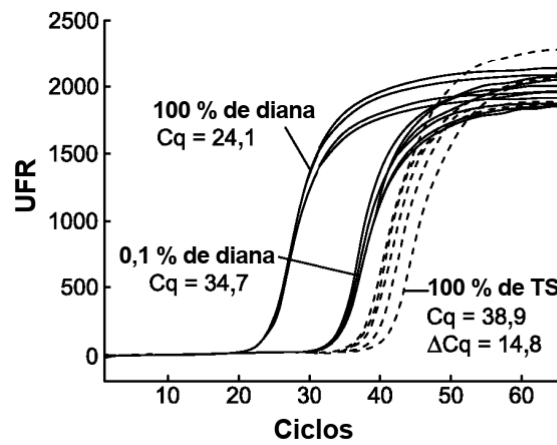
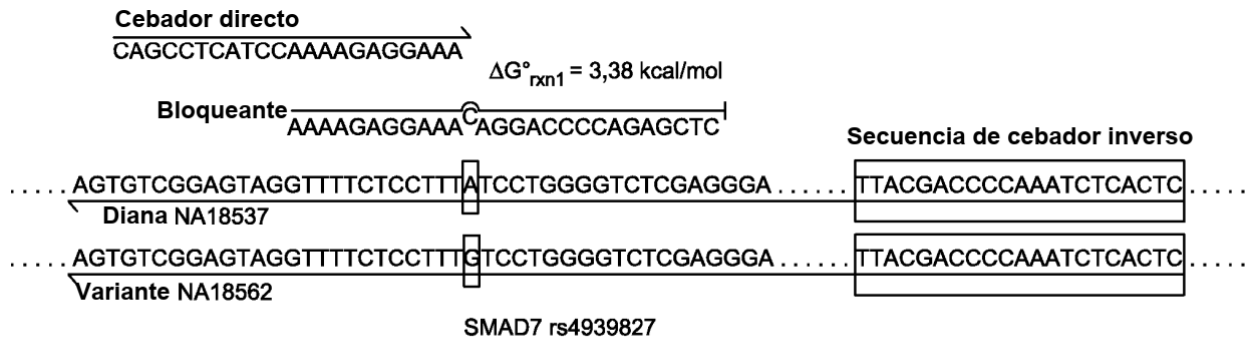


FIG. 4

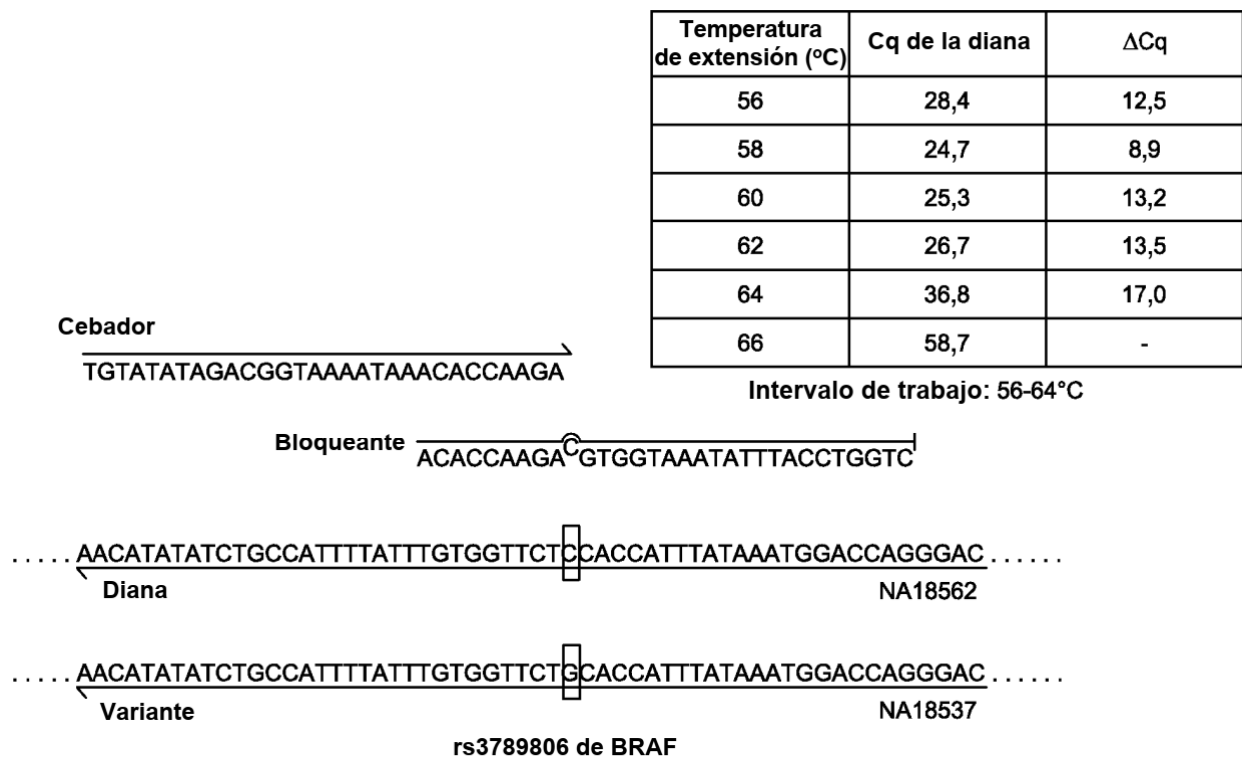


FIG. 5

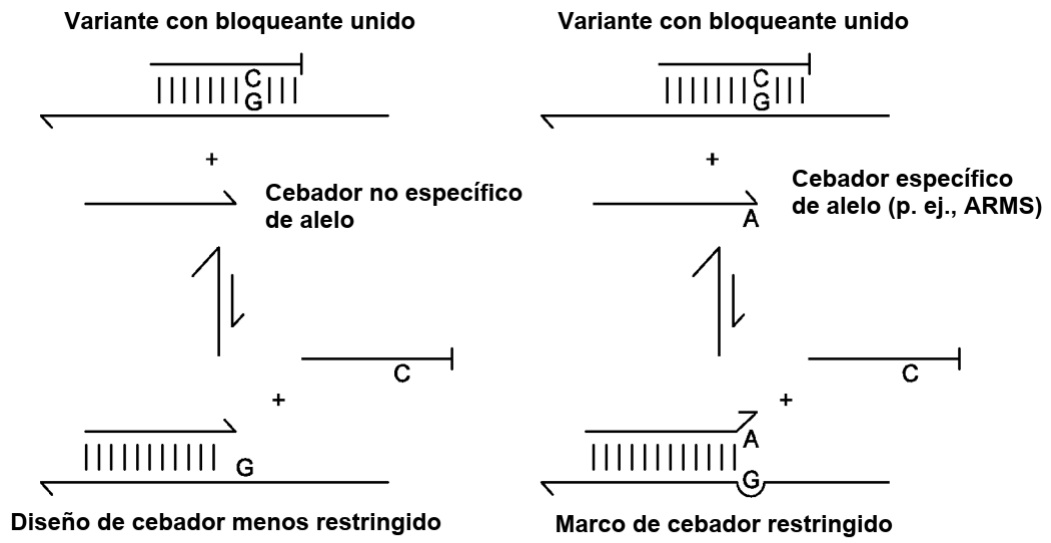


FIG. 6A

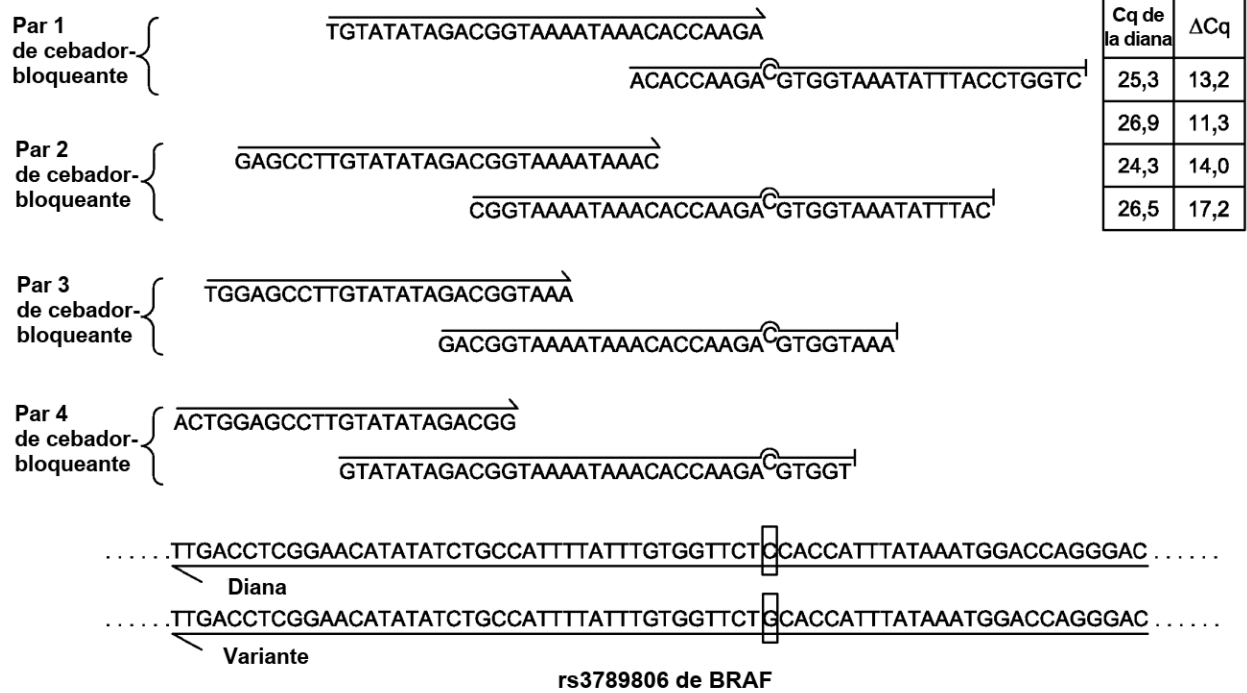


FIG. 6B

Simulación de los efectos de ΔG°_{rxn1} , $\Delta\Delta G^{\circ}$ fijada dada = 2 Kcal/mol

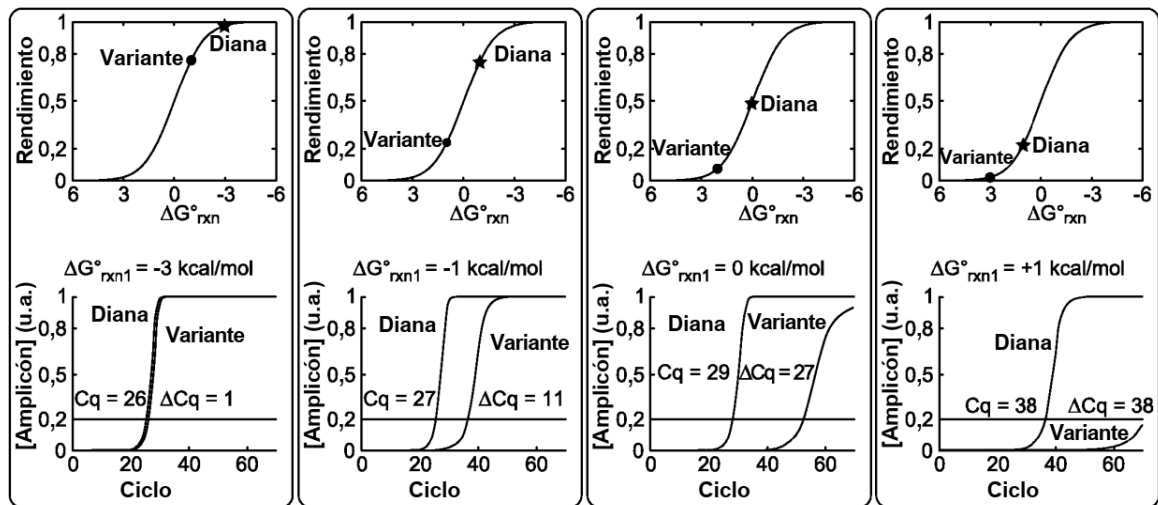


FIG. 7A

Validación experimental de rs4939827 de SMAD

Cebador		ΔG°_{rxn1} (kcal/mol)	Cq de la diana	ΔCq
CAGCCTCATCCAAAAGAGGAAA		0,13	23,2	6,1
Bloqueante C1	AAAAGAGGAAA CAGGACCCCAGA	0,73	23,3	10,9
Bloqueante C2	AAAAGAGGAAA CAGGACCCCAGAG	2,19	23,6	12,9
Bloqueante C3	AAAAGAGGAAA CAGGACCCCAGAGC	2,78	23,7	15,4
Bloqueante C4	AAAAGAGGAAA CAGGACCCCAGAGCT	3,38	24,8	17,4
Bloqueante C5	AAAAGAGGAAA CAGGACCCCAGAGCTC	4,54	25,6	14,7
Bloqueante C6	AAAAGAGGAAA CAGGACCCCAGAGCTCC			

.....AGTGTCTGGAGTAGGTTTCTCCTTTATCCTGGGGTCTCGAGGGA.....	
Diana	
.....AGTGTCTGGAGTAGGTTTCTCCTTTGTCCTGGGGTCTCGAGGGA.....	
Variante	

FIG. 7B(I)

Validación experimental de rs4939827 de SMAD

Cebador CAGCCTCATCCAAAAGAGGAAA		ΔG°_{rxn1} (kcal/mol)	Cq de la diana	ΔCq
Bloqueante T1 AAAAGAGGAAA AGGACCCCAGA		-2,16	23,3	1,7
Bloqueante T2 AAAAGAGGAAA AGGACCCCAGAG		-1,57	23,5	6,6
Bloqueante T3 AAAAGAGGAAA AGGACCCCAGAGC		-0,11	25,8	10,1
Bloqueante T4 AAAAGAGGAAA AGGACCCCAGAGCT		0,49	27,3	9,3
Bloqueante T5 AAAAGAGGAAA AGGACCCCAGAGCTC		1,08	29,9	8,8
Bloqueante T6 AAAAGAGGAAA AGGACCCCAGAGCTCC		2,24	32,6	8,8

..... AGTGTCTGGAGTAGGTTTCTCCTTT	TCCTGGGGTCTCGAGGGA
↙ Diana	
..... AGTGTCTGGAGTAGGTTTCTCCTTT	TCCTGGGGTCTCGAGGGA
↙ Variante	

FIG. 7B(II)

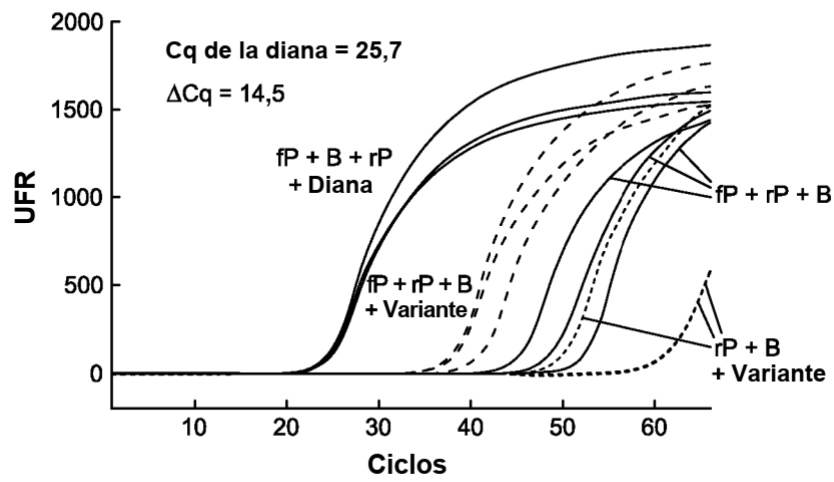
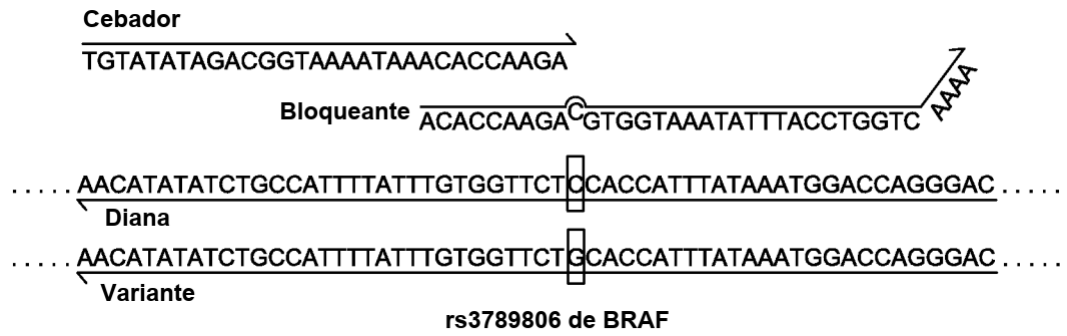


FIG. 8

5

Canal
FAM
rs3789806
de BRAF
(C/G)

Canal
Cy5
re1884444
de IL23R
(G/T)

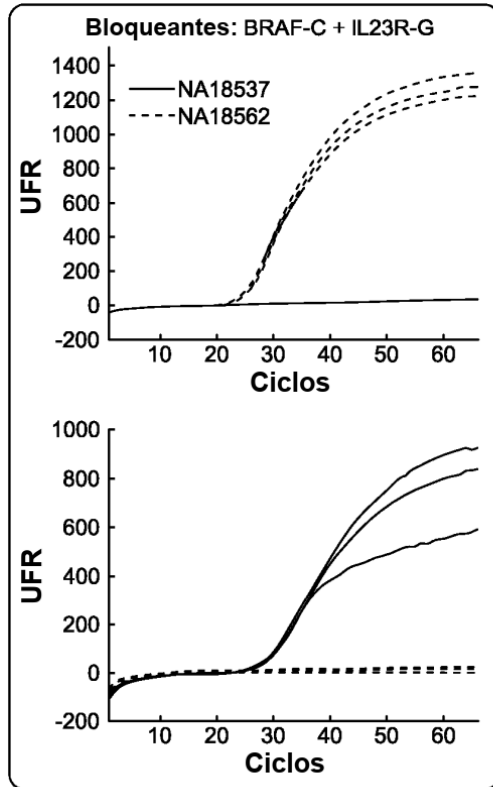


FIG. 9A

Canal
FAM
rs3789806
de BRAF
(C/G)

Canal
Cy5
re1884444
de IL23R
(G/T)

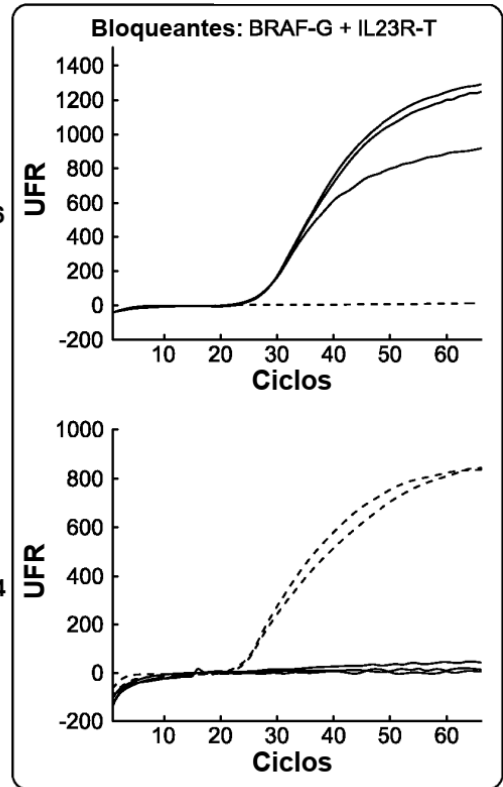


FIG. 9B

Possible unión no específica de cebador y bloqueante a otras plantillas en solución

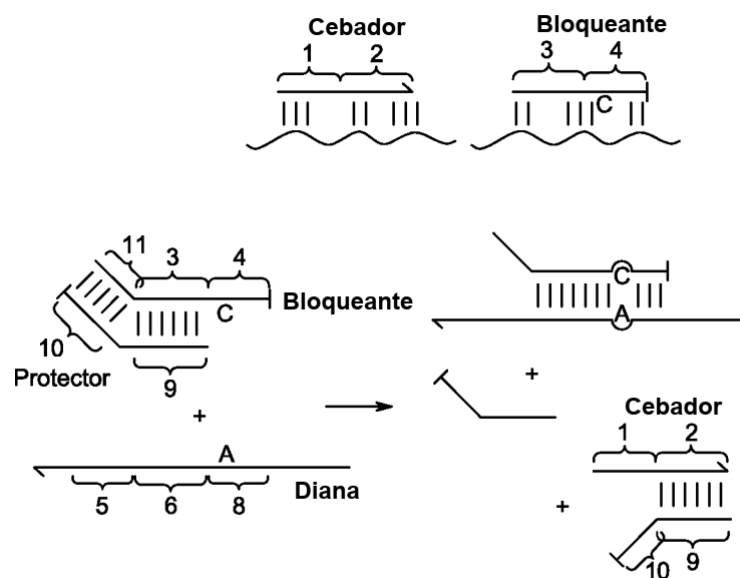


FIG. 10

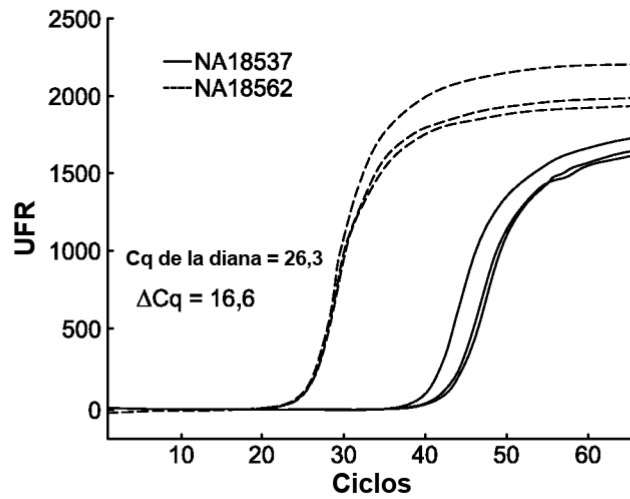
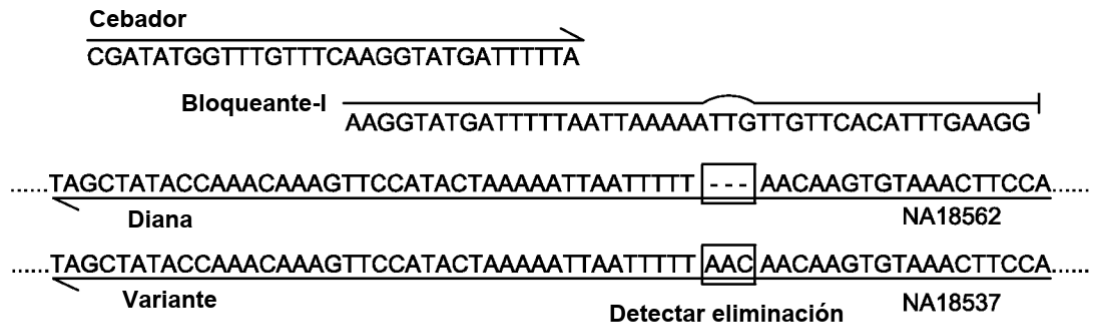


FIG. 11A

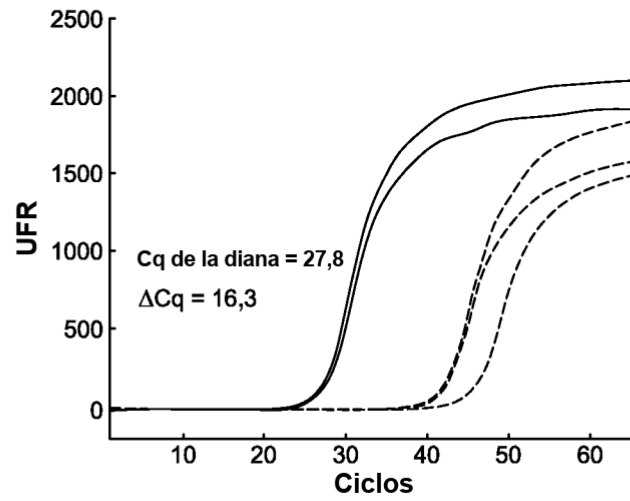


FIG. 11B

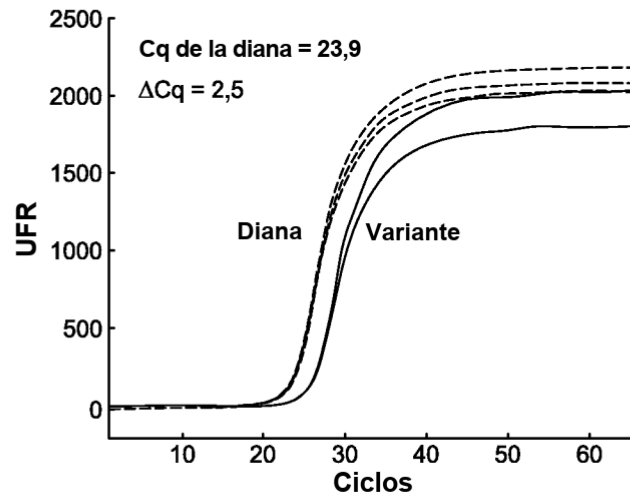
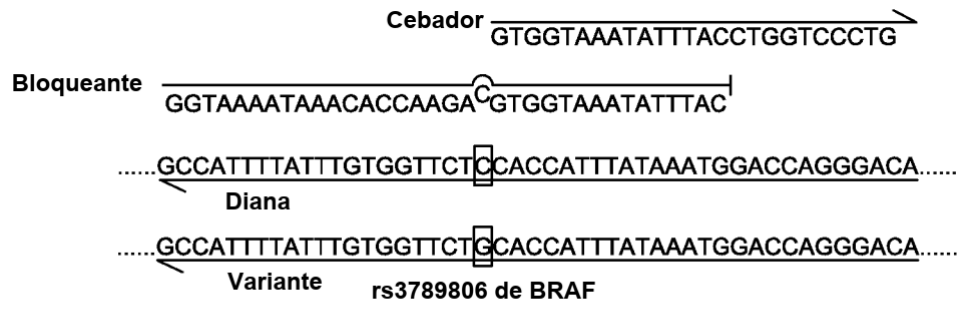


FIG. 12

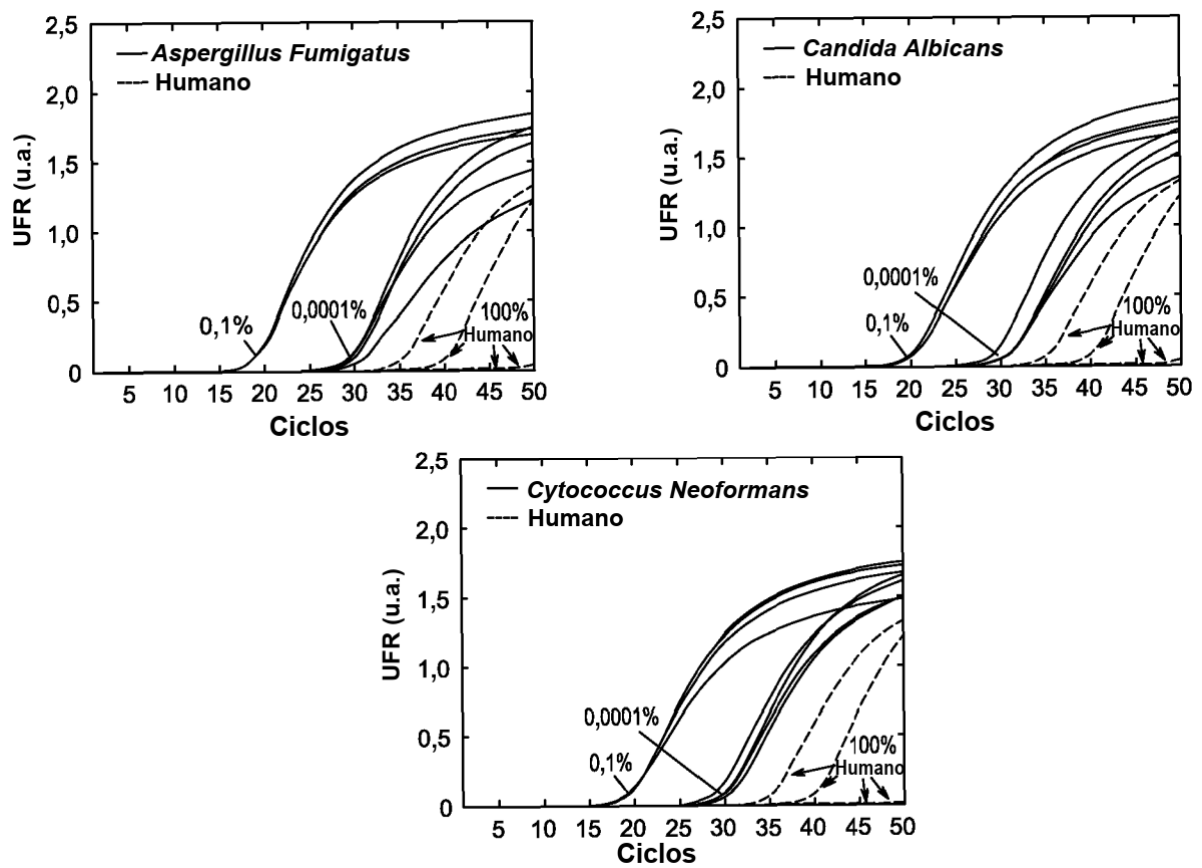


FIG. 13

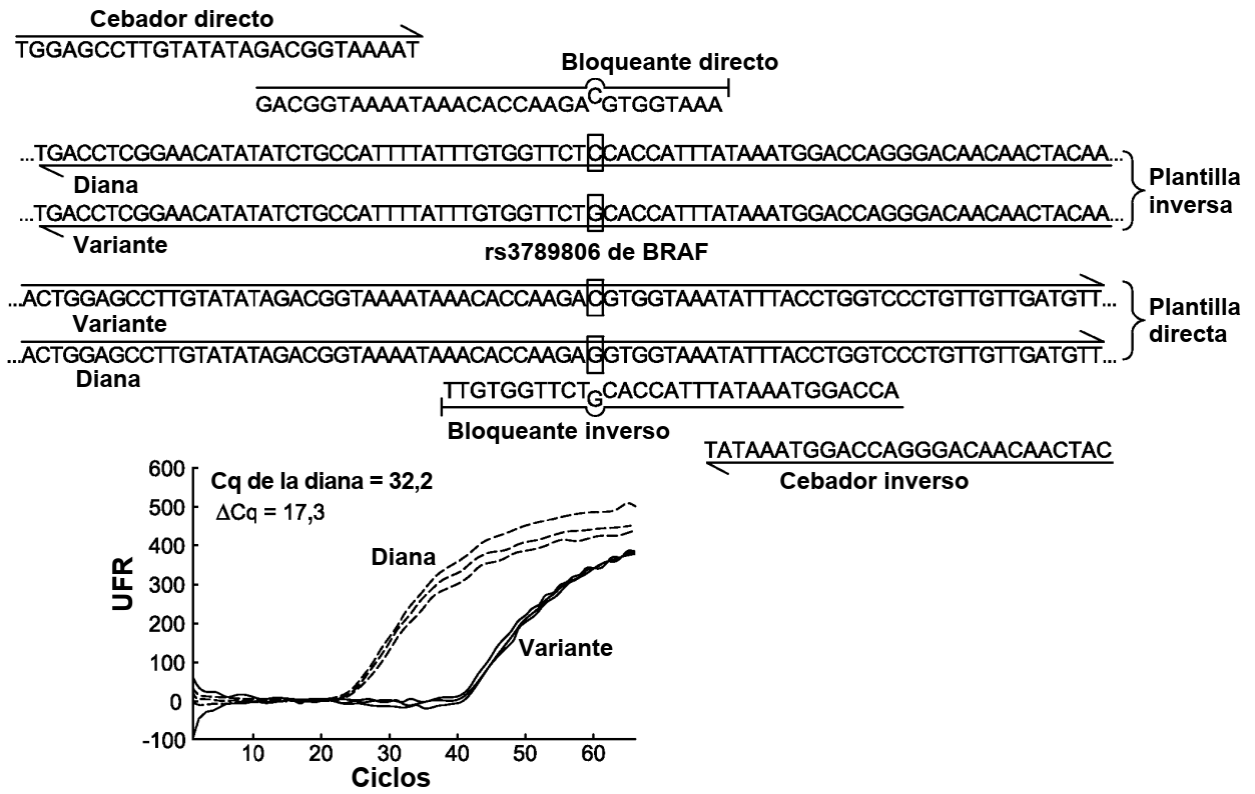


FIG. 14